



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**METILACIÓN GERMINAL DEL PROMOTOR DEL GEN *RB1*
COMO MECANISMO DE SUSCEPTIBILIDAD EN FAMILIAS
CON AGREGACIÓN NEOPLÁSICA**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias.

PRESENTA:

M. en C. María Guadalupe Quiñonez Silva.

DIRECTOR DE TESIS

DR. LUIS BENÍTEZ BRIBIESCA
Instituto Mexicano del Seguro Social.

COMITÉ TUTORAL

Dra. Patricia Ostrosky Shejet
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Dr. Félix Recillas Targa
Instituto de Fisiología Celular UNAM.

...

CD.MX.

JUNIO, 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México

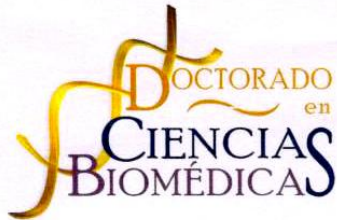


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
Oficio/Dictamen/RGG/05/2017.

C.P. AGUSTIN MERCADO
DIRECTOR DE CERTIFICACION Y CONTROL DOCUMENTAL, UNAM
Presente.

Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEPE el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión 404 del 22 de febrero del 2017, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de **MARÍA GUADALUPE QUIÑONEZ SILVA**, con número de cuenta **63097942** y número de expediente **49344** con la tesis titulada **"METILACIÓN GERMINAL DEL PROMOTOR DEL GEN RB COMO MECANISMO DE SUSCEPTIBILIDAD EN FAMILIAS CON AGREGACIÓN NEOPLÁSICA"**, dirigida por el Dr. Luis Benitez Bribiesca †.

PRESIDENTE: DR. FABIO SALAMANCA GÓMEZ
SECRETARIO: DR. FELIX RECILLAS TARGA
VOCAL: DR. DAVID ROMERO CAMARENA
VOCAL: DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCA
VOCAL: DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA

Atentamente

"Por mi raza hablará el espíritu"

Ciudad Universitaria, Cd. de Mx., a 01 de marzo de 2017.

DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN
RESPONSABLE
FACULTAD DE MEDICINA

DRA. AUREA OROZCO RIVAS
COORDINADORA DEL PROGRAMA

C.c.p. Dr. Jorge Ramón Morales Pineda, Coordinador de la Unidad de Administración Escolar del Posgrado, UNAM
Tutor (a) Dr. (a) Luis Benitez Bribiesca.
Coordinación de PDCB
AOR/RGG/evb

Unidad de Posgrado Coordinación del Posgrado en Ciencias Biomédicas Edificio B, 1er. Piso Circuito de Posgrados Cd. Universitaria Delegación Coyoacán C.P. 04510 México, D.F. Tel: 5623 0222 Ext. 37001
<http://www.pdcab.unam.mx> E-mail: pdcab@unam.mx

Este trabajo de investigación consta de dos partes. La primera, corresponde a un estudio de genética epidemiológica que se realizó en pacientes de la consulta de primera vez del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional SXXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS.

La segunda parte consiste en un estudio experimental que se realizó en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM y en el Laboratorio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.

La investigación se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT (*Grant* No 31168-M), de la Coordinación de Investigación en Salud (FOFOI:FP-2001/236), del Instituto Mexicano del Seguro Social y de La Dirección General del Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado (PAEP 202326

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad de Alta Especialidad Médica (UMAE), Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano de Seguro Social por las facilidades otorgadas en el aspecto clínico para llevar a cabo este trabajo.

Al laboratorio de Patología Molecular y Celular del Cáncer de la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas en donde las constantes observaciones, cuestionamientos y correcciones, permitieron mejorar mi trabajo.

Al Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM que me permitió conocer ese fascinante mundo molecular de la genética y a desarrollar un pensamiento crítico y reflexivo con sus estimulantes seminarios.

Al Laboratorio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas donde aprendí el rigor del estricto trabajo del cultivo celular, y la importancia de un cuidado “amoroso” de las células para obtener las tan deseadas cosechas.

Al Departamento de secuenciación de la UNAM.

A la Unidad de Investigación en Genética Humana de la UMAE Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional SXXI, IMSS.

A la Biblioteca de las (UMAE) Hospitales de Oncología y Pediatría del Centro Médico Nacional SXXI.

Agradezco muy especialmente a todas y cada una de las familias su amable colaboración, sin lo cual no hubiera sido posible realizar este trabajo.

A MIS QUERIDOS Y RESPETADOS TUTORES:

Dr. Luis Benítez Bribiesca,
Dra. Patricia Ostrosky Shejet,
Dr. Félix Recillas Targa

Su profundo espíritu inquisitivo, analítico, sintético; su gran entrega y disfrute en el trabajo científico, fue la constante durante todo este tiempo, gracias por este valioso e inigualable conocimiento; gracias por haber confiado durante tanto tiempo en “algo” casi perdido; pero sobre todo gracias, muchas gracias por su afecto, tesoro entrañable.

A MIS SINODALES DEL JURADO.

Dr. Fabio Salamanca Gómez. Presidente.
Dr. Félix Recillas Targa. Secretario.
Dr. Rafael Camacho Carranza. Vocal
Dr. David Romero Camarena. Vocal
Dr. Alejandro García Carranca. Vocal

Por todo su tiempo que dedicaron al magnífico análisis crítico a mi tesis, lo cual permitió mejorar su calidad en todos los aspectos.

A la memoria de mis padres

Por apoyar mis sueños, desde el corazón con gratitud por siempre.

A mi esposo Dr. Raúl Cicero, luminaria en cada momento de todo mi trabajo, con profundo afecto y agradecimiento.

A mi tesoro, mi hija Nichte por su estimulante y constante apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mercedes Dávalos Salas por su fundamental apoyo en el laboratorio, la infinita paciencia que me tuvo y el tiempo dedicado a discutir resultados y la amistad que logramos desarrollar-,

A la Dra. Ana Ma. Salazar por su ejemplar eficiencia y rigor en el trabajo de laboratorio, gracias además por su cálido trato.

A la Biol. Guadalupe Cádiz por su eficaz apoyo durante el proceso de secuenciación.

A la Dra. María del Rosario Pérez Molina por su valioso apoyo para concluir el análisis molecular.

A PhDc Pedro Meza por su valioso apoyo en la realización del análisis de microsatélites.

A la PhDc. Patricia Sánchez Suárez, gracias por todo su apoyo durante este prolongado trabajo, hasta llegar a la lectura crítica de la tesis; gracias por su crucial apoyo para ilustrar este trabajo.

