



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias Médicas  
Facultad de Medicina

Instituto de Oftalmología "Conde de Valenciana"

"CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES GERMINALES  
DEL GEN *RB1* EN PACIENTES MEXICANOS CON  
RETINOBLASTOMA UNILATERAL NO FAMILIAR"

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS**

PRESENTA:  
ARTURO FLORES CUEVAS

TUTOR: DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUIZ

ENTIDAD: INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA "CONDE DE VALENCIANA"

MEXICO, D.F.

DICIEMBRE 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**A JOSÉ ALFREDO CUEVAS COVARRUBIAS (†)**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz por la oportunidad y el apoyo brindado.

A Bety, Erika y Maggie, por toda su ayuda y consejos en el laboratorio.

A mis compañeros de maestría Carlos y Oscar.

El CONACYT otorgo una beca durante el periodo Marzo 2010-Febrero 2012.

Becario: 240420

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	6
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b>	
1.1.- Generalidades	9
1.2.- Genética Molecular	9
1.3.- Casos Unilaterales con Mutación Germinal	13
1.4.- Cuadro Clínico	16
1.5.- Diagnóstico	17
1.6.- Histopatología	18
1.7.- Diagnóstico Diferencial	18
1.8.- Manejo y Tratamiento	19
1.9.- Asesoramiento Genético	20
<b>2.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b>	22
<b>3.- JUSTIFICACIÓN</b>	22
<b>4.- OBJETIVO GENERAL</b>	22
4.1.- Objetivos Particulares	23
<b>5.- TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO</b>	23
<b>6.- MATERIAL Y MÉTODOS</b>	23
6.1.- Tamaño de la Muestra	23
6.1.1.- Selección de la Muestra	23
6.1.2.- Criterios de inclusión	24
6.1.3.- Criterios de exclusión	24
6.1.4.- Criterios de eliminación	24
6.2.- Métodos	
6.2.1.- Aislamiento del DNA Genómico	25
6.2.2.- Amplificación por PCR del gen <i>RB1</i>	25
6.2.3.- Secuenciación Nucleotídica Directa Exón por Exón	26

6.2.4.- Análisis de Número de Copias	27
6.2.5.- Análisis de Metilación de <i>RB1</i>	29
6.2.6.- Secuenciación del Promotor de <i>RB1</i>	30
6.2.7.- Análisis de Predicción Funcional de Mutaciones	30
<b>7.- RESULTADOS</b>	<b>31</b>
7.1.- Secuenciación del Gen <i>RB1</i>	33
7.1.2.- Análisis In Silico de la Mutación R661W	37
7.2.- Análisis de MLPA	38
7.3.- Análisis de Metilación del Promotor del Gen <i>RB1</i>	40
7.4.- Secuenciación del Promotor del Gen <i>RB1</i>	41
<b>8.- DISCUSIÓN</b>	<b>42</b>
<b>9.- ASPECTOS ÉTICOS</b>	<b>48</b>
<b>10.- ANEXOS</b>	<b>50</b>
<b>11.- REFERENCIAS</b>	<b>55</b>

## **RESUMEN**

### **INTRODUCCIÓN**

El retinoblastoma (RB) es el tumor intraocular más frecuente de la niñez y afecta a 1 de cada 17,000 nacidos vivos y en México ocupa el segundo lugar dentro de las neoplasias sólidas en edad pediátrica. Este tumor se puede presentar de manera esporádica (60% de los casos) o bien puede ser hereditario (40% de los casos) y puede afectar a uno o a ambos ojos. De los casos hereditarios, solo el 25% tienen antecedentes familiares y los demás corresponden a mutaciones de novo. Los casos esporádicos generalmente son unilaterales y unifocales, sin embargo hasta el 28% de esta clase de tumores tienen un componente hereditario.

En los últimos años se ha reconocido que hasta 28% de los casos unilaterales pueden deberse a una mutación germinal y por lo tanto tienen un riesgo muy elevado de transmitirse a la descendencia. Sin embargo, se estima que este porcentaje puede variar entre distintas poblaciones.

### **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Qué porcentaje de una muestra de pacientes mexicanos con retinoblastoma unilateral no familiar presentan mutación germinal en el gen *RB1*?

### **JUSTIFICACIÓN**

En México no existen estudios sobre la frecuencia de mutaciones germinales (hereditarias) en casos unilaterales no familiares de la enfermedad.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el porcentaje de casos unilaterales de retinoblastoma originados por mutación germinal del gen *RB1* en una muestra de pacientes mexicanos.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Identificar el tipo de mutaciones del gen *RB1* en una muestra de pacientes con RB unilateral no familiar.
- Identificar posibles puntos calientes (“hot-spots”) de mutaciones en *RB1*.
- Establecer un protocolo integral y confiable de análisis genético para la identificación de defectos moleculares del gen *RB1* en pacientes con RB.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se incluyeron 20 casos de retinoblastoma unilateral no familiar, pacientes de uno u otro género, sin importar edad al momento de la inclusión al estudio.

Se obtuvo ADN de sangre periférica de los 20 pacientes y se realizó el tamizaje para la búsqueda de mutaciones germinales mediante secuenciación automatizada de 26 de los 27 exones y las respectivas regiones intrónicas flanqueantes del gen *RB1*. En los casos en que no se detectaron mutaciones por este método se realizaron las técnicas de análisis de número de copias de *RB1*, análisis de metilación del promotor de *RB1*, secuenciación del promotor de *RB1*



## **RESULTADOS**

Se estudiaron un total de 20 pacientes mexicanos con RB unilateral no familiar; 9 hombres y 11 mujeres. Mediante secuenciación nucleotídica, se identificó mutación germinal de RB1 en el 10% de los pacientes (2/20), de las cuales una fue mutación sin sentido en el exón 17 y otra de sentido equivocado en el exón 20, ambas descritas previamente en la literatura. Se realizó búsqueda de mutación en ambos padres del paciente RB01 y en la madre del paciente RB04 sin encontrar la alteración germinal en ninguno de los casos. Se llevó a cabo secuenciación del promotor, así como análisis de metilación del mismo y análisis del número de copias mediante Multiplex Ligation-dependent Probe Analysis (MLPA) en el resto de los pacientes (18/20) sin encontrar alteración germinal en ninguno de ellos.

## **CONCLUSIONES**

Reportes previos indican que en algunas poblaciones hasta el 28% de los casos esporádicos unilaterales presentan mutación germinal de RB1; en nuestro estudio el 10% de los pacientes con RB unilateral no familiar presentaron mutación germinal. No se identificaron otros mecanismos de mutación en RB1. Este es el primer estudio en población mexicana en el que se utilizan diversas pruebas de diagnóstico molecular para la búsqueda de mutaciones germinales en RB unilateral no familiar.

## 1.- INTRODUCCIÓN

### 1.1.- Generalidades

El Retinoblastoma (RB) es una neoplasia embrionaria maligna de origen retiniano que representa el tumor intraocular más frecuente de la niñez y afecta a 1 de cada 15,000-20,000 nacidos vivos, predominantemente durante los primeros 5 años de vida.<sup>1-6</sup>

En México este tumor ocupa el segundo lugar dentro de las neoplasias sólidas en edad pediátrica y se puede presentar esporádicamente (60% de los casos) o bien puede ser hereditario (40%), afectando a uno o a ambos ojos.<sup>5,7-10</sup>

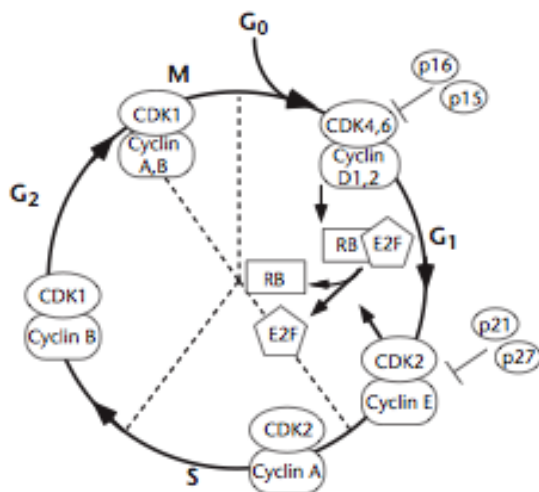
El RB es responsable de aproximadamente 1% de las muertes causadas por cáncer en la infancia y ocasiona cerca del 5% de los casos de ceguera infantil.<sup>11</sup> La enfermedad se desarrolla como consecuencia de la mutación de ambos alelos del gen supresor de tumores *RB1*.

### 1.2.- Genética Molecular

El gen *RB1* pertenece a la familia de genes supresores de tumor y se localiza en el cromosoma 13q14. Consta de 27 exones distribuidos en 183 kilobases (kb) de secuencia genómica y en su extremo 5' tiene una "isla" CpG que en condiciones normales no se encuentra metilada. *RB1* se transcribe en 4.7kb de mRNA sin evidencia de splicing alternativo. El marco de lectura abierto, que inicia en el exón 1 y termina en el 27, tiene 2.7kb y se continúa con una región no traducida de 2kb. *RB1* codifica una fosfoproteína nuclear (pRb) de 928 aminoácidos que pertenece a una pequeña familia de proteínas

nucleares que incluyen a p107 y p130 y se expresa en cerebro, riñón, ovario, bazo, hígado, placenta y retina. Estas proteínas comparten similitudes en su secuencia en un par de áreas que constituyen el “bolsillo” A/B, el cual se puede unir a miembros de la familia de factores de transcripción E2F dependiendo del estado de fosforilación de múltiples residuos de serina y treonina. La región C-terminal de pRB tiene una señal de localización nuclear y un motivo de interacción con cinasa dependiente de ciclinas (cdk) que le permite ser reconocido y fosforilado por los complejos ciclina-cdk.<sup>12-14</sup>

La función normal de pRb es la regulación negativa de la progresión del ciclo celular a través de la fase G1. La proteína Rb no fosforilada se une a E2F y causa represión de la transcripción mediada por E2F necesaria para que se lleve a cabo el proceso de división celular normal. Al final de G1 e inicio de la mitosis (M), pRb es fosforilada por cinasas dependiente de ciclinas dejando libre a E2F, el cual promueve la expresión de genes necesarios para la división celular. Además de la fosforilación, la acetilación dependiente del ciclo celular también ejerce control sobre la función de pRb. La acetilación obstaculiza la fosforilación de pRb e incrementa su unión a la oncoproteína MDM2 (Murine Double Minute 2).<sup>12,14</sup> (Figura 1)



**Figura 1.-** Esquema de la función de pRB. pRB detiene el ciclo celular en G1 mediante la unión a E2F. Los complejos ciclina-cdk se encargan de fosforilar a pRB lo que provoca la disociación del complejo pRB/E2F permitiendo de esta forma la expresión de E2F y la progresión del ciclo celular.

El desarrollo del RB es iniciado por dos mutaciones en una misma célula de la retina, que inactivan la función de ambos alelos del gen *RB1*. El origen de la primera y segunda mutación oncogénica tiene importancia debido al riesgo genético para la descendencia y la presentación clínica del RB. En pacientes con RB no hereditario, la primera mutación ocurre en una célula somática (retinocito) y el alelo mutante no se encuentra presente en ninguna de las células germinales del paciente. El desarrollo de un foco tumoral (RB) se inicia por la pérdida del alelo normal en esa misma célula (segunda mutación o pérdida de heterocigosidad).<sup>12,14</sup> De acuerdo a la teoría de Knudson, en los casos hereditarios la primera mutación se encuentra presente desde el cigoto (germinal) y la segunda se presenta en el transcurso de la vida (somática) en un retinocito que porta una mutación heterocigota.<sup>12,14,15</sup>

Los pacientes heterocigotos para mutaciones germinales tienen predisposición para desarrollar RB debido a que únicamente se requiere una mutación más en una célula de la retina para iniciar el desarrollo de un foco tumoral. En la mayoría de los pacientes con RB bilateral aislado la mutación predisponente es *de novo*. En algunos pacientes la mutación en *RB1* ocurre durante la embriogénesis o pos-cigóticamente, y en estos casos la mutación no se encuentra en todas las células (mosaicismo mutacional) y la presentación física así como la transmisibilidad del RB dependerá del número y tipo de células que tengan la mutación. Se estima que aproximadamente 8% de los pacientes con RB bilateral aislado presentan mosaicismo.<sup>12</sup>

El desarrollo de RB se inicia mediante la inactivación de ambas copias de *RB1* mediante mutaciones o modificaciones epigenéticas que son seguidas por la adquisición secuencial de otras anomalías genéticas que definen la formación del tumor y metástasis.<sup>16-18</sup> En los humanos este proceso se caracteriza por la pérdida funcional de ambas copias de *RB1*

seguido de cambios genómicos como ganancias en material genético en 1q32.1 (*MDM4* - Murine Double Minute 4), 6p22 (*E2F3* y *DEK*) y 2p24 (*MYCN*; V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived avian) y pérdida en la expresión de p130. Esto indica que además de la inactivación bialélica de *RB1* se requieren eventos (“hits”) adicionales para el desarrollo de RB.<sup>6,12,19-24</sup> Por ejemplo p130 se expresa normalmente en retina, sin embargo está muy disminuida o ausente en RB; además los RB con expresión disminuida de p130 muestran disminución en la apoptosis y en la diferenciación celular.<sup>25</sup>

En algunos casos de RB, la primera mutación se debe a deleciones microscópicas (8% de los pacientes con RB bilateral y 5% de los casos unilaterales esporádicos) o a deleciones o inserciones submicroscópicas (30% de pacientes con RB bilateral o familiar) en la región 13q14. Por esta razón, el cariotipo de alta resolución está indicado en todos los pacientes con RB.<sup>12,14,15</sup>

Algunos sitios en *RB1* contienen secuencias repetidas que presentan una alta frecuencia de mutaciones. En aproximadamente 50% de los pacientes con RB hereditario se identifican mutaciones puntuales y la mayoría de éstas son mutaciones sin sentido que originan un codón de paro prematuro. Entre éstas, las más frecuentes son transiciones CpG recurrentes en 12 de los 15 codones CGA, que codifica para Arginina, dentro del marco de lectura abierto; además, el dinucleótido CpG contenido en el sitio de splicing 5' del intrón 12 también es blanco de transiciones recurrentes. Alrededor del 10% de las substituciones reportadas son mutaciones de sentido equivocado y la mayoría de ellas afecta la región “bolsillo” A/B. Una mutación de sentido equivocado relativamente frecuente es una transición CpG en el exón 20 que causa un cambio R661W.<sup>26</sup> Tanto las deleciones e inserciones pequeñas como las mutaciones puntuales se han identificado en

todas las regiones codificantes y en sitios de splicing, excepto en los exones del extremo 3'.<sup>12,14,27</sup>

Las mutaciones puntuales en exones y sitios de splicing, deleciones e inserciones pequeñas representan el 70% de las mutaciones oncogénicas en *RB1*, mientras que el restante 30% son deleciones submicroscópicas de uno o varios exones completos, inserciones o rearrreglos cromosómicos (16%), por metilación del promotor (10%) y rearrreglos cromosómicos grandes y mutaciones intrónicas (4%).<sup>12,28</sup>

En los casos del RB hereditario (que representan el 40% de los casos de RB), 62% son de aparición temprana (antes de los 12 meses de edad), bilaterales y multifocales y 38% son unilaterales, con una penetrancia del 90% en ambos casos.<sup>29</sup> De todos estos, únicamente el 5-10% tienen antecedentes familiares de RB y los demás corresponden a mutaciones de novo.<sup>9</sup>

### **1.3.- Casos Unilaterales con Mutación Germinal**

Los casos esporádicos (60%) son generalmente unilaterales, unifocales y de inicio tardío (después del año de edad) y de estos hasta el 28% tienen un componente hereditario, es decir, el individuo afectado presenta una mutación germinal.<sup>9,14,30-32</sup>

De manera clásica se ha establecido que los casos de RB unilaterales corresponden al tipo esporádico y por lo tanto presentan riesgo mínimo de recurrencia (1-3%). Sin embargo, en los últimos años se ha reconocido que entre 2 y 28% de los casos unilaterales sin historia familiar pueden originarse por una mutación germinal y por lo tanto tienen un riesgo muy elevado de transmitirse a la descendencia.<sup>9,30,31,33</sup>

Se estima que este porcentaje puede variar entre distintas poblaciones. Sin embargo, el porcentaje real de casos unilaterales por mutación germinal aún está por determinarse pues la mayoría de estos estudios realizados no se ha incluido más de una técnicas de diagnóstico molecular y esto no permite identificar diferentes tipos de mutaciones en el gen *RB1*.

Recientemente, Ahani et al. (2011)<sup>41</sup> publicaron un estudio de 7 casos de población iraní con RB unilateral no familiar en el que identificaron 2 pacientes con mutación germinal mediante secuenciación de todos los exones y la técnica de MLPA; en 16 pacientes con RB unilateral no familiar de Marruecos, Omar et al. realizaron secuenciación directa de todos los exones codificantes de *RB1* y no identificaron mutación germinal en ninguno de los pacientes. Ese mismo año, Dhar et al.<sup>42</sup> estudiaron 22 casos de RB unilateral no familiar y reportaron el hallazgo de mutaciones germinales de *RB1* en 5 de ellos (22%).<sup>30,41-42</sup>

En el año 2002, Rodríguez et al. llevaron a cabo el primer estudio de caracterización de mutaciones del gen *RB1* en pacientes mexicanos con RB unilateral no familiar. De 11 casos incluidos en el estudio, solamente uno presentó mutación germinal. Una limitación de este estudio fue que no se realizó análisis de toda la región codificante del gen ni del promotor ni se analizó el estado de metilación, además del escaso número de muestras.<sup>43</sup>

Por otro lado, 6 años después del primer estudio en población mexicana, Macías et al. (2008)<sup>44</sup> realizaron el estudio molecular de 27 pacientes de origen mexicano con RB unilateral no familiar sin encontrar mutación germinal en ninguno de ellos, sin embargo no realizaron análisis del número de copias ni del estado de metilación del promotor.<sup>38</sup>

En la siguiente tabla se resumen los resultados de estudios realizados en distintos países.

<b>AUTORES</b>	<b>PAÍS</b>	<b>CASOS UNILATERALES</b>	<b>MUTACIONES GERMINALES</b>	<b>% MUTACION GERMINAL</b>
Rodríguez et al. 2002	México	11	1	9
Chog et al. 2002	China	28	1	3.6%
Valverde et al. 2005	Meta-análisis	753 (bilaterales y unilaterales)	52	6.9
Bamne et al. 2005	India	23	5 (1 familiar afectado, 1 familiar asintomático)	21.7
Bénédict B. et al 2006	Bélgica	35	4 (2 familiares asintomáticos)	11.4
Milica K et al 2006	Serbia	12	1	8.3
Hana A et al 2007	Suiza	28	3	10.7
Macias M et al 2008	México	27	-	0
Kim Nichols et al 2009	Estados Unidos	173	24	13.9
Rushlow D et al 2009	Canada	572	76	13.3
Parsam VL et al 2009	India	21	5	23.8
Abidi O et al 2011	Marruecos	16	-	0
Ahani A et al 2011	Iran	7	2	28.6
Dhar S et al 2011	Estados Unidos	22	5	22.7



La importancia de realizar el estudio molecular para identificar mutaciones en el gen *RB1* radica en el impacto positivo que tiene esto en el asesoramiento genético, así como en la disminución del costo de atención para el paciente.<sup>44</sup>

#### **1.4.- Cuadro Clínico**

El cuadro clínico de la enfermedad se caracteriza por leucocoria que es el dato más frecuente (60%) y se considera un signo tardío, estrabismo (signo temprano), glaucoma, disminución de la agudeza visual, inflamación orbitaria y alteraciones en el tamaño y color del iris.<sup>10,28,45</sup>

La edad promedio al momento del diagnóstico es a los 12 meses para el RB bilateral y de 18 meses para los casos unilaterales. Aproximadamente 90% de los pacientes son diagnosticados antes de los 3 años de edad.<sup>14,46</sup>

En casos excepcionales el RB se presenta después de los 7 años de edad. Se ha observado que las primeras manifestaciones son más inusuales mientras mayor sea la edad de presentación en el paciente y pueden incluir celulitis orbital, edema palpebral, heterocromía del iris, queratitis, opacidad vítrea, quistes en retina, hemorragia vítrea, endoftalmitis, uveítis atípica asociada a glaucoma secundario y pobre respuesta a los corticoesteroides.<sup>47-48</sup>

Algunos casos de RB pueden presentarse asociados a otras anomalías como lo son el Síndrome del13q (RB esporádico con retraso mental y en el crecimiento moderado acompañado de dismorfias faciales e hipotonía muscular); Retinoma (tumor benigno de origen retiniano); RB trilateral (RB bilateral asociado a un tumor cerebral de línea media).<sup>14</sup>

Los pacientes con RB tienen predisposición para desarrollar osteosarcoma con un riesgo 500 veces mayor en los casos de RB bilateral. El desarrollo de este tumor se encuentra directamente relacionado con la mutación del gen *RB1*.<sup>49</sup> Otros tumores secundarios que también se presentan en el RB son fibrosarcoma, condrosarcoma, carcinomas epiteliales, linfoma, leucemia, melanoma, tumores cerebrales, pinealoblastoma. Estos tumores secundarios se pueden clasificar en 5 grupos:<sup>14</sup>

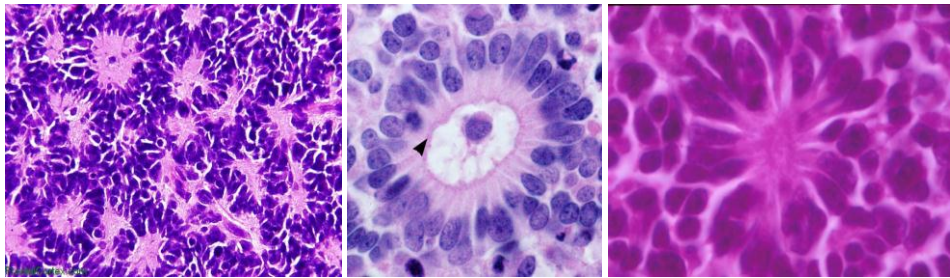
- a) Tumores que aparecen en área irradiada;
- b) Tumores que aparecen fuera y lejos del área irradiada;
- c) Tumores que aparecen en pacientes que no recibieron radioterapia;
- d) Tumores que no pueden ser caracterizados como primarios o metastáticos;
- e) Tumores en familiares de pacientes con RB que se encuentran libres de tumor en retina.

### **1.5.- Diagnóstico**

El diagnóstico se hace clínicamente y con estudio de fondo de ojo. La Tomografía Axial Computarizada (TAC) permite observar la presencia de masas intraoculares calcificadas que son un dato característico y altamente sugestivo de RB. La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) permite valorar la invasión tumoral al nervio óptico, tanto la TAC como la RMN permiten detectar tumores de pequeño tamaño, hacer diagnóstico diferencial, estatificar el tumor y establecer el tratamiento más adecuado, ambos métodos son complementarios. El ultrasonido es capaz de detectar tumores de hasta 2mm y permite identificar el tipo de crecimiento tumoral.<sup>6</sup>

## 1.6.- Histopatología

Histopatológicamente el tumor se encuentra caracterizado por la presencia de lesiones tipo “rosetas” o de “ramos de flores” (*fleurettes*). Las rosetas son estructuras esféricas compuestas por epitelio columnar organizadas ordenadamente alrededor de un lumen pequeño, en cuyo caso se llaman rosetas de Flexner-Wintersteiner, o bien sin ningún lumen (rosetas de Homer-Wright). Las *Fleurettes* son estructuras organizadas de forma opuesta a las rosetas y que se encuentran rodeadas por células neoplásicas pobremente diferenciadas dando el aspecto de una flor.<sup>14</sup>



**Figura 2.-** La imagen izquierda muestra las rosetas de Homer-Wright. La imagen central muestra las rosetas de Flexner-Wintersteiner, las cuales están compuestas por epitelio columnar alrededor de un lumen central que corresponde al espacio subretinal. La imagen derecha muestra las Fleurettes.