A la Dra. Haydée Rosas Vargas por todas las facilidades recibidas para concluir esta tesis.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a la memoria de mis maestros:

Dr. Luis Benítez Bribiesca. Patología Celular y Molecular del Cáncer y

Dr. Rubén Lisker Y. Hematólogo y Genetista.

Estudiar la diversidad de alteraciones cromosómicas que muestran las células neoplásicas en los padecimientos mieloproliferativos malignos, llevó mi interés por el estudio de los padecimientos neoplásicos, gracias Dr. Lisker. Más tarde, el deseo de investigar éstas misteriosas e indestructibles células me condujo al experto en el campo del cáncer, el Dr. Benítez y... después retomar las leyes de la herencia para estudiar qué y cómo se pueden transmitir en generaciones estas alteraciones.

Gracias Maestros que me ubicaron en un panorama lleno de cuestionamientos a resolver y fueron el alma conductora de éste trabajo.

**METILACIÓN GERMINAL DEL PROMOTOR DEL GEN *RB1*
COMO MECANISMO DE SUSCEPTIBILIDAD EN FAMILIAS
CON AGREGACIÓN NEOPLÁSICA.**

CONTENIDO

PRIMERA PARTE TAMIZAJE CLÍNICO GENÉTICO-ONCOLÓGICO

	Página
• INDICE	1
• RELACION DE FIGURAS Y TABLAS	4
• JUSTIFICACIÓN	6
• RESUMEN	7
• ABSTRACT	8
I INTRODUCCIÓN	
1. Generalidades.	9
2. Genética y cáncer familiar.	10
3. Hipótesis de Knudson.	12
3.1 Retinoblastoma hereditario.	13
3.2 Retinoblastoma esporádico.	15
4. Criterios de discriminación de factores hereditarios en cáncer.	17
4.1 Características clínicas.	18
4.2 Características histopatológicas.	18
4.3 Patrón de herencia.	18
5. Criterios de alto riesgo: Clasificación a síndromes de susceptibilidad hereditaria.	19
II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
III HIPÓTESIS	21
IV OBJETIVOS	22
V RESULTADOS	22
1. Método de confirmación del diagnóstico de cáncer.	23
2. Frecuencia del antecedente de cáncer y de los criterios clínicos.	23
3. Frecuencia de síndromes de susceptibilidad hereditaria.	25
VI DISCUSIÓN	42
VII CONCLUSIONES	48
VIII PERPECTIVAS	49

CONTENIDO

SEGUNDA PARTE

IDENTIFICACIÓN DE METILACIÓN EN LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN *RB1*

	Página
I. INTRODUCCIÓN.	
1. Regulación epigenética.	50
2. Metilación del DNA.	53
2.1. En la fisiología normal.	53
2.2. La “quinta base” 5-metilcitosina y sus funciones.	53
2.3. Papel de la metilación del DNA en el control transcripcional.	56
2.4. Maquinaria de metilación del DNA.	62
2.5. Mantenimiento de la metilación.	63
2.6. Desmetilación del DNA.	66
3. Impronta genómica, reprogramación en las células germinales primordiales PGCs.	70
4. Reprogramación epigenética en el cigoto y en la preimplantación del embrión.	76
5. Epigenética del gen <i>RB1</i> humano en retinoblastoma.	79
5.1. Generalidades.	79
5.2. <i>RB1</i> es un gen improntado.	81
6. Genética del Locus del gen <i>RB1</i> humano.	85
6.1. Características moleculares.	85
6.2. Características clínicas del retinoblastoma, hipótesis de Knudson, patrón de herencia.	89
6.3. Tipo de mutaciones en el gen <i>RB1</i> y variación en la expresión fenotípica.	90
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	93
III. HIPÓTESIS	93
IV. OBJETIVOS	94
V. RESULTADOS	95
1. Clínicos: patrón de herencia en la familia RBF60.	95
2. Moleculares:	99

CONTENIDO

2.1. Patrones de metilación en DNA: en linfocitos de sangre periférica y en melanoma del probando.	99
2.2. Haplotipos de microsatélites polimórficos	107
VI. DISCUSIÓN	110
VII. CONCLUSIONES.	118
VIII. PERSPECTIVAS.	120
IX. CONCLUSION GENERAL	126
X. MATERIAL, PACIENTES Y MÉTODOS	127
Primera Parte	127
1. Tipo de estudio.	127
2. Población de estudio	127
3. Población de referencia.	127
4. Período de estudio y tamaño de la muestra.	127
5. Variables de estudio. Criterios de discriminación.	127
5.1 Antecedente de cáncer (ACA).	127
5.2 Agregación de neoplasias	128
5.3 Criterios clínicos (ET)	128
6. Análisis con criterios de alto riesgo específicos para clasificación a síndromes de susceptibilidad.	129
7. Descripción general del estudio.	129
8. Caso índice o probando.	130
9. Estudio genealógico.	130
10. Análisis estadístico.	131
Segunda Parte	
1. Análisis clínico: Familia portadora de retinoblastoma hereditario seleccionada en el estudio de "tamizaje" de genética-oncológica.	133
2. Análisis de metilación:	133
2.1 Obtención de ADN de linfocitos circulantes y de tumor en bloques de parafina	133
2.2 Técnica de conversión de ADN mediante bisulfito de sodio	134
2.3 PCR, oligonucleótidos para la amplificación de la región promotora del gen <i>RB1</i> , clonación del promotor; secuenciación del producto clonado.	134
3. Determinación de microsatélites polimórficos.	136
XI. REFERENCIAS	137
XII. ANEXOS.	
1. Hoja de consentimiento informado	149
2. Hoja de recolección de datos	150