## 1.7.- Diagnóstico Diferencial

El diagnóstico diferencial debe realizarse con retinopatía del prematuro, Toxoplasmosis, persistencia del vítreo primario hiperplásico, enfermedad de Coats, Esclerosis tuberosa, Vitreoretinopatía exudativa, Incontinencia Pigmenti y enfermedad de Norrie.<sup>10,13,14</sup>

## 1.8.- Manejo y Tratamiento

El tratamiento dependerá de la etapa en la que se encuentre el tumor al momento del diagnóstico y del tipo de tumor. El manejo inicial de los pacientes se realizará mediante la examinación del fondo de ojo mediante anestesia general, para visualizar toda la retina, desde el polo posterior hasta la zona más anterior, lo que nos permite determinar y posteriormente elegir el mejor tratamiento de acuerdo a:

- La uni o bilateralidad de las lesiones
- El número y localización de los tumores en la retina
- El tamaño tumoral
- El líquido subretinal y la diseminación tumoral
- La diseminación vítrea
- Las relaciones anatómicas con el disco óptico y la mácula.

Otros dos factores tomados en cuenta al momento de decidir la terapia son:

- 1) Edad del paciente;
- 2) Hallazgos histopatológicos.

Algunas de las alternativas terapéuticas pueden ser enucleación, radioterapia, quimioterapia, fototerapia y crioterapia.<sup>13,14</sup>

El pronóstico del RB es altamente dependiente del diagnóstico y evaluación tempranas, cuyo objetivo principal es mejorar la visión mientras se continúa la lucha por incrementar la supervivencia.<sup>50</sup> La radioterapia de haz externo se utiliza casi exclusivamente en los RB de diagnóstico tardío, cuando el resto de las terapias excepto la enucleación han

fracasado. Este tipo de radioterapia ha sido asociada a un incremento en el riesgo de cánceres secundarios, principalmente sarcomas de hueso y tejidos blandos, en pacientes con RB hereditario<sup>51</sup>, por otro lado la quimioterapia se ha relacionado con un incremento en el riesgo de leucemia mieloide aguda.<sup>52</sup>

Es por esto que la detección temprana de RB en familiares en riesgo permite la conservación de la función visual así como tratamientos que permitan conservar el globo ocular con una morbilidad menor y un aumento en la calidad de vida de los pacientes.<sup>53</sup>

Los pacientes con RB deben recibir un abordaje multidisciplinario integrado por oncólogo pediatra, oftalmólogo pediatra, genetista y radiooncólogo para asegurar que la mayoría de los pacientes sean evaluados de manera oportuna.<sup>54</sup> En el estudio familiar de pacientes con RB es importante la valoración oftalmológica de todos los familiares en primer grado para descartar alguna alteración sugestiva de retinoblastoma.<sup>9,44</sup>

### **1.9.- Asesoramiento Genético**

Desde el reconocimiento de que el RB era una enfermedad con un componente hereditario, se intentó ofrecer un consejo genético basado en porcentajes calculados a partir de datos genéticos, como el tipo de herencia y la penetrancia, y de datos clínicos como que el tumor fuese unilateral o bilateral.<sup>31</sup> La limitación más evidente de este consejo genético clásico es que no permite un diagnóstico personalizado e inequívoco, por lo tanto es necesario realizar diagnóstico citogenético y molecular en pacientes y familiares que puedan ser portadores asintomáticos.<sup>32</sup>

El RB puede ser heredado de forma autosómica dominante (RB hereditario) con penetrancia casi completa para los descendientes de pacientes con RB, en estos casos el

riesgo de heredar el gen afectado es de 50% en cada embarazo. Por otro lado en los casos esporádicos el riesgo para los padres de tener otro hijo afectado es de 1%, mientras que el riesgo para el afectado de que su descendencia presente la enfermedad es de 3 al 8% en los casos unilaterales no hereditarios y hasta 45% en los casos hereditarios bilaterales, dado que la penetrancia de la enfermedad es del 90% y por lo tanto no todos los pacientes que presentan mutación germinal desarrollan la enfermedad.<sup>9,32,44</sup>

## **2.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Qué porcentaje de una muestra de pacientes mexicanos con RB unilateral, no familiar, presenta mutación germinal en el gen *RB1*?

## **3.- JUSTIFICACIÓN**

De acuerdo a la literatura internacional, entre 2% y 28% de los casos de RB unilateral esporádico se originan por una mutación germinal (hereditaria) del gen *RB1*. En México no existen estudios sobre la frecuencia de mutaciones germinales (hereditarias) en casos unilaterales no familiares de la enfermedad, que utilicen diferentes técnicas moleculares para la detección de estas alteraciones. Es importante determinar [qué](#) porcentaje de pacientes con RB unilateral no familiar en nuestra población se deben a mutación germinal para contribuir a definir la genética molecular de la enfermedad en nuestra población e implementar programas de tamizaje genético en este grupo de enfermos. Por otra parte, la identificación de mutaciones germinales en casos de RB unilateral es de suma importancia para el asesoramiento genético de las familias afectadas.

## **4.- OBJETIVO GENERAL**

Determinar el porcentaje de casos unilaterales de RB originados por mutación germinal del gen *RB1* en una muestra de pacientes mexicanos.

#### **4.1.- OBJETIVOS PARTICULARES**

- Identificar el tipo de mutaciones del gen *RB1* en una muestra de pacientes con RB unilateral no familiar.
- Identificar posibles puntos calientes (“hot-spots”) mutacionales del gen *RB1* en sujetos con RB unilateral no familiar.
- Establecer un protocolo integral y confiable de análisis genético para la identificación de defectos moleculares del gen *RB1* en pacientes con RB.

#### **5.- TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO**

- Observacional, Transversal, Descriptivo.

#### **6.- MATERIAL Y MÉTODOS**

##### **6.1.- Tamaño de la Muestra**

Se incluyeron 20 pacientes con diagnóstico de RB unilateral no familiar, de uno u otro género, mayores de 12 meses de edad al momento de la inclusión al estudio.

##### **6.1.1.- Selección de la Muestra**

- Por conveniencia y consecutiva
- Se incluyeron todos los casos índices con diagnóstico de RB unilateral no familiar captados en el Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana” en el periodo de marzo de 2010 - diciembre 2011.



- Se incluyeron los casos obtenidos mediante el registro de pacientes del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana” del 2005 al 2010

#### **6.1.2.- Criterios de Inclusión**

- Sujetos con diagnóstico de RB unilateral no familiar, de uno u otro género, mayores de 12 meses de edad al momento de la inclusión al estudio.
- Sujetos que aceptaron realizarse el estudio genético y firmaran la hoja de consentimiento informado

#### **6.1.3.- Criterios de Exclusión**

- Sujetos con diagnóstico de RB unilateral no familiar de uno u otro género, sin importar edad al momento de la inclusión al estudio con antecedentes familiares de Fibrosarcoma, Condrosarcoma, Carcinomas epiteliales, Linfoma, Leucemia, Melanoma, Tumores cerebrales, Pinealoblastoma.

#### **6.1.4.- Criterios de Eliminación**

- Sujetos que no desearon continuar en el estudio.
- Sujetos cuya muestra de DNA fue insuficiente y no fue posible localizar nuevamente o bien no desearon continuar en el estudio.
- Sujetos que desarrollaron RB contralateral durante el tiempo del estudio.

### **6.2.- Métodos**

Se obtuvo ADN de sangre periférica de los 20 pacientes y se realizó el tamizaje para la búsqueda de mutaciones germinales mediante secuenciación automatizada de 26 de los 27 exones y las respectivas regiones intrónicas flanqueantes del gen *RB1*. No fue posible

realizar la secuenciación de exón 15, probablemente por la baja calidad del DNA y el alto contenido de adeninas y timinas presentes en la secuencia de este exón. En aquellos casos que no fue posible detectar mutación por este método se realizaron las siguientes técnicas: Análisis de número de copias de *RB1*; Análisis de metilación del promotor de *RB1*; Secuenciación del promotor de *RB1*.

### **6.2.1.- Aislamiento del DNA Genómico**

El DNA genómico de cada sujeto participante se aisló a partir de leucocitos obtenidos de una muestra de 2-3 mL de sangre periférica obtenida por punción venosa y mediante el sistema automatizado de extracción de DNA Quickgene (Fujifilm). En sujetos en quienes no fue posible la obtención de una muestra de 2-3 mL de sangre periférica la extracción de DNA se realizó a partir de células de mucosa bucal obtenidas por raspado con hisopo y se utilizó el estuche comercial Puregene Buccal Cell Core Kit A (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **6.2.2.- Amplificación por PCR del gen *RB1***

Se efectuó la amplificación por PCR de cada uno de los 27 exones y de las uniones exón/intrón de *RB1* a partir del DNA de los sujetos afectados y utilizando 27 pares de oligonucleótidos derivados de la secuencia normal de cada exón (Anexo 2). Cada reacción de amplificación de PCR tuvo un volumen final de 15 microlitros que incluyó amortiguador para PCR 1X, de 50-100 ngs de DNA genómico, 0.2 mM de cada uno de los cuatro dNTP's, 2.5 unidades de enzima TaqPolimerasa, 0.3 microlitros del oligonucleótido correspondiente (sentido y antisentido), MgCl<sub>2</sub> entre 1 y 3 mM y agua bidestilada c.b.p. Se

utilizó un programa de temperaturas que incluye 1 ciclo de 15 min a 95°C para la desnaturalización inicial, 35 ciclos con 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de alineamiento a temperaturas específicas para cada par de oligonucleótidos y 1 min a 72°C para la extensión. Por último, se realizó 1 ciclo a 72°C por 10 min para la extensión final. Los productos obtenidos de la amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con tinción de bromuro de etidio para identificar las bandas específicas con el producto amplificado, utilizando como referencia un marcador estándar de peso molecular de 100 pb. Se reconocieron las bandas de interés y se escindieron del gel para la purificación del producto de DNA amplificado utilizando el método de purificación por columna (Qiagen).

### **6.2.3.- Secuenciación Nucleotídica Directa Exón por Exón**

Se realizaron nuevas reacciones de PCR para la secuenciación nucleotídica de 26 de los 27 exones de *RB1* incluyendo las uniones exón/intrón. A pesar de lograr amplificar mediante PCR el exón 15, no fue posible realizar la secuenciación del mismo, probablemente por la baja calidad del DNA y el alto contenido de adeninas y timinas presentes en la secuencia. Cada reacción de 10 microlitros contuvo 2 microlitros de BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) que contiene los cuatro dideoxinucleótidos trifosfatados (ddNTPs) marcados por fluorescencia, deoxionucleótidos trifosfatados (dNTPs) no marcados, Tris-HCl (Ph 9.0),  $MgCl_2$  y la enzima *ampliTaq* polimerasa; se agregaron además 1 microlitro del oligonucleótido correspondiente a una concentración de 10 micromolar, 10-20 ngs del DNA de cada producto de PCR como templado y agua bidestilada para un volumen final de 20 microlitros. Para esta reacción

de PCR se utilizó un programa de 25 ciclos que incluyen 30 segundos a 97°C para la desnaturalización, 15 seg a 50°C para el alineamiento y 4 min a 60°C para la extensión. Los productos de esta segunda amplificación de PCR se purificaron por medio de columnas Centri-Sep (Applied Biosystems) para eliminar el exceso de oligonucleótido y de ddNTPs fluorescentes. Cada muestra se resuspendió en 20 microlitros de formamida y posteriormente se desnaturalizó a 95°C por 5 min. Los productos se analizaron por electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI Prism 310 o en uno 3130 (Applied Biosystems) y las secuencias de DNA obtenidas en sujetos enfermos se compararon con las secuencias silvestres del gen *RB1* para identificar posibles mutaciones.(Ensembl: ENST00000267163)

#### **6.2.4.- Análisis de Número de Copias**

El análisis de posibles deleciones o duplicaciones completas o parciales del gen *RB1* se realizó mediante análisis por MLPA (*Multiplex Ligation-Dependent Probe Analysis*) o análisis de ligación dependiente de sondas múltiples, ya que nos permite identificar deleciones o inserciones de uno o varios exones que no pueden ser identificadas por secuenciación nucleotídica directa debido al tamaño de las mismas. Se utilizó el estuche comercial MLPA P047 B1 RB1 (MRC Holland) que incluye sondas para 26 de los 27 exones del gen *RB1*, sin sonda para el exón 15 que se encuentra muy cerca de los exones adyacentes. También incluye 3 sondas para el exón 1, 2 sondas para genes flanqueantes de *RB1* (48 kb corriente arriba y 35 kb corriente abajo), una sonda para el gen *DLEU1* localizado a 1.6 Mb de *RB1* (para detectar deleciones o duplicaciones extensas), así como 13 sondas control de genes localizados en otros cromosomas.

El MLPA es una técnica de PCR múltiple que utiliza una serie de sondas que al hibridar a su región complementaria en el DNA genómico permite la amplificación de fragmentos de

entre 130 y 480 bases que son identificados y caracterizados mediante electroforesis capilar. En caso de deleciones, la sonda o sondas correspondientes no hibridan al DNA genómico por lo que no existe amplificación del fragmento correspondiente.<sup>5</sup> El análisis de MLPA se realizó en un Analizador Genético 3130 (Applied Biosystems). La técnica de MLPA incluye los 5 pasos siguientes:

**1.- Desnaturalización del DNA:** Cada reacción de 5 microlitros contuvo 2 microlitros de DNA (100ng) y 3 microlitos de amortiguador TE; 5 microlitros para la reacción de control sin DNA). Se inició el programa de PCR para MLPA con un ciclo de 5 minutos a 98°C y enfriamiento posterior a 25°C para iniciar el siguiente paso.

**2.- Hibridacion:** Se preparó un master mix de hibridación que contuvo por cada reacción, 1.5 microlitros de amortiguador MLPA y 1.5 microlitros de Probemix. El master mix se mezcló mediante Vortex y se agregó 3 microlitros de esta reacción a cada muestra, pipeteando suavemente para mezclar homogéneamente. Se continuó el programa de MLPA: Incubación a 95°C por un minuto y 19 horas a 60°C.

**3.- Ligación:** Se preparó un master mix de Ligación que contuvo por cada reacción, 25 microlitros de dH<sub>2</sub>O, 3 microlitros de amortiguador Ligasa A, 3 microlitros de amortiguador Ligasa B y 1 microlitro de Ligasa-65. Se mezcló suavemente pipeteando y se continuó el programa de MLPA: Incubación a 54°C por 15 minutos para ligación, 5 minutos a 98°C para inactivación de la ligasa-65 y enfriamiento a 20°C.

**4.- Reaccion PCR:** Se preparo un Polimerasa master mix agregando por cada reacción, 7.5 microlitros de dH<sub>2</sub>O, 2 microlitros de SALSA PCR primer mix y 0.5 microlitros de Polimerasa. Se mezcló suavemente pipeteando y se agregó a cada reacción 10

microlitros de Polimerasa master mix para continuar con el programa de MLPA: 35 ciclos que incluyen 30 segundos a 95°C; 30 seg a 60°C; 60 segundos a 72°C. Un ciclo de 20 minutos a 72°C y pausa a 15°C.

**5.- Análisis:** Se preparó un mix de inyección con 0.75 microlitros de reacción de PCR, 0.75 microlitros de dH<sub>2</sub>O, 0.5 microlitros de size standard y 13.5 microlitros de formamida. Los productos de esta reacción se incubaron a 90°C por 3 minutos y se enfriaron rápidamente para posteriormente ser analizados en un analizador genético 3130 (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: voltaje de inyección 16kV; tiempo de inyección 15 segundos; sin filtro; polímero POP4.

### 6.2.5.- Análisis de Metilación del Promotor de *RB1*

La determinación del estado de metilación del promotor de *RB1* se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por Zechsnig et al.<sup>28</sup> Brevemente, el DNA de cada paciente (1ng–2 µg) fue tratado con bisulfito de sodio y se realizó una PCR específica de metilación que permitió identificar productos metilados (que originan un amplicón de 172pb) y productos normales (que originan un amplicón de 172pb) en un gel de agarosa al 2%. Los oligonucleótidos que se utilizaron para esta PCR específica de metilación son:<sup>35</sup>

Oligonucléotido	Sentido 5'-3'	Antisentido 5'-3'
<i>RB1</i> Methylated	GGGAGTTTCGCGGACGTGAC	ACGTCGAAACACGCCCCG
<i>RB1</i> Unmethylated	GGGAGTTTTGTGGATGTGAT	ACATCAAACACACCCCA

### 6.2.6.- Secuenciación del Promotor de *RB1*

Se secuenció una región del promotor de 494pb que incluye la región promotora basal de *RB1* (-179 pb a -208 pb)<sup>55</sup> utilizando oligonucleótidos específicos para detectar posibles mutaciones asociadas. Se efectuó la amplificación por PCR del promotor de *RB1* a partir del DNA de los sujetos afectados y utilizando 2 pares de oligonucleótidos derivados de la secuencia normal del promotor, obteniendo un amplicón de 589 pb<sup>33</sup>. El protocolo de amplificación por PCR fue idéntico al descrito por Brichard et al. (2000) y el protocolo de secuenciación fue idéntico al descrito en párrafos anteriores. Los oligonucleótidos que se utilizaron fueron los siguientes:<sup>33</sup>

Primers utilizados para secuenciación del promotor de *RB1*

Promotor	Oligonucleótido
Prom. (sentido)	TCCCAAAGGCCAGCAAGTGTCT
Prom. (anti-sentido)	CGTCCCCTGAGAAAACCGGAC

### 6.2.7.- Análisis de Predicción Funcional de Mutaciones.

Las mutaciones identificadas como responsables de la enfermedad y que no estaban reportadas previamente se analizaron mediante el programa de computación Polyphen (**polymorphism phenotyping**, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>)<sup>56-58</sup> (Anexo 3)

## **7.- RESULTADOS**

Se estudiaron un total de 20 pacientes mexicanos con RB unilateral no familiar mediante las técnicas previamente descritas; 9 mujeres (45%) y 11 hombres (55%). La edad promedio de diagnóstico fue 26.3 meses.

El 50% de los casos fue en ojo derecho y el 50% en ojo izquierdo; en las mujeres 55% de los casos fueron derechos y 45% izquierdos mientras que en los hombres 55% fueron izquierdos y 45% derechos. (Tabla 1)

Se llevó a cabo la secuenciación del promotor y análisis de metilación del mismo en 18/20 pacientes, así como análisis de número de copias mediante MLPA en 13/20 sin encontrar alteración en ninguno de ellos.



### Características Fenotípicas de los Pacientes

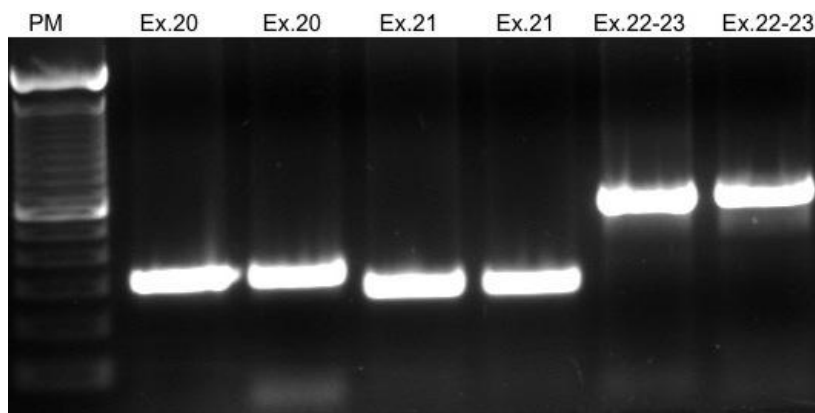
Px	Sexo	Edad	Edad de Dx	Lateralidad	AF	Tejido	MG
RB01	F	28 <sup>a</sup>	3a	Derecho	No	LSP	Sí
RB02	F	2a 6m	6m	Izquierdo	No	MO	No
RB03	M	6a	2a	Derecho	No	LSP	Sí
RB04	F	4a 6m	2a	Derecho	No	LSP	No
RB05	M	36a	3a	Izquierdo	No	LSP	No
RB06	F	6a	1a 6m	Derecho	No	LSP	No
RB07	M	12a	2a 6m	Derecho	No	LSP	No
RB08	M	2a 6m	2a	Izquierdo	No	MO	No
RB09	F	3a	2a	Derecho	No	LSP	No
RB10	M	6a 4m	3m	Derecho	No	LSP	No
RB11	M	8a 4m	2a 6m	Derecho	No	LSP	No
RB12	M	3a	1a 6m	Izquierdo	No	LSP	No
RB13	M	6a	4a 4m	Izquierdo	No	LSP	No
RB14	F	4a	2a	Izquierdo	No	LSP	No
RB15	M	7a	3a	Derecho	No	LSP	No
RB16	F	13a	1a 6m	Izquierdo	No	LSP	No
RB17	M	9a	2a	Izquierdo	No	LSP	No
RB18	M	2a 9m	1a 6m	Izquierdo	No	LSP	No
RB19	F	1a 7m	1a 6m	Izquierdo	No	MO	No
RB20	F	5a	2a 4m	Derecho	No	LSP	No

**Tabla1.-** características fenotípicas de los pacientes.

Px= Paciente; Edad al dx= edad al diagnóstico; AF= antecedentes familiares; LSP= leucocitos de sangre periférica; MO= mucosa oral; MG= mutación germinal

### 7.1.- SECUENCIACIÓN DEL GEN *RB1*

Se identificaron mutaciones germinales de *RB1* en 2 de los 20 pacientes (10%) y ambas variantes correspondieron a mutaciones puntuales. Una de ellas se localizó en el exón 17 y predijo un cambio sin sentido (Glu533X) (Figura 4), mientras que la segunda mutación se localizó en el exón 20 y condujo a un cambio de sentido equivocado (R661W). (Figura 7). (Tabla 2). Ambas sustituciones en *RB1* han sido descritas previamente.<sup>26,59</sup> No se identificaron mutaciones en las regiones exónicas ni en las intrónicas flanqueantes en DNA de los 18 pacientes restantes



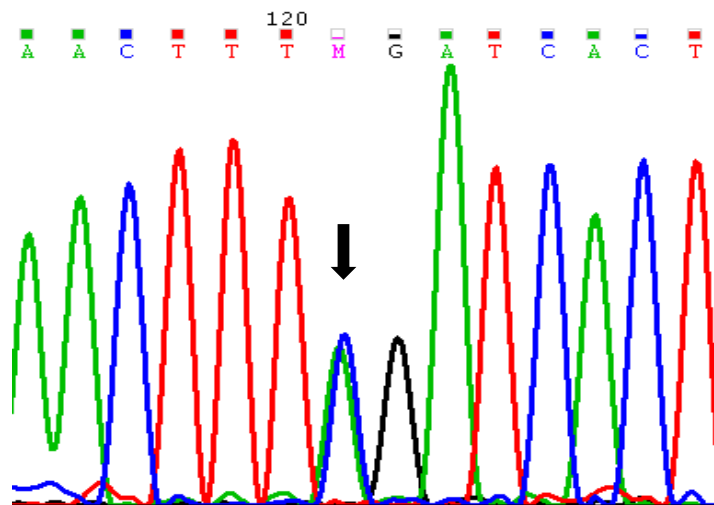
**Figura 3.-** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio de los productos de PCR para amplificar los exones: 20 (banda 303pb); 21 (banda 266pb) y 22-23 (banda 560pb) del gen *RB1*.