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Figuras		Pagina
Figura 1.	Alteraciones involucradas en el mecanismo de susceptibilidad en el retinoblastoma hereditario.	14
Figura 2.	El segundo "Hit" en el Retinoblastoma hereditario.	15
Figura 3.	Mecanismo de las alteraciones que dan origen al Retinoblastoma esporádico.	16
Figura 4.	Resultados del tamizaje genético-oncológico.	28
Figura 5.	Cáncer hereditario: mama-ovario.	31
Figura 6.	Cáncer hereditario: mama-ovario.	32
Figura 7.	Cáncer hereditario: mama-ovario.	33
Figura 8.	Cáncer hereditario: mama y páncreas.	34
Figura 9.	Síndrome de Lynch.	35
Figura 10.	Cáncer familiar de testículo.	36
Figura 11.	Cáncer familiar de próstata.	37
Figura 12.	Cáncer hereditario mama-ovario?	38
Figura 13.	Cáncer hereditario: mama-ovario.	39
Figura 14.	Retinoblastoma unilateral.	40
Figura 15.	5-metilcitosina.	54
Figura 16.	Distribución de la metilación de los dinucleótidos CpG en el genoma de vertebrados.	55
Figura 17.	Tres categorías de promotores génicos y respuesta diferencial a metilación, de acuerdo a la densidad de CpG.	57
Figura 18.	Metilación en distintas regiones del genoma.	60
Figura 19.	Impronta genómica y expresión alelo específica.	61
Figura 20.	Metilación de la citosina en los dinucleótidos CpG.	62
Figura 21.	Mecanismos de mantenimiento de metilación del DNA.	65
Figura 22.	Mecanismos de metilación y desmetilación del DNA.	69
	A) Metilación y desmetilación pasiva.	69
	B) Mecanismo propuesto de desmetilación activa.	70
Figura 23.	Ondas de desmetilación en la línea germinal de ratón.	75
Figura 24.	Región 5' del gen <i>RB1</i> . Esquema que muestra la localización de las islas CpG (en verde: CpG 106, CpG 42 y CpG 85) en la región 5' del gen <i>RB1</i> .	83
Figura 25.	Modelo de "Ruta Bloqueada" de interferencia transcripcional.	84
Figura 26.	Cromosoma 13 y el gen <i>RB1</i> .	87
Figura 27.	Secuencia nucleotídica de la región promotora del gen <i>RB1</i> y sitios de unión de factores de transcripción en la secuencia consenso de los dinucleótidos CpGs.	88
Figura 28.	Genealogía de 6 generaciones (I-VI) en el recuadro la familia nuclear RBF60.	97
Figura 29.	Variante de secuencia c. [-187T>G; -188T>G] en el promotor del gen <i>RB1</i> en ADN de linfocitos circulantes del caso índice previo tratamiento con bisulfito de sodio.	102

Figura 30	Secuencia del promotor del gen <i>RB1</i> y ubicación de la variante de secuencia c. [-187T>G; -188T>G].	103
Figura 31	Esquemas de los patrones de metilación en el promotor del gen <i>RB1</i> . A) Melanoma del caso índice con 100 % de clonas "C" B) Linfocitos circulantes del caso índice. C) Porcentaje de metilación en CpGs específicos en las clonas "C" vs el porcentaje en las clonas "W".	104 104 104
Figura 32	Segregación de haplotipos de los microsatélites D13S317 y D16S539.	109
Figura 33	Modelo de doble heterocigosidad en retinoblastoma hereditario en la familia RBF60.	119
Figura 34	Árbol genealógico de la familia nuclear RBF60 y resultado de la inmunoprecipitación de cromatina (Chip) del promotor del gen <i>RB1</i> en DNA de una línea inmortalizada de linfocitos circulantes.	124
Figura 35	Diagrama del tamizaje genético-oncológico.	132
Figura 36	Promotor del gen <i>RB1</i> .	135

Tablas

Tabla 1	Localización anatómica de cáncer en el probando, frecuencia del antecedente de cáncer y de criterios clínicos en 650 casos.	26
Tabla 2	Asociación entre edad temprana (ET) y tumores MULTIS en probandos según el antecedente de cáncer y del patrón de herencia.	27
Tabla 3	Localización de cáncer en el probando, síndrome de susceptibilidad familiar identificado, agregación inespecífica y posible gen(es) de susceptibilidad involucrado (gen SC).	29
Tabla 4	Tipo y frecuencia de mutaciones en el gen <i>RB1</i> .	91

JUSTIFICACIÓN

Una de las enfermedades de mayor complejidad y letalidad que afectan al hombre es el cáncer, un padecimiento considerado durante mucho tiempo como de origen ambiental multifactorial. Sin embargo durante las últimas décadas del siglo XX, el conocimiento en el campo del cáncer, registró un importante avance con el descubrimiento de genes específicos, los oncogenes y genes supresores de tumores, involucrados en la etiología de los padecimientos oncológicos, que, al alterar la secuencia del genoma desorganizan el funcionamiento normal de una célula, llevándola a proliferación incontrolada. Así el cáncer pasó a ser una enfermedad de etiología genética. Con los avances tecnológicos para estudiar estas alteraciones, surgió la posibilidad de controlar estas enfermedades. Sin embargo más tarde, se identificó otro gran grupo de alteraciones, las epigenéticas. Es un hecho el avance sin precedente en el conocimiento de la etiología del cáncer, pero al mismo tiempo se ha reforzado el concepto de cáncer como padecimiento, altamente complejo.

Se sabe que no todas las personas desarrollan neoplasias malignas, aun estando expuestas a los mismos agentes, o de tener la misma estructura genética. Se han hecho esfuerzos por tratar de identificar personas con mayor propensión y determinar los mecanismos básicos de los procesos que confieren la predisposición. Conocimiento indispensable para entender y conocer mejor estas enfermedades y poder contribuir a su prevención y control de manera más efectiva.

En razón de lo anterior, para este trabajo se consideró importante desarrollar la investigación correspondiente en dos etapas. En la primer parte, se diseñó un estudio de corte epidemiológico, para tratar de identificar a nivel clínico personas o familias cuyos miembros enfermen de cáncer, como consecuencia o predisposición de factores hereditarios. La segunda parte está orientado a tratar de caracterizar las alteraciones moleculares que pudieran contribuir a explicar la predisposición y permitan distinguir en una familia a las personas con mayor riesgo de desarrollar un tumor maligno, por ser las que portan una alteración molecular familiar.

RESUMEN

En la población general con cáncer hay ciertas familias que muestran una alta incidencia. Algunas con síndromes específicos de susceptibilidad hereditaria donde se identifican alteraciones genéticas en las personas de mayor riesgo, por ser portadoras de estas alteraciones. En la primera parte de este trabajo se estudiaron 659 casos de adultos de ambos géneros aplicando características clínicas discriminatorias. La frecuencia global de casos en riesgo fue 9.2%. En 3.8% hubo síndromes de susceptibilidad hereditaria. Una familia portadora de retinoblastoma hereditario por rama paterna se estudió en detalle para determinar la alteración molecular familiar, ya que presenta un patrón de herencia, número y género de los afectados que se desvían del patrón esperado. Los padecimientos por alteraciones en genes improntados (muestran expresión diferencial materna vs paterna, debido a marca epigenética de metilación en las citosinas del ADN, silenciando una de las copias del gen correspondiente), presentan exceso de afectados de alguno de los géneros y desvío del patrón mendeliano esperado. El retinoblastoma es consecutivo a dos mutaciones en la secuencia del gen supresor de tumores *RB1*, que al eliminar el 100% de su función supresora, conducen a desarrollo tumoral. Silenciamiento por metilación en el promotor del gen *RB1* ha sido observado en los retinoblastomas. Considerando la expresión diferencial consecutiva a metilación y el sesgo de afectados observado en padecimientos de genes improntados, en la segunda parte del trabajo se trató de identificar la presencia de metilación en la región promotora del gen *RB1* como una posibilidad para explicar el patrón de herencia y el exceso de afectados de género masculino en la familia con retinoblastoma seleccionada en la primera parte de esta investigación. Mediante un estudio del estado de la metilación del promotor del gen *RB1*, se observó un patrón de metilación monoalélica, coincidente con la variante de secuencia: c.[-187T>G; -188T>G]. Inesperadamente, estas alteraciones se encontraron en ADN de linfocitos circulantes de la madre, quien las transmitió a dos generaciones consecutivas. Este patrón se observó en linfocitos y en ADN del tumor del caso índice. Se realizó análisis con microsatélites polimórficos incluidos del cromosoma D13, que mostró contribución biparental de ambos cromosomas (paterno y materno) al fenotipo retinoblastoma, confirmando doble heterocigosidad en los afectados. El doble hallazgo monoalélico genético-epigenético, variante de secuencia y metilación en el mismo alelo que transmite la madre, sugiere una epimutación constitutiva y probablemente predisposición hereditaria genético-epigenética para el retinoblastoma en esta familia.

ABSTRACT

In the general population with cancer, certain families show a high incidence, with specific syndromes of hereditary susceptibility where genetic alterations are identified in the individuals that, because they are carriers of these alterations, are at greater risk. First, we applied discriminatory clinical characteristics in the 659 cases of adults of both genders we studied. The overall frequency of cases at risk was 9.2%. There were hereditary susceptibility syndromes in 3.8%. A family with paternal branch retinoblastoma was investigated to determine the family molecular alteration, because it presented deviations in the expected pattern, such as inheritance pattern, gender and number of those affected. Ailments due to alterations in imprinted genes (showing maternal vs. paternal differential expression, caused by an epigenetic mark of methylation in DNA cytosines), display an excess of sufferers of one gender and deviation of the expected Mendelian distribution. Retinoblastoma is consecutive to two mutations in the sequence of the tumor suppressor *RB1* gene, which by eliminating 100% of its suppressor function leads to tumor development. Silencing by methylation in *RB1* gene has been observed in retinoblastomas. Second, considering the differential expression consecutive to methylation and the bias of those affected observed in imprinted gene ailments, we tried to identify the presence of methylation in the promoter region of the *RB1* gene as a possibility to explain the inheritance pattern and the excess of male affected in the selected family. DNA methylation studies of the *RB1* gene promoter showed a monoallelic methylation pattern coincident with the sequence variant c. [-187T>G; -188T>G]. Unexpectedly, this alteration was found in DNA from the mother's circulating lymphocytes, who transmitted it to two consecutive generations. This pattern was observed in index case lymphocytes and tumor DNA. An analysis including polymorphic microsatellites of D13 chromosome showed a biparental contribution of both chromosomes to the retinoblastoma's phenotype, thus conferring double heterozygosity in the affected. The double monoallelic genetic-epigenetic finding, sequence variant and methylation in the same allele, suggests a constitutive epimutation and probably a hereditary genetic-epigenetic predisposition in this family.

PRIMERA PARTE

I. INTRODUCCION.

Generalidades. Las enfermedades neoplásicas malignas englobadas con el nombre genérico de “cáncer”, constituyen un numeroso grupo de padecimientos de etiología compleja. Son muy frecuentes tanto en la población de adultos como en la pediátrica (1,2). La mayor incidencia en adultos en general, ocurre después de los 50 años de edad (3). Aun cuando en las últimas décadas se han registrado considerables avances en el diagnóstico y tratamiento, el cáncer sigue ocasionando gran letalidad; lo que ha generado el establecimiento de campañas a nivel poblacional, para detección temprana de algunas de las neoplasias que son más prevalentes, en las que se han identificado algunos de los factores de riesgo (4,5). La identificación de factores de riesgo en estas enfermedades constituye un amplísimo campo de estudio.

Debido a la complejidad de su etiología, no solo se ha considerado estrictamente ambiental, donde concurren múltiples factores (3,5), sino también de origen genético; además de numerosas alteraciones epigenéticas identificadas en décadas recientes (7,8). Estos considerables avances representan la fascinante tarea de muchos años, confirmatorios de la diversidad de factores que contribuyen a la etiopatogenia del cáncer, en la que también tiene un papel relevante la identificación de factores hereditarios (9).

La primera parte de esta investigación se centra en identificar familias cuyos miembros enferman de cáncer, como consecuencia o predisposición de factores

hereditarios. Esta parte de la investigación consiste en un “tamizaje” clínico de genética-oncológica, orientado a identificar las familias que muestren agregación familiar de cáncer. La segunda parte está orientada a tratar de caracterizar las alteraciones moleculares que pudieran contribuir a explicar la predisposición y, permitan distinguir en la familia, a las personas con mayor riesgo de desarrollar un tumor maligno, por ser las que portan la alteración molecular familiar.

2. GENÉTICA Y CÁNCER FAMILIAR

La identificación de mecanismos hereditarios en las enfermedades neoplásicas ha sido un proceso complejo porque en estas enfermedades se ha confirmado el gran efecto que ejercen en su etiología diversos factores ambientales físicos, químicos y biológicos (1,6). Sin embargo se ha demostrado en la mayoría de los casos, que el blanco de esa diversidad de factores es, precisamente el material hereditario (10,11). El papel de los factores hereditarios en el cáncer en general es difícil de establecer (12). La elevada frecuencia de estas enfermedades en la población general ha hecho pensar que tan solo por azar se pueden encontrar familias en las que dos o más de sus miembros desarrollan una neoplasia maligna, familias en donde estos padecimientos se agregan (2,4,13). Se ha confirmado que la existencia de este tipo de familias, no es solo el resultado de la alta prevalencia de cáncer en la población general. El análisis de datos sobre cáncer familiar de base poblacional ha arrojado una alta frecuencia de proporciones de afectados, entre dos generaciones de familiares de primer grado con cánceres específicos, donde se evidencia un componente familiar (14).