#### MUTACIONES

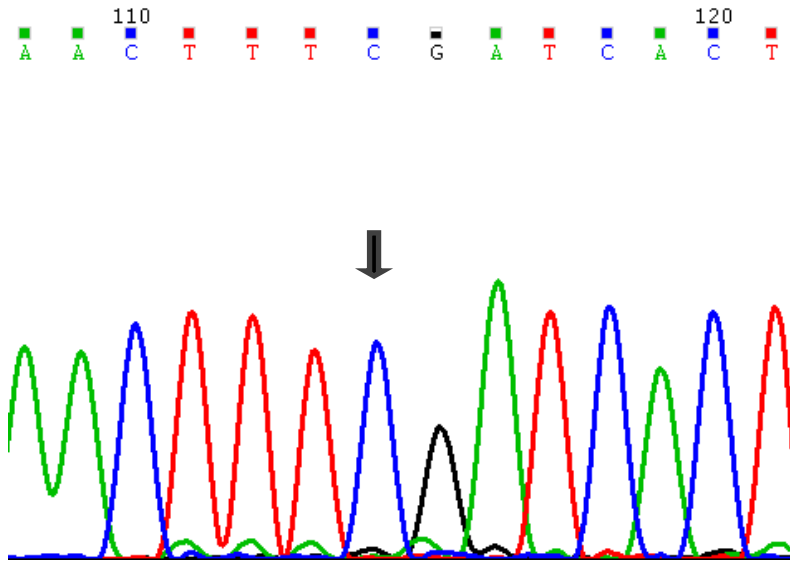
PX	LOCALIZACIÓN	DNA	PÉPTIDO	TIPO
RB01	Exón 17	c.1597 G>T	E533X	Sin sentido
RB03	Exón 20	c.1981 C>T	R661W	Sentido equivocado

**Tabla 2.-** Se muestra la localización y tipo de cambio de las mutaciones encontradas

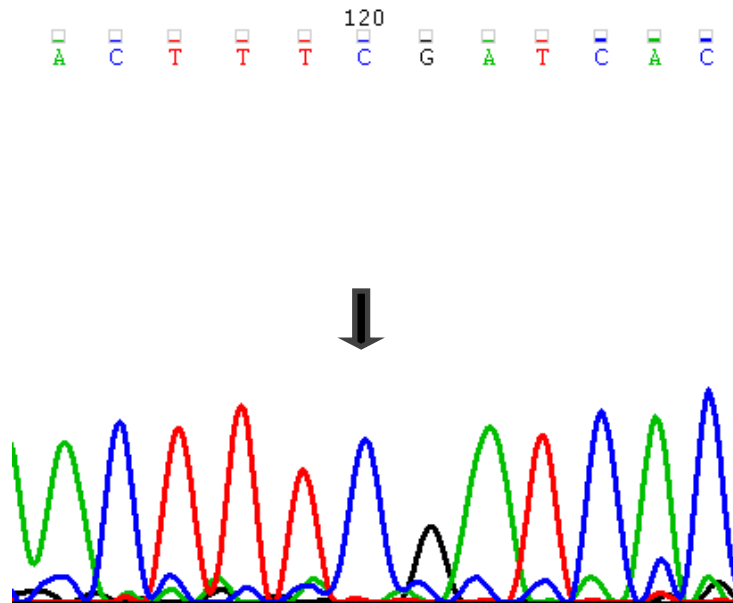
Se realizó la búsqueda de estas mutaciones en el DNA de ambos padres del paciente RB01 (Figura 5 y 6) en DNA de la madre del paciente RB03 (Figura 8) y no se identificaron tales variantes, lo que indica que se trata de mutaciones *de novo*.



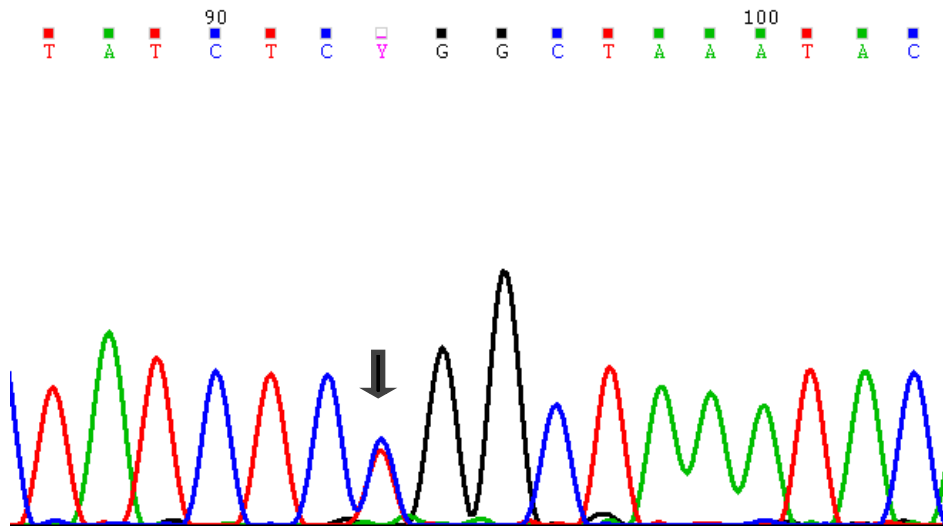
**Figura 4.-** Secuencia nucleotídica parcial del exón 17 del gen RB1 en DNA del paciente RB01. La flecha muestra el cambio heterocigoto c.1597 G>T que origina el cambio de un codón GAA (Glu) a TAA (stop) en la posición 533. Se muestra la secuencia antisentido.



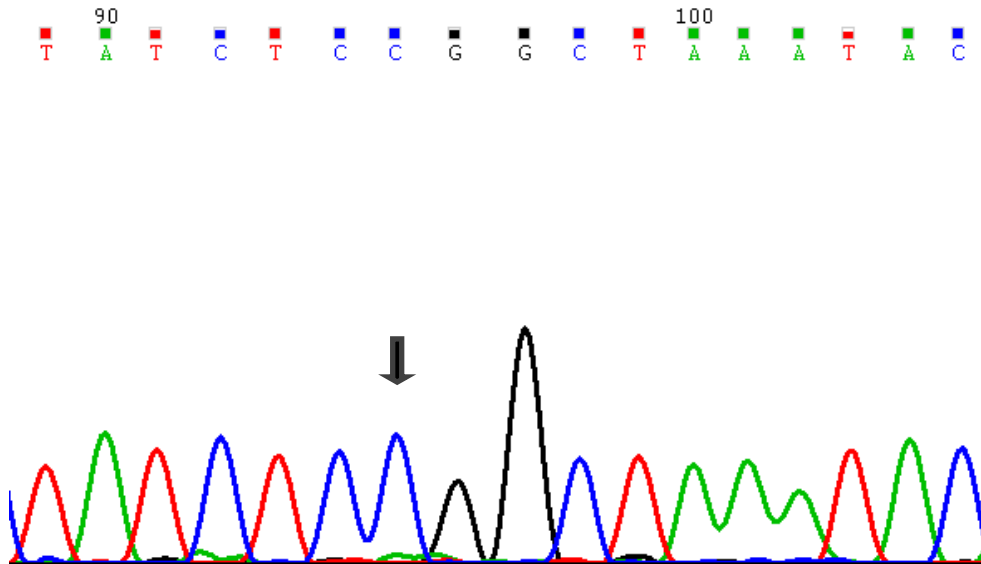
**Figura 5.-** Secuencia nucleotídica parcial del exón 17 del gen RB1 en DNA de la madre del paciente RB01. La flecha señala el nucleótido c.1597 normal. Se muestra la secuencia antisentido.



**Figura 6.-** Secuencia nucleotídica parcial del exón 17 del gen RB1 en DNA del padre del paciente RB01. La flecha señala el nucleótido c.1597 normal. Se muestra la secuencia antisentido



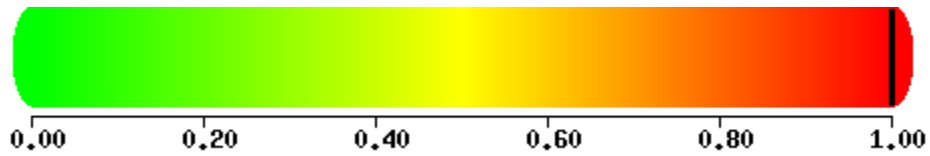
**Figura 7.-** Secuencia nucleotídica parcial del exón 20 del gen RB1 en DNA del paciente RB03. La flecha muestra el cambio heterocigoto c.1981 C>T que origina el cambio de un codón CGG (Arg) a TGG (Trp) en la posición 661.



**Figura 8.-** Secuencia nucleotídica parcial del exón 20 del gen RB1 en DNA de la madre del paciente RB03. La flecha señala el nucleótido c.1981 normal.

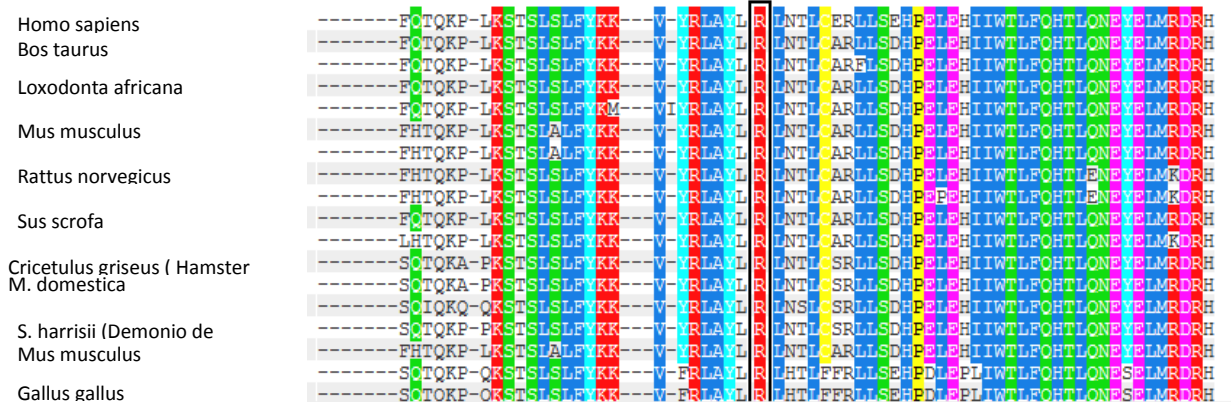
### 7.1.2.- Análisis in Silico de la Mutación R661W

Aunque la mutación R661W ya ha sido descrita previamente en RB, se realizó el análisis *in silico* de su patogenicidad, mediante el programa Polyphen. Esta mutación se considera probablemente dañina con un score de 1.000 (sensibilidad: 0.00; especificidad: 1.00) (Figura 9).



**Figura 9.-** Análisis por *Polyphen* de la patogenicidad de la mutación R661W. La barra negra localizada en el 1.00 (color rojo) indica la patogenicidad de la mutación, siendo más dañina mientras más alejada del 0.00 (color verde) se encuentre

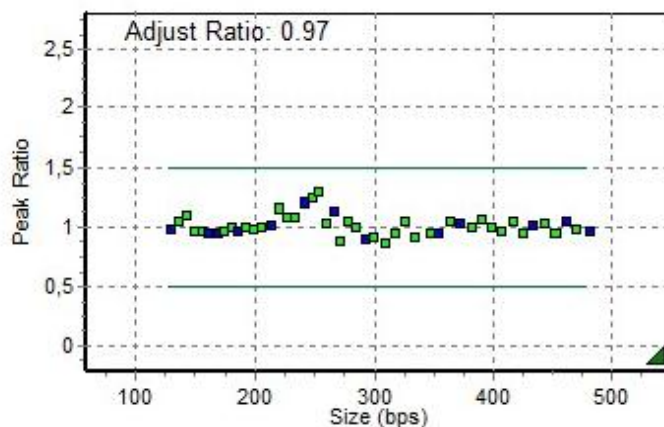
### Conservación entre especies del residuo Arginina (R) 661 de *RB1*



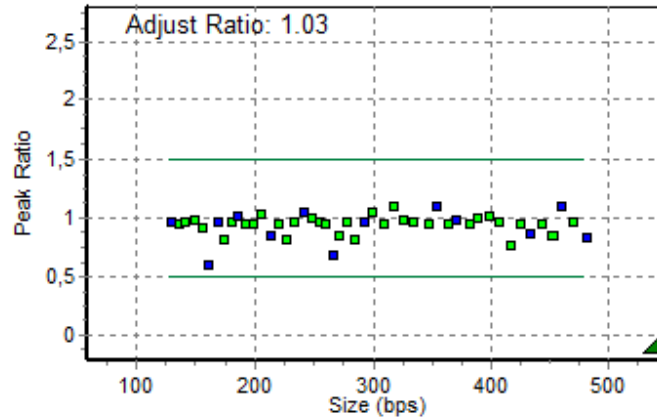
**Figura 10.-** Conservación de la arginina 661 en *RB1* entre diferentes especies utilizando el programa Polyphen

## 7.2.- ANÁLISIS DE MLPA

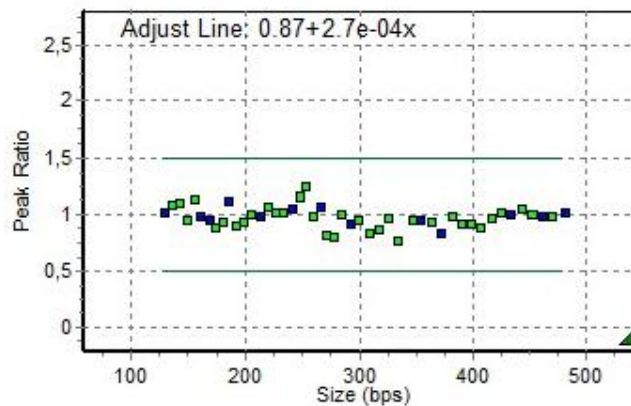
El análisis de número de copias de *RB1* se realizó mediante la técnica MLPA y se analizó con el software GeneMarker V.2.2.0 de Softgenetics. Únicamente fue posible realizar el estudio en 13 de 18 pacientes y en ninguno de éstos se identificaron alteraciones en el número de copias. (Figuras 11 a 13). En los 5 pacientes en los que no fue posible realizar el estudio se debió a muestra de DNA insuficiente (50ng) y al alto contenido de sales de la misma.