Entender los mecanismos genéticos que participan o confieren susceptibilidad para desarrollar una neoplasia maligna, ha llevado más de medio siglo en diversos estudios de epidemiología clásica, epidemiología genética, epidemiología molecular y más recientemente del conocimiento del complejo campo de la epigenética, la genómica y la proteómica (13,15-19).

Un campo que se ha desarrollado importantemente en las últimas décadas es el de los genes que predisponen al desarrollo de padecimientos neoplásicos familiares, los genes supresores de tumores, como el gen *RB1* (7,9,20,21).

Se han identificado mutaciones germinales en otro tipo de genes: genes asociados a la reparación, apoptosis, angiogénesis, control del ciclo celular, entre otros, que se han ligado cada vez a un mayor número de síndromes neoplásicos con susceptibilidad hereditaria (22-24). Importa señalar que cuando no se disponía de la metodología molecular, uno de los mejores métodos empleados para identificar factores hereditarios, fue el estudio clínico de familias mediante el árbol genealógico en las que varios de sus miembros desarrollan cáncer, aquellas en las que se concentran gran número de neoplasias malignas (15). Por este método desde 1941 se propuso al retinoblastoma como un padecimiento con herencia dominante (9). Algunos ejemplos que muestran la trascendencia que ha tenido la aplicación de este método, se demuestran en los estudios de Lynch en familias con cáncer del colon y endometrio, en las que identificó el síndrome que lleva su nombre; posteriormente también conocido con las siglas en inglés como HNPCC, por tratarse de un tipo de cáncer colo rectal hereditario no polipoideo (25). Justamente en estas familias se identificaron las mutaciones germinales en los genes MMR (“mismatch repair genes” que reparan apareamientos erróneos

del ADN), que se asocian a este síndrome hereditario (26,27). Además de los interesantes estudios en familias con cáncer de mama y ovario en las que el análisis de ligamiento (un marcador biológico asociado a una enfermedad) (28), dio la pauta para identificar posteriormente al gen *BRCA1*, que se asocia a la susceptibilidad hereditaria para desarrollar estas neoplasias (29).

En el siglo XX se describieron además, diversas agregaciones familiares de cánceres específicos con predisposición hereditaria, que ocurren en enfermedades hereditarias no malignas, como los neurofibrosarcomas que se desarrollan en enfermos con Síndrome de Von Recklinhausen (22). Sin embargo, lo que determinó el inicio de una nueva etapa en el estudio de familias con padecimientos neoplásicos, fue la identificación del patrón de herencia en el retinoblastoma mediante predicción estadística, con la teoría propuesta por Knudson en 1971 (30) y el descubrimiento en 1986 del gen supresor *RB1* asociado al desarrollo de este tumor (31).

3. HIPÓTESIS DE KNUDSON

La hipótesis propuesta por Knudson ha jugado un papel crucial para entender la etiopatogenia de las neoplasias familiares. Como regla general, la inducción de cáncer familiar se ha basado en el concepto de pérdida de heterocigosidad (LOH: por sus siglas en inglés). Esta hipótesis, pretendió explicar el desarrollo del retinoblastoma, un tumor de la retina que se desarrolla en los menores de tres años de edad.

A mediados del siglo pasado se sugirió la posibilidad de herencia autosómica dominante por su tendencia a ocurrir en forma familiar (9). Fue hasta 1971 que el

análisis estadístico de características clínicas bien definidas en relación a la edad en que aparece el tumor, la modalidad unilateral o bilateralidad, género del afectado, así como la historia de retinoblastoma en la familia, lo que permitió a Knudson proponer la hipótesis que explica la naturaleza tanto del tipo hereditario, como la del tipo esporádico de este tumor (30). En esta hipótesis comprobada, se propuso que para el desarrollo de un retinoblastoma, se requieren dos “hits” mutaciones M1 y M2. En el tipo hereditario, la primera mutación (M1 primer “hit”) ocurre a nivel germinal e inactiva a uno de los 2 alelos, ya sea el materno o el paterno del gen *RB1*, con lo cual el gen pierde el 50% de su función supresora tumoral. La segunda mutación M2 ocurre a nivel somático en el alelo restante, llevando al gen a la pérdida total de función y a desarrollo tumoral.

3.1 Retinoblastoma hereditario: mecanismo de susceptibilidad.

La hipótesis de Knudson establece que la susceptibilidad (SC) para desarrollar el tumor, se hereda a la descendencia de manera dominante, por medio de la mutación (M1) que ocurre a nivel germinal y se transmite a todas las células del organismo (30,32). Las personas que portan esta mutación se denominan heterocigotos y tienen el genotipo *RB1* -/+, como se ilustra en la Figura 1.

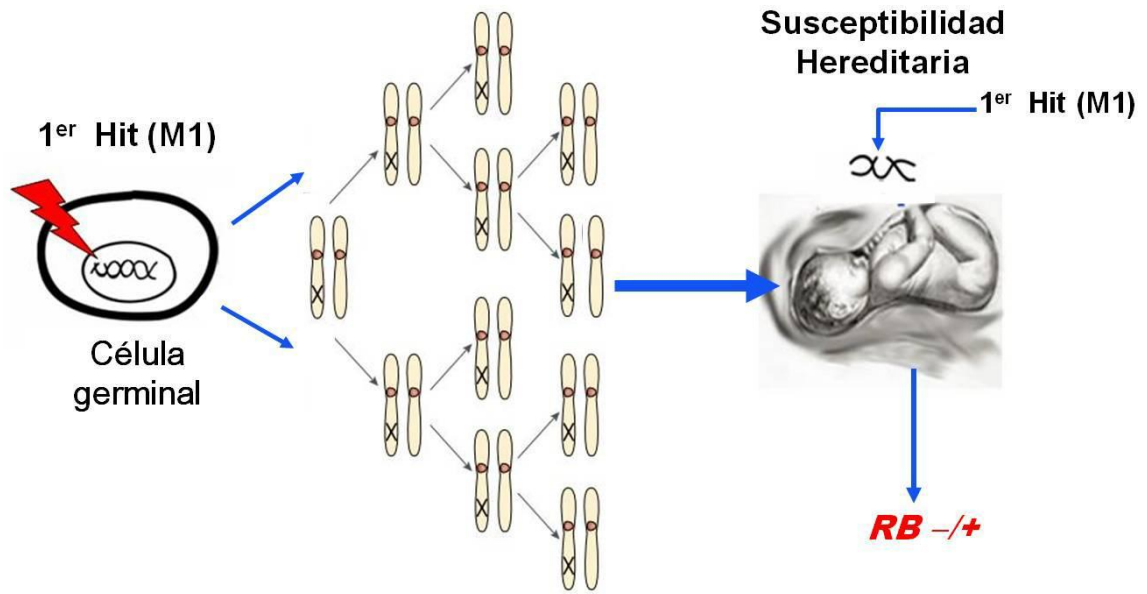


Figura 1. Alteraciones involucradas en el mecanismo de susceptibilidad en el retinoblastoma hereditario. En el retinoblastoma hereditario el 1^{er} "Hit" (X) M1 ocurre en una célula germinal, de donde se transmite a todas las células de un nuevo organismo (incluyendo todos los retinoblastos), dando origen al genotipo $RB1^{-}/RB1^{+}$ que confiere la susceptibilidad hereditaria, modificada de Knudson A. 30,32).