**Figura 11.-** Resultado de análisis de MLPA en DNA del paciente RB07. No se observan ganancias ni pérdidas de material, representadas por cuadros verdes (sondas *RB1*) y cuadros azules (sondas control). Obsérvese que el margen entre 0.5 y 1.5 representa el punto de corte para determinar el número de copias alélicas, debajo de 0.5 indica delección heterocigota y por encima de 1.5 duplicación heterocigota.



**Figura 12.-** Resultado de análisis de MLPA en DNA del paciente RB14. No se observan ganancias ni pérdidas de material, representadas por cuadros verdes (sondas *RB1*) y cuadros azules (sondas control). Obsérvese que el margen entre 0.5 y 1.5 representa el punto de corte para determinar el número de copias alélicas, debajo de 0.5 indica delección heterocigota y por encima de 1.5 duplicación heterocigota.



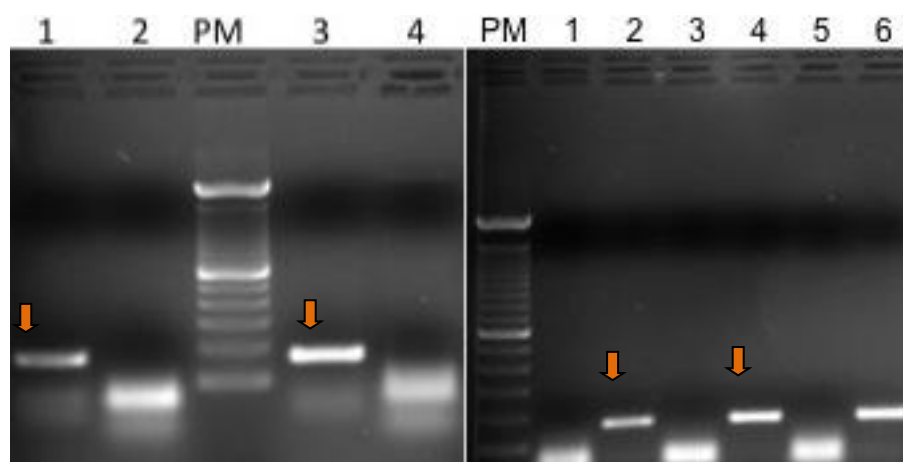
**Figura 13.-** Resultado de análisis de MLPA en DNA del paciente RB18. No se observan ganancias ni pérdidas de material, representadas por cuadros verdes (sondas *RB1*) y cuadros azules (sondas control). Obsérvese que el margen entre 0.5 y 1.5 representa el punto de corte para determinar el número de copias alélicas, debajo de 0.5 indica delección heterocigota y por encima de 1.5 duplicación heterocigota.



### 7.3.- ANALISIS DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *RB1*

El análisis de metilación del promotor del gen *RB1* se realizó en DNA previamente tratado con bisulfito y con oligonucleótidos específicos diseñados para diferenciar alelos metilados de alelos no metilados, de acuerdo a la técnica descrita previamente (Simpson et al 2000)<sup>35,60</sup> obteniéndose una banda de 172pb.

El análisis de metilación del promotor se realizó en los 18 pacientes en los que no se encontró mutación mediante secuenciación nucleotídica directa. En el 100% de los casos el alelo identificado correspondió a un estado no metilado, lo que predice una expresión normal de *RB1*. (Figura 14).

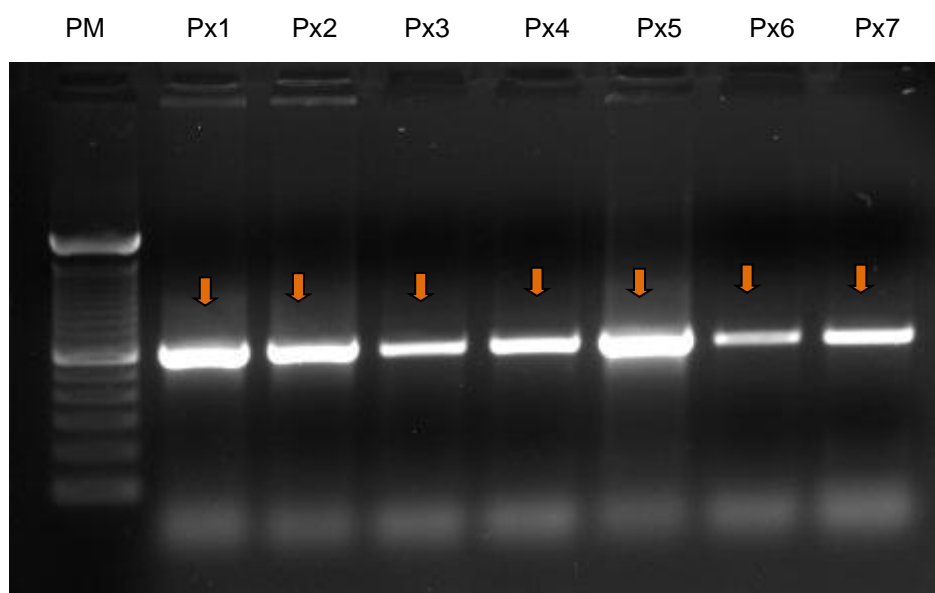


**Figura 14.-** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio de los productos de PCR. En la imagen izquierda se observa una banda de 172pb que corresponde al alelo no metilado del gen *RB1* (carriles impares). En los carriles pares se observa ausencia de la banda de 172pb en las reacciones de PCR con los primers específicos para alelo metilado. En la imagen derecha se observa una banda de 172pb que corresponde al alelo no metilado del gen *RB1* (carriles pares). En los carriles impares se observa ausencia de banda de 172pb en las reacciones de PCR con los primers específicos para alelo metilado.

#### 7.4.- SECUENCIACION DEL PROMOTOR DEL GEN *RB1*

La secuenciación del promotor de los 18 pacientes en los que no se encontró alteración por los métodos previamente descritos incluyó una región de 494pb que abarca la región basal del promotor comprendida entre -179pb a -208pb.<sup>55</sup> (Figura 15).

La secuenciación nucleotídica de este fragmento en DNA de 18 pacientes no identificó ningún cambio que pudiera alterar la función del gen *RB1*.



**Figura 15.-** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio de los productos de PCR para amplificar el promotor de *RB1*. En cada carril se observa un producto normal de amplificación de 589 pb que incluye a la región promotora de *RB1*.

## 8.- DISCUSIÓN

El RB es el tumor intraocular más frecuente de la niñez y afecta a 1 de cada 17,000 nacidos vivos. En México este tumor ocupa el segundo lugar dentro de las neoplasias sólidas en edad pediátrica. El RB se puede presentar esporádicamente (60% de los casos) o bien puede ser hereditario (40% de los casos), afectando a uno o a ambos ojos. De los casos hereditarios solo el 25% tienen antecedentes familiares y los demás corresponden a mutaciones de novo. Los casos esporádicos generalmente son unilaterales y unifocales, sin embargo hasta el 28% de esta clase de tumores tienen un componente hereditario.<sup>9,14,30-32</sup> La edad media de diagnóstico reportada para los casos de RB unilateral no familiar son 24.8 meses mientras que para el bilateral son 12.5 meses. Sin embargo en las mutaciones en sitios de splicing la edad media de diagnóstico en ambos casos es casi indistinguible lo que sugiere que este tipo de mutaciones se pueden asociar a un fenotipo de inicio tardío.<sup>36</sup>

En los últimos años se ha reconocido que hasta más de 20% de los casos unilaterales pueden deberse a una mutación germinal y por lo tanto tienen un riesgo muy elevado de transmitirse a la descendencia, sin embargo, se estima que este porcentaje puede variar entre distintas poblaciones e incluso existen reportes que alcanzan hasta el 28%.<sup>30</sup>

La presencia de mutaciones germinales en RB1 confiere un incremento en el riesgo de desarrollo de un segundo tumor primario con una incidencia acumulativa de 22% a la edad de 25 años. La mayoría de estos segundos tumores son osteosarcomas (37%), otros sarcomas (16.8%), melanomas (7.4%), tumores cerebrales (4.5%), leucemia (2.4%) y linfoma no Hodgkin (1.6%).<sup>36</sup>

A pesar de que el RB es la segunda neoplasia sólida más frecuente en nuestro país, no se han realizado estudios en pacientes mexicanos que incluyan un análisis molecular completo del gen *RB1*.

La edad media de diagnóstico en nuestros pacientes (26.3 meses) fue mayor que en reportes previos<sup>36</sup>, lo que minimiza la posibilidad de inclusión de casos unilaterales que desarrollaran después un tumor contralateral.

Los reportes previos indican que en algunas poblaciones el porcentaje de mutaciones germinales en casos de RB unilateral no familiar alcanzan hasta el 28.6% de los casos. En nuestro estudio, solamente el 10% de los pacientes con RB unilateral no familiar presentaron mutación germinal, cifra que coincide con el estudio realizado en población mexicana por Rodríguez Maricela et al. publicado en 2002.

Este es el primer estudio en población mexicana en el que se utilizan diversas pruebas de diagnóstico molecular para la búsqueda de mutaciones germinales en RB unilateral no familiar. De las mutaciones identificadas, el cambio c1597 G>T en el exón 17 es una mutación sin sentido que genera un codón de paro prematuro en el aminoácido 533 (E533X), este cambio produce una proteína truncada con función nula para el alelo afectado por lo que se puede considerar como una mutación patogénica. Por otro lado, la transición C>T en el codón 661 del exón 20 (R661W) convierte una arginina (CGG) en triptófano (TGG), alteración de sentido equivocado que se ha asociado con una disminución en la actividad de la proteína, disminuyendo in vitro su unión a E2F. Este cambio presenta un alta recurrencia en las diferentes poblaciones, a diferencia del cambio encontrado en el exón 17 el cual a pesar de caer en un *hot spot* no se considera de alta recurrencia.

Diversos estudios indican que las secuencias CpG son regiones hipermetiladas susceptibles a mutaciones, debido a la desaminación de las citosinas metiladas que se traducen en cambios de citosina a timina (C→T). Estas transiciones pueden conducir a la formación de codones UGA (codón de terminación) y dar como resultado la terminación prematura de la síntesis de la proteína.

Se considera que la hiper mutabilidad de los codones CGA en aquellos exones con alta recurrencia mutacional depende del estado de metilación de los dinucleótidos CpG y la desaminación espontánea de la 5 metil citosina a timina, lo que puede explicar la alta recurrencia de la mutación R661W.<sup>61</sup>

Llama la atención que aunque en los estudios previos en población mexicana se reportan mutaciones en los exones 17 y 20 ninguna de ellas coincide con las reportadas en nuestro estudio. Esto puede explicarse debido a la gran variedad de mutaciones en *RB1* y a que nuestro tamaño de muestra es pequeño.