La heterocigosidad es la consecuencia de haber heredado conjuntamente un alelo silvestre (normal) de alguno de los progenitores y el alelo mutado, ya sea el materno o el paterno que proviene del progenitor afectado. Este genotipo no implica que la enfermedad ocurrirá necesariamente. Solo si el alelo silvestre se pierde (pérdida de heterocigosidad), se hará evidente el desarrollo tumoral.

Una persona heterocigota requiere solamente la segunda mutación (2o. "hit" M2), en el alelo silvestre (normal) del gen $RB1$ de una célula somática (el retinoblasto), en el que ocasiona homocigosidad, con el consiguiente genotipo recesivo $RB^{-}/-$ que lleva a la pérdida total de la función supresora tumoral, en consecuencia al desarrollo del retinoblastoma (Figura 2).

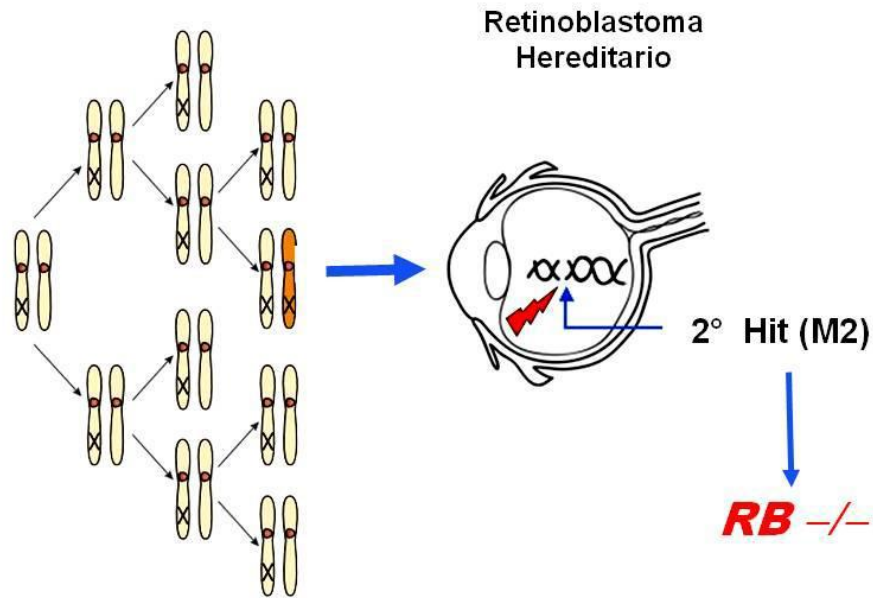


Figura 2. El segundo “Hit” en el Retinoblastoma hereditario. Las personas que han heredado el primer “Hit” (X) M1- heterocigotas requieren solo el 2º “Hit” (M2- cromosoma oscuro) en un retinoblasto para desarrollar el retinoblastoma (modificada de Knudson A 30,32).

3.2 Retinoblastoma esporádico.

En las personas que no han heredado la primera mutación germinal, los dos “Hits” M1 y M2, ocurren a nivel somático y por lo tanto estas mutaciones, no se pueden transmitir a la descendencia; por lo mismo no hay otros miembros afectados en la familia. Un retinoblastoma que se desarrolla en estas circunstancias se clasifica como esporádico (Figura 3).

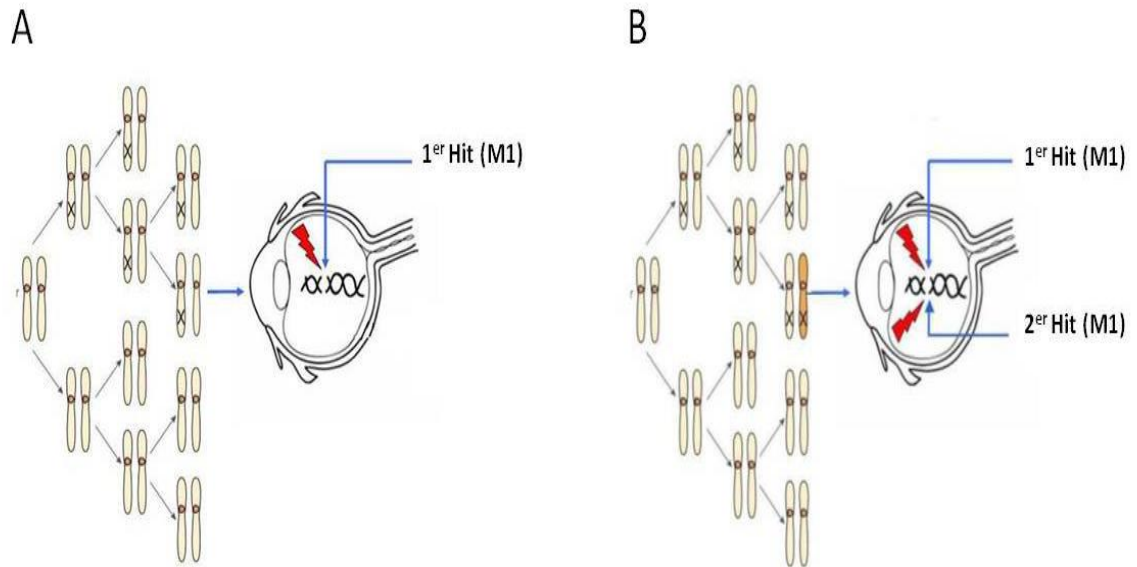


Figura 3. Mecanismo de las alteraciones que dan origen al Retinoblastoma esporádico. A. El 1^{er} “Hit” (X) M1 ocurre en un retinoblasto y origina una clona precursora. **B.** El segundo “Hit” (cromosoma obscuro) M2 ocurre en alguna célula de la misma clona generando el retinoblastoma (modificada de Knudson A.; 30,32).

Actualmente se han identificado mutaciones en otros genes supresores como, P53, P16, etc., que se han asociado a diferentes síndromes familiares, los cuales muestran agregaciones de neoplasias específicas dependientes del gen mutado; en los cuales, se ha podido identificar el mismo mecanismo de susceptibilidad propuesta por Knudson. De ahí que el retinoblastoma y su mecanismo de susceptibilidad hereditaria, se ha tomado como el paradigma de susceptibilidad hereditaria en cáncer en general.

El descubrimiento de mutaciones hereditarias en genes asociados a mayor riesgo de cáncer y la extraordinaria posibilidad de identificar estas alteraciones en las familias, marcó definitivamente el origen de una nueva rama de la genética: la genética oncológica, comprometida por una parte, con el estudio de las alteraciones moleculares y los mecanismos inherentes que contribuyan a explicar

la susceptibilidad hereditaria en el desarrollo de cáncer y, por otra a identificar a las personas y familias con mayor riesgo de desarrollar alguno de estos padecimientos (33-35).

Una serie de estudios genéticos-clínicos evidenciaron que las familias donde se concentran diversos cánceres por algún componente hereditario muestran además, características esenciales (edad, tumores bilaterales, transmisión vertical) que se mencionan más adelante y que actualmente se han constituido como criterios clínicos para discriminar las familias en las que participan factores hereditarios en la agregación de cánceres, de otras familias en las que una concentración neoplásica puede ser por azar.

4. CRITERIOS CLÍNICOS PARA DISCRIMINAR FAMILIAS CON AGREGACIÓN FAMILIAR DE CANCER CON COMPONENTE HEREDITARIO.

De gran relevancia en el proceso de discriminación de este tipo de familias ha sido la identificación de características esenciales relativas a las particularidades clínicas de la persona que enferma, a las de las neoplasias que desarrollan y la forma en que los enfermos se distribuyen en la familia, reflejando un patrón de herencia particular. Estas características las presentan sistemáticamente las familias que muestran agregación de cáncer con componente hereditario, de ahí su aplicación para identificar este grupo de familias, (22,25,36,37).

4.1 Características clínicas.

Edad. La edad que tiene la persona cuando desarrolla cáncer, puede hacer pensar en un síndrome hereditario cuando en la familia alguno o varios de sus miembros desarrollan algún tipo de cáncer a una edad especialmente joven, es decir en comparación a la edad en que una persona de la población general, desarrolla una neoplasia similar; por ejemplo el cáncer de mama ocurre con mayor frecuencia después de los 50 años de edad, en contraste una mujer con un síndrome de susceptibilidad lo puede desarrollar antes de tener 40 años de edad, o aún más temprano (22,25,36).

4.2 Características histopatológicas del tumor:

a) Bilateralidad. Se refiere al desarrollo del mismo tipo de tumor en los órganos pares, por ejemplo el riñón o la glándula mamaria, **b) Multifocal.** Cuando el tumor presenta varios focos primarios de desarrollo en el mismo órgano, **c) Múltiples Primarios.** Cuando el enfermo desarrolla más de un cáncer primario de diferente tipo y en diferentes órganos, por ejemplo, la misma paciente puede desarrollar cáncer en la mama y otro cáncer diferente en el ovario, **d)** También puede haber mayor frecuencia de desarrollo de tumores “raros”. Aquellos que en la población general tienen baja frecuencia o, el sitio anatómico donde se desarrolla no es el habitual, o afecta al género en el cual es menos frecuente (22,25,36).

4.3 Patrón de herencia.

El patrón de herencia se refiere a la forma en que un rasgo (enfermedad) o característica familiar se distribuye entre los miembros de las diferentes

generaciones en la genealogía familiar. Observándose que en la misma familia pueden coincidir los afectados (enfermos), simultáneamente con los no afectados (sanos); esto facilita identificar el patrón de herencia mendeliana correspondiente *Transmisión vertical*. Es un tipo de patrón hereditario en el cual la distribución de los afectados es vertical: directamente de padres a hijos (independiente del género); la distribución en dos o más generaciones consecutivas; su carácter sucesivo en la misma rama materna o paterna, permite sugerir un patrón de herencia mendeliana autosómica dominante (22). Esto indica la presencia y transmisión hereditaria de mutaciones germinales de un afectado a su descendencia. Mecanismo que se observa en la hipótesis de Knudson (30,32), para explicar la susceptibilidad hereditaria en el desarrollo de cáncer, como ya se mencionó.

5. CRITERIOS DE ALTO RIESGO: CLASIFICACIÓN A SÍNDROMES DE SUSCEPTIBILIDAD HEREDITARIA.

Dada la extensa variabilidad de personas que enferman de cáncer en la población general, se dificulta identificar al azar las alteraciones moleculares, que pudieran estar asociadas a susceptibilidad familiar para estas enfermedades. El conocimiento de que ciertas personas y/o familias que desarrollan cáncer presentan sistemáticamente determinadas características clínicas, que se pueden detectar mediante la historia clínica personal y/o familiar, ha permitido seleccionar aquellas que sugieran que algún componente hereditario, puede estar involucrado en su padecimiento. Para identificar si la familia es portadora de algún síndrome

con susceptibilidad hereditaria, además de que muestre los criterios mencionados, debe reunir criterios particulares denominados de alto riesgo, ya descritos en la literatura, y que son específicos para cada síndrome de susceptibilidad, consecutivos a alteraciones en un gen determinado; estas alteraciones permiten identificar en una familia a los miembros de mayor riesgo por ser los portadores (37). Esto representa un avance ya que, si se identifican alteraciones moleculares en ellas y en los cánceres que desarrollan, aumenta la probabilidad de asociarlas a su padecimiento familiar. Por el contrario si solo se analizara un gran grupo de la población general, por ejemplo mujeres con cáncer de mama; un resultado ideal sería, encontrar una determinada alteración que se podría asociar a cáncer de mama, pero de ninguna manera a susceptibilidad hereditaria.

Lo anterior indica la importancia de identificar inicialmente a nivel clínico, familias con mayor riesgo de desarrollar padecimientos oncológicos, sugestivas de corresponder a algún síndrome de susceptibilidad hereditaria y, en estas tratar de determinar la alteración molecular correspondiente. Una vez que se conoce la alteración molecular familiar, la posibilidad de detección y prevención precoz en otros miembros de la familia resulta altamente eficaz; a diferencia de lo que se observaría en las demás personas de la población general, situación en la que se dificulta identificar esas características clínicas y la posible alteración molecular; en consecuencia, se escapa la detección y prevención precoz para un síndrome familiar.