Cabe mencionar que la mayoría de las mutaciones reportadas previamente en nuestra población son de casos de RB bilateral o con antecedente familiar y en los casos unilaterales no familiares la identificación de estas mutaciones se llevo a cabo en tejido de tumor y no en sangre periférica por lo que no pueden ser consideradas mutaciones constitutivas y por lo tanto no implican un riesgo de transmisión hereditaria. A nuestro conocimiento, unicamente se ha identificado una mutación germinal en un paciente mexicano con RB unilateral no familiar.<sup>43</sup>

De acuerdo a un meta-análisis publicado en 2005, las alteraciones moleculares en RB unilateral o bilateral en conjunto sin tomar en cuenta las mutaciones sin sentido o de

sentido equivocado, son mutaciones de splicing en 20.8%, Ins/del en 27.3% y reguladoras en 0.7%.<sup>36</sup>

A diferencia de los estudios realizados en el resto del mundo en los cuales se reportan porcentajes elevados de mutaciones en el número de copias, alteraciones del gen *RB1*, en el promotor y en el estado de metilación del mismo<sup>28,34-36,62-63</sup> en nuestro estudio el resto de las técnicas empleadas para la identificación de alteraciones moleculares en nuestra población no identificaron otro tipo de mutación germinal diferentes a las mutaciones puntuales previamente comentadas. Esto nos permite proponer que en nuestros pacientes las principales alteraciones moleculares en *RB1* son mutaciones puntuales de sentido equivocado y sin sentido que pueden ser identificadas mediante técnicas de secuenciación nucleotídica directa; y de esta forma establecer el algoritmo diagnóstico molecular en nuestra población para descartar mutaciones en estos pacientes. A pesar de que fue posible amplificar el exón 15 y obtener una banda del tamaño esperado, no fue posible realizar la secuenciación del exón 15 del gen *RB1*, debido a problemas técnicos. Esto permitiría descartar posibles inserciones o deleciones en tal exón, pero no podemos descartar mutaciones puntuales

El análisis de número de copias mediante MLPA no se pudo realizar en 7 de 18 pacientes debido muestra de DNA insuficiente y a la incapacidad para localizar a los pacientes para una nueva toma. Cabe mencionar que en estos pacientes se realizó un par de ocasiones el análisis mediante MLPA sin obtener resultados satisfactorios en ninguno de ellos; posiblemente por la poca cantidad o calidad del DNA con la que se disponía de dichos pacientes (50ng), así como la concentración de sales en el mismo, lo que no permitió la adecuada hibridación de las sondas y los pasos siguientes de la técnica.

El diagnóstico molecular de las mutaciones germinales en pacientes con RB así como la determinación de estado de portador asintomático en los familiares son de gran importancia para el manejo clínico ya que permite excluir de las revisiones oftalmológicas a los individuos no portadores o bien incluir a los portadores asintomáticos. Esto es de gran interés ya que las revisiones se realizan durante muchos años y bajo anestesia general en los primeros 4-5 años de vida.

Otra ventaja de identificar a los portadores de mutaciones germinales es que se puede ofrecer un consejo genético personalizado e inequívoco basado en porcentajes calculados a partir de datos genéticos como lo son el tipo de herencia, la penetrancia y datos clínicos (uni o bilateralidad) y no solamente en el conocimiento empírico.<sup>32</sup>

El uso de las diferentes técnicas utilizadas en el presente trabajo permite descartar en conjunto más del 95% de las alteraciones en el gen *RB1* causantes de RB, incluyendo las más frecuentes.<sup>10,12,27</sup> Por lo que podemos concluir que en nuestra población de estudio los casos de RB unilateral no familiar que presentan mutación germinal tienen un riesgo del 50% de heredar el alelo mutado a su descendencia y un 45% de riesgo que ésta desarrolle RB tomando en cuenta la penetrancia del 90%, así como un riesgo mayor de desarrollar tumor contralateral y neoplasias secundarias.

Por otro lado, los pacientes en quienes fue posible realizar todas las técnicas de diagnóstico molecular y en quienes no se encontró ninguna alteración, tienen un riesgo aproximado del 8% de tener hijos con RB, mientras que sus padres y hermanos tienen un riesgo del 1% de tener hijos afectados; sin embargo, en los casos en los que no fue posible realizar todas las técnicas moleculares no podemos considerar tal porcentaje

debido a la posibilidad de una alteración no detectada en el número de copias del gen *RB1*.

Para concluir, la importancia de realizar el estudio molecular para identificar mutaciones en el gen *RB1* radica en el impacto positivo que tiene en el asesoramiento genético, así como en la disminución del costo de atención para el paciente y el sistema de salud y en la disminución de los riesgos implicados en el manejo subsecuente tanto de afectados como de familiares. Este es el primer estudio en población mexicana en el que se utilizan diversas pruebas de diagnóstico molecular para la búsqueda de mutaciones germinales y las cuales nos permiten descartar un amplio porcentaje de alteraciones en el gen *RB1*, sin embargo es muy importante completar las pruebas en los pacientes en los que no fue posible realizarlas para poder ofrecerles un manejo médico y asesoramiento genético adecuado y confiable.



## 9.- ASPECTOS ÉTICOS

Este protocolo de estudio se apega a las normas establecidas por el Comité Científico y de Ética del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”, nacionales e internacionales. Se realizó, registró y reportó en cumplimiento de los principios de las buenas prácticas clínicas (BPC). El consentimiento informado y su proceso cumplieron con leyes y regulaciones aplicables en México, D.F. Los pacientes otorgaron su consentimiento para los estudios de DNA mediante la firma de una Carta de Información y Consentimiento el cual cumple con lo establecido por la Ley General de Salud en sus Capítulos 21 y 22 (anexo 1).

De acuerdo a la ley general de salud en su título segundo capítulo 17 apartado segundo, nuestro estudio se considera un investigación con riesgo mínimo: estudios que emplean el riesgo de datos a través de procedimientos comunes en exámenes físicos o psicológicos de diagnósticos o tratamiento rutinarios, entre los que se consideran: pesar al sujeto, pruebas de agudeza auditiva; electrocardiograma, termografía, colección de excretas y secreciones externas, obtención de placenta durante el parto, colección de líquido amniótico al romperse las membranas, obtención de saliva, dientes deciduales y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, placa dental y cálculos removidos por procedimiento profilácticos no invasores, corte de pelo y uñas sin causar desfiguración, extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 ml. en dos meses, excepto durante el embarazo, ejercicio moderado en voluntarios sanos, pruebas psicológicas a individuos o grupos en los que no se manipulará la conducta del sujeto, investigación con medicamentos de uso común, amplio margen terapéutico, autorizados para su venta, empleando las indicaciones, dosis y vías de administración establecidas y

que no sean los medicamentos de investigación que se definen en el artículo 65 de este Reglamento, entre otros.

## 10.- ANEXOS

### ANEXO 1

#### CARTA DE INFORMACION Y CONSENTIMIENTO

Yo \_\_\_\_\_, declaro libremente que acepto participar de manera voluntaria en el estudio **“Caracterización de mutaciones germinales del gen *RB1* en pacientes mexicanos con retinoblastoma unilateral no familiar”** que se realizará en el servicio de Genética del Instituto de Oftalmología Fundación “Conde de Valenciana” y que estará bajo la responsabilidad del Dr. Juan C. Zenteno Ruiz y del Dr. Arturo Flores Cuevas.

Se me ha explicado que se requiere de la toma de una muestra de mucosa oral o 2 mililitros de sangre venosa y que esta toma no representa ningún riesgo para mi salud más que la posible formación de un pequeño moretón en el área de la punción.

Se me ha asegurado que el material genético que se extraiga de mi muestra de sangre se utilizará exclusivamente para investigar las alteraciones genéticas que produjeron mi enfermedad retiniana y para identificar posibles riesgos de heredar la enfermedad.

También me ha sido señalado que puedo retirar mi consentimiento para participar en esta investigación en el momento en que yo lo desee y que esta decisión no afectaría la calidad de la atención que recibo por parte del personal de este hospital.

Finalmente manifiesto que se me han respondido satisfactoriamente todas mis dudas y que los médicos responsables han señalado su compromiso de aclarar las que pudieran surgir eventualmente.

Atentamente, \_\_\_\_\_ Nombre y firma

México, D.F., a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_

Dirección y teléfono \_\_\_\_\_

Atentamente, \_\_\_\_\_ Nombre y firma (Tutor)

México, D.F., a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_

Dirección y teléfono \_\_\_\_\_

Médico responsable \_\_\_\_\_ Nombre y firma

Teléfono del Médico responsable: 54421700 ext 3212

Teléfono del Servicio de Genética del Instituto: 54421700 ext 3212

Testigo 1 \_\_\_\_\_ Nombre y firma

Testigo 2 \_\_\_\_\_ Nombre y firma

**ANEXO 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR de los 27 exones del gen RB1 en el presente estudio.<sup>33</sup>**

No EXON	SECUENCIA	Tm (°C)
1F	CCGGTTTTTCTCAGGGGA	60.8
1R	TTGGCGCCCGCCCTACGCACA	62.8
2F	GTA CTGAATCAATTTGATT	43.1
2R	CCTCTGGGTATTGGAATTA	49.5
3F	CATAGTATCCAGTGTGTGA	49.5
3R	CCTTTTATGGCAGAGGCTTA	52.5
4F	AGTGATTTGATGTAGAGCTG	50.5
4R	CCAGAATCTAATTGTGAAC	47.4
5F	GCATGAGAAA ACTACTATGAC	51.3
5R	CCTAACTATCAAGATGTTTG	48.4
6F	TATGCATTTAACTAAGGTC	45.2
6R	TTAGTCCAAAGGAATGCCA	49.5
7F	TGGATATACTCTACCCTGCG	54.6
7R	AAGCAACTGCTGAATGAGA	48.5
8F	TATGATGGATGTACAATTG	45.2
8R	GA ACTTACATCTAAATCTAC	46.4
9F	GGATTGACACCTCTAACTTAC	53.2
9R	TCCTCCCTCCACAGTCTCAA	52.5
10F	TCTGTGTGCTGAGAGATGTA	50.8
10R	TATCAGTATCAACCTATATC	46.4
11F	GATGCATAAAGCACAAATTG	48.4
11R	CGTGAACAAATCTGAAACAC	50.5
12F	GGAATGTAGAGACAAGTGG	51.7
12R	GATTATGGATAACTACATG	45.2

13F	GTCATATATTATGGAGCAG	47.4
13R	ACGAACTGGAAAGATGCTGCT	55.2
14F	GTGATTTTCTAAAATAGCAGG	49.3
14R	TGCCTTGACCTCCTGATCTG	56.6
15-16F	CAATGCTGACACAAATAAGG	50.5
15-16R	GCATTCCTTCTCCTTAACCT	52.5
15R	TGTTGTCATTCAGAAGTTTGCT	52
17F	ATACCTAGCTCAAGGGTTA	49.5
17R	TGTTAGCCATATGCACATG	49.5
18F	CATAGTACTTACCATGTC	46.2
18R	CTATTTGCAGTTTGAATGGTC	51.3
19F	GGTGTACAACCTTGAAGTGT	52.5
19R	CCAGTCAGCCTAGTTTCAG	53.9
20F	GCTACTTAACAGCATTATA	45.2
20R	TCAGTTAACAAGTAAGTAGG	48.4
21F	TTGAGGCTAAAAGAAAGA	44
21R	GATCAAATGAATTACCTATG	46.4
22-23F	TGTGCTTCTTACCAGTACA	49.5
22-23R	GGATCAAATAATCCCCCT	49.5
22R	GAGGAATGTGAGGTATTGGTGA	55.8
24F	GGTATTCCTAATAGTTCAG	47.4
24R	CTATGCAATATGCCTGGATG	52.5
25-26F	CACCTCAAACCTATAACTTGA	48.4
25-26R	GCCAACTGAAGAAATTATAC	48.4
27F	CATGAGCATAATATATATGGC	49.3
27R	ATCCAGAGGTGTACACAGTG	54.6

### ANEXO 3

#### **POLYPHEN** (=Polymorphism Phenotyping)<sup>56-58</sup>

Es una herramienta que predice el posible impacto de un aminoácido sustituido en la estructura y función de una proteína humana. Esta predicción se basa en reglas sencillas empíricas que son aplicadas a la secuencia filogenética y la información estructural que caracteriza la sustitución.

La mayoría de las variaciones humanas están representadas por los SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*) y muchos de ellos son causantes de diferencias fenotípicas entre los humanos. Este programa se centra específicamente en SNPs no-sinónimos (*nsSNP*), por ejemplo SNPs localizados en regiones codificantes y resultan en la variación en los productos proteicos de genes. El impacto de esas variantes alélicas sobre la estructura/función proteica pueden ser predichas por el análisis del alineamiento de secuencias y estructuras proteicas tridimensionales que el programa ofrece.

PolyPhen predice que un nsSNP origina alguno de los siguientes cambios en la proteína:

- a) Probablemente dañada: apoya con alta confianza que la proteína está afectada en función o estructura.
- b) Posiblemente dañada: supone que la función o estructura de la proteína está dañada.
- c) Benigna: carece de cualquier efecto fenotípico.

Desconocida: cuando en algunas ocasiones raras, la carencia de datos no permite al programa hacer una predicción.

## REFERENCIAS

1. Orjuela M., Castañeda V.P., Ridaura C., et al. Presence of the human papiloma virus in tumor tissue from children with retinoblastoma: An alternative mechanism for tumor development. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4010-4016.
2. Schultz K.R., Ranade S., Neglia J.P., et al. An increased relative frequency of retinoblastoma at a rural regional referral hospital in Miraj, Maharashtra, India. *Cancer* 1993; 72: 282-286.
3. Stiller C.A. and Parkin D.M. Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer. *Br Med Bull* 1996; 52: 682-703.
4. Vogel F. Genetics of retinoblastoma. *Hum Genet.* 1979; 52 : 1-54.
5. den Dunnen JT, White SJ. MLPA and MAPH: sensitive detection of deletions and duplications. *Curr Protoc Hum Genet*, 2006 Nov; Chapter 7: Unit 7.14.
6. Lohmann D, Scheffer H, Gallie B. Best Practice Guidelines for Molecular Analysis of Retinoblastoma. <http://www.emqn.org/guidelines/rb.php> (diciembre, 2002).
7. Leal-Leal C., Flores-Rojo M., Medina-Sansón A., et al. A multicenter report from the Mexican Retinoblastoma Group. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 1074-1077.
8. Abouzeid H, Munier F, Thonney F, Schorderet D. Ten novel *RB1* gene mutations in patients with retinoblastoma. *Mol. Vis* 2007; 13: 1740-1745.
9. Bamne M, Ghule P, Jose J, Banavali S, Kurkure P, Amare P. Constitutional and Somatic RB1 Mutation Spectrum in Nonfamilial Unilateral and Bilateral Retinoblastoma in India. *Genet Test* 2005; 9(3): 200-211.
10. Lohmann D, Gallie B. Retinoblastoma. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=retinoblastoma> (mayo, 2007).
11. Biju J, Jagadeesan M, Gandra M, Vedam R, Lingam G, Govindasamy K. Retinoblastoma: A Diagnostic Model for India. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2006; 7: 465-68.
12. Lohmann D, Gallie B. Retinoblastoma. *Encyclopedia of Life Sciences.* 2005; 1-4
13. Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, Childs B, Kinzler K et al. Retinoblastoma en *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease.* McGraw-Hill. 8a ed. 2001; 819-48.
14. Villanueva C, *Genética y Cancer en Genética y Oftalmología.* Composición Editorial Laser. 1a ed. 2000; 255-60.
15. Joseph B and Kumaramanickavel G. "Insight" into Molecular Genetic Testing in Retinoblastoma. *Int J Hum Genet* 2007; 7(1): 23-8.



16. Bowles E, Corson T.W., Bayani J, Squire JA, Wong N, Lai PB., et al. Profiling genomic copy number changes in retinoblastoma beyond loss of RB1. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; 46: 118-29.
17. Corson TW, Gallie BL. One hit, two hits, three hits, more? Genomic changes in the development of retinoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; 46: 617-34.
18. Hong FD, Huang HJ, To H, Young LJ, Oro A, Bookstein R, et al. Structure of the human retinoblastoma gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5502-6.
19. Bellan C, De Falco G, Tosi GM, et al. Missing expression of pRb2/p130 in human retinoblastomas is associated with reduced apoptosis and lesser differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43: 3602-3608.
20. Nichols K, Walther S, Chao E, Shields C, Ganguly A. Recent advances in retinoblastoma genetic research. *Curr Op Ophtal* 2009; 20: 351-355.
21. Priya K, Jada SR, Quah BL, et al. High incidence of allelic loss at 16q12.2 region spanning RBL2/p130 gene in retinoblastoma. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 714-717.
22. Amare Kdam PS, Ghule P, Jose J, Bamne M, Kurkure P, Banavali S, et al. Constitutional genomic instability chromosome aberrations in tumor cells and retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 150: 33-43.
23. Knudson AG. Hereditary cancer: Two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122: 135-40.
24. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 157-62.
25. Bellan C, De Falco G, Tosi GM, et al. Missing expression of pRb2/p130 in human retinoblastomas is associated with reduced apoptosis and lesser differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:3602-3608 24
26. Onadim Z, Hogg A, Baird P.N and Cowell K.J., Oncogenic point mutations in exon 20 of the RB1 gene in families showing incomplete penetrance and mild expression of the retinoblastoma phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; Vol. 89: 6177-6181.
27. Govindasamy K, Biju J, Komaravelly N, Sribhargava N, et al. Molecular-genetic analysis of two cases with retinoblastoma: benefits for disease management. *J. Genet* 2003; 82: 39-44.
28. Zeschnigk M, Lohmann D, Horsthemke B. A PCR test for the detection of hypermethylated alleles at the retinoblastoma locus. *J Med Genet* 1999; 36: 793-4.
29. Knudson A.G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-823.
30. Ahani A., Behnam B., Reza H., et al. *RB1* gene mutations in Iranian patients with retinoblastoma: report of four novel mutations. *Can Genet* 2011; 204: 316-322.

31. Carlson E.A., Letson R.D., Ramsay N.K.C., et al. Factors for improved genetic counseling for retinoblastoma based on a survey of 55 families. *Am J Ophthalmol* 1979; 87: 449-459.
32. Martín N., Coll M.D., García Arumi J., et al. Retinoblastoma *Annals d'Oftalmologia* 2001; 9(2): 74-92.
33. Brichard B, Heusterspreute M, De Potter P, Chantrain C, et al. Unilateral retinoblastoma, lack of familial history and older age does not exclude germline RB1 gene mutation. *Eur J Can* 2006; 42: 65-72.
34. Choy KW, Pang CP, Yu CBO., et al Loss of Heterozygosity and Mutations Are the Major Mechanisms of *RB1* Gene Inactivation in Chinese With Sporadic Retinoblastoma. *Hum Mut* 2002; 20(5): 408.
35. Biju J, Jagadeesan M, Gandra M, Gayathree R, Mahesh PS, Govindasamy K. Methylation Status of RB1 Promoter in Indian Retinoblastoma Patients. *Can Biol Ther* 2004; 3(2): 184-7.
36. Valverde J.R., Alonso J., Palacios I., Pestaña A. *RB1* gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database. *BMC genetics* 2005; 6(53): 1-9.
37. Kontic M., Palacios I., Gámez A., et al. New *RB1* oncogenic mutations and intronic polymorphisms in Serbian retinoblastoma patients: genetic counseling implications. *J Hum Genet* 2006; 51: 909-913.
38. Macías M., Dean M., Atkinson A., et al. Spectrum of *RB1* gene mutations and loss of heterozygosity in Mexican patients with retinoblastoma: Identification of six novel mutations. *Can Bio* 2008; 4: 93-99.
39. Rushlow D., Piovesan B., Zhang K., et al. Detection of Mosaic *RB1* Mutations in Families with Retinoblastoma. *Hum Mut* 2009; 30(5): 842-851.
40. Vidya L.P., Kannabiran C., Honavar S., et al. A comprehensive, sensitive and economical approach for the detection of mutations in the *RB1* gene in retinoblastoma. *J Genet* 2009; 88(4): 517-527.
41. Abidi O., Knari S., Sefri H., et al. Mutational analysis of the *RB1* gene in Moroccan patients with retinoblastoma. *Mol Vis* 2011; 17: 3541-3547.
42. Dhar S., Chintagumpalla M., Noll C., et al. Outcomes of Integrating Genetics in Management of Patients with Retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2011; 129: 1428-1433.
43. Rodríguez M., Salcedo., González M., et al. Identification of novel mutations in the *RB1* gene in Mexican patients with retinoblastoma. *Can Gen & Cytogen* 2002; 138: 27-31.
44. Cohen J, Dryja T, Davis K, Diller L, Li F. *RB1* Genetic Testing as a Clinical Service: A Follow-up Study. *Med Pediatr Oncol* 2001; 37: 372-78.
45. Balmer A, Zografos L, Munier F. Diagnosis and current management of retinoblastoma. *Oncogene* 2006; 25: 5341-9.

46. Williams W, Strong L. Genetic epidemiology of soft tissue sarcomas in children, in Muller H, Weber W (eds): Familial Cancer. 1st International Research Conference on Familial Cancer. Basel, Darger 1985: 151.
47. Binder P. Unusual manifestations of retinoblastoma. Am J Ophthalmol 1974; 77(5): 674.
48. Richards W. Retinoblastoma simulating uveitis. Am J Ophthalmol 1968; 65(3): 427.
49. Matsunaga E, Minoda K, Sasaki M. S. Parental age and seasonal variation in the births of children with sporadic retinoblastoma: a mutation-epidemiologic study. Hum. Genet 1990; 84: 155-8.
50. Butros LJ, Abramson DH, Dunkel IJ, Delayed diagnosis of retinoblastoma: analysis of degree, cause, and potential consequences. Pediatrics 2002; 109(3): E45. <http://pediatrics.aappublications.org/content/109/3/e45.long>. Accessed July 26, 2011.
51. Honavar SG. Emerging options in the management of advanced intraocular retinoblastoma. Br J Ophthalmol. 2009; 93(7): 848-849.
52. Gombos DS, Hungerford J, Abramson DH, et al. Secondary acute myelogenous leukemia in patients with retinoblastoma: is chemotherapy a factor? Ophthalmology. 2007; 114(7): 1378-1383.
53. Dhar SU, Chintagumpala M, Noll C, Chévez-Barrios P, Paysse EA, Plon SE. Outcomes of Integrating Genetics in Management of Patients With Retinoblastoma. Archh Ophthalmol. 2001; 129(11): 1428-1434.
54. Kivelä T. The epidemiological challenge of the most frequent eye cancer: retinoblastoma, an issue of birth and death. Br J Ophthalmol. 2009; 93(9): 1129-1131.
55. Montgomery Gill R., Hamel P.A., Jiang Z., et al. Characterization of the Human *RB1* Promoter and of Elements Involved in Transcriptional Regulation. Cell Growth & Differentiation 1994; 5: 467-474.
56. Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. Nucleic Acids Res 2002; 30: 3894-900.
57. Sunyaev S, Ramensky V, Bork P. Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms. Trends Genet 2000; 16: 198-200.
58. Sunyaev S, Ramensky V, Koch I, Lathe III W, Kondrashov AS, Bork P. Prediction of deleterious human alleles. Hum Mol Genet 2001; 10: 591-597.
59. Zhang Q, Minoda K. Detection of RB germline mutations using exon-by-exon heteroduplex analysis compared with SSCP. Yan Ke Xue Bao. 1996; 12(3): 151-157.
60. Simpson DJ, Hibberts NA, McNicol AM, Clayton RN, Farrell WE. Loss of pRb expression in pituitary adenomas is associated with methylation of the RB1 CpG island. Cancer Res. 2000; 60: 1211-1216.

61. Mancini D, Sing S, Ainsworth P, Rodenhiser. Constitutively methylated CpG dinucleotides as mutation hot spot in the retinoblastoma gene (RB1). *Am J Hum Genet.* 1997; 61: 80-7.
62. Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP. Allele-specific hypermethylation of the Retinoblastoma tumour suppressor gene. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 880-8.
63. Lohmann DR, Gerick M, Brandt B, Oelschlager U., et al. Constitutional RB1 mutations in patients with isolated unilateral retinoblastoma. *Am J Hum Genet.* 1997; 61: 282-94.