En este conjunto de particularidades se fundamenta el tamizaje genético-oncológico realizado en la presente investigación, con el propósito de seleccionar

adecuadamente la o las familias para el estudio molecular, que comprende la segunda parte de este trabajo

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como parte de nuestras investigaciones nos ha interesado conocer el aspecto genético-epidemiológico de los patrones de presentación de cáncer con distribución familiar, asociados a neoplasias específicas. Para abordar esta investigación se realizó un "tamizaje" en un grupo de la población que acude a consulta en una unidad de tercer nivel de atención oncológica. Con base en este planteamiento, en esta etapa se pretende identificar casos que muestren características clínico-genéticas indicativas de un componente hereditario en la presentación de neoplasias. En la segunda fase del estudio, intererese extrapolar el análisis de la agregación familiar de neoplasias a nivel molecular y epigenético, en determinadas familias.

III. HIPÓTESIS

Las características genético-clínicas de ciertas familias con padecimientos neoplásicos como la edad en que se desarrollan los tumores, si son únicos o bilaterales así como su distribución en la familia, son indicativas de un componente genético de riesgo, asociado a síndromes específicos de agregación neoplásica. Su presencia nos permite discriminar estas familias de otras que muestren agregación de neoplasias por azar.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia y tipo de familias con agregación de neoplasias que muestren características genético-clínicas asociadas a un componente hereditario y, clasificarlas de acuerdo a los síndromes conocidos de susceptibilidad neoplásica.

Objetivos particulares.

1. Conocer el tipo y frecuencia de agregaciones familiares de cáncer que puedan corresponder a factores hereditarios.
2. Clasificar las familias de acuerdo a los síndromes específicos de susceptibilidad hereditaria.
3. Seleccionar del punto 2 las familias indicativas para estudio molecular.

V. RESULTADOS

Se estudiaron 650 casos con diagnóstico histopatológico correspondiente a algún tipo de cáncer en algún órgano, por ejemplo: mama, próstata, etc.; por lo que se clasificaron de acuerdo a la localización anatómica en la que se presentó en cada caso o probando. El total de hombres: 329 y 321 el de mujeres. La mediana de edad fue de 59 años, rango de 18 a 91 años, un caso en cada extremo de estas edades.

1. Método de confirmación del diagnóstico de cáncer.

En el 65% de los familiares de primer grado el diagnóstico de cáncer se confirmó por estudio histopatológico, en el 40% en los de 2º grado y en el 28 % en los familiares de 3^{er} grado. La confirmación del diagnóstico obtenido por medio del expediente clínico o por certificado de defunción, se obtuvo en el 14% de los familiares de 1^{er} grado, 27% en los de 2º y por este método en el 30% en los familiares de 3^{er} grado. El diagnóstico por historia familiar, fue el predominante en los familiares de 3^{er} grado, informado en el 42% de ellos.

2. Frecuencia del antecedente de cáncer y de los criterios clínicos.

En la Tabla 1 se muestran el número de casos estudiados de acuerdo a la localización anatómica del sitio de cáncer, con la correspondiente frecuencia de ACA (antecedentes de cáncer) y la de los criterios clínicos de ET, *MULTIS* y TV (edad temprana, tumores *multis*, y transmisión vertical). Definidos en material y métodos). Se observa además un número de casos que presentaron penetrancia incompleta (PI), un tipo particular de TV. ACA se encontró en 264 casos (40.6%); en 181 (27.8%) de estos casos el antecedente correspondió a familiares de 1^{er} grado del probando; en 65 casos (10%) a familiares de 2º grado y en 18 casos (2.8%) a familiares de 3^{er} grado con algún tipo de cáncer. El 17.1% (111 casos) presentó ET; en el 1.8% (12 casos) se encontró tumores *MULTIS*; el 2.3% (15 casos) mostró TV y el 2% (13 casos) PI.

En la Tabla 2 se observa el análisis de la asociación entre los criterios clínicos de ET y tumores *MULTIS* en el total de casos según el antecedente de cáncer (ACA). En los casos con ACA la frecuencia de ET fue de 21% y de 15% en el grupo sin este antecedente, con un RR (riesgo relativo) de 1.52 sin significancia estadística. La frecuencia de *MULTIS* fue de 4.2% en los casos con ACA y de 0.3% en el grupo sin este antecedente, RR de 16.7 y significancia estadística de 0.0003.

En esta tabla se muestra además, el análisis de la asociación de edad temprana (ET) y *MULTIS* en las familias en las que ACA (antecedente de cáncer) conforma un patrón de herencia de TV ó de PI. En familias con TV la frecuencia de ET fue de 53%, RR de 5.70 altamente significativo 0.0015; la de *MULTIS* fue de 13% RR de 9.62 la significancia estadística 0.02. La frecuencia de estos criterios (ET y *MULTIS*) en familias con PI la frecuencia de ET 62% RR de 7.75 y significancia estadística 0.0005; la frecuencia de *MULTIS* fue de 15%, RR de 11.4 con significancia de 0.02.

En los 264 casos (40.6%) que presentaron antecedentes de cáncer (ACA) se realizó el estudio genealógico y el tamizaje continuó aplicando los criterios clínicos de ET, *MULTIS* y TV; para proseguir el tamizaje utilizando los criterios de alto riesgo. El análisis con estos criterios permitió identificar 60 probandos (9.2%) del total de la muestra estudiada que mostraron agregación familiar para algún tipo de neoplasias. De los cuales 25 casos (3.8%) cumplieron con criterios de alto riesgo, sugestivos de síndromes de susceptibilidad hereditaria, en los que se indicaría la posibilidad de explorar genes particulares de susceptibilidad. En el restante 5.3% (35 casos) la agregación se clasificó como inespecífica. Los resultados del tamizaje se muestran en el diagrama de la Figura 4.

3. Frecuencia de síndromes de susceptibilidad hereditaria.

En la Tabla 3 se desglosan los casos clasificados con síndromes específicos de susceptibilidad así como los que mostraron agregaciones inespecíficas; en el extremo izquierdo se anotan los que sugieren riesgo elevado en los que se indicaría la posibilidad de explorar los genes de susceptibilidad (SC) que se han involucrado en esos síndromes, que se indican en la tabla; además en el extremo derecho de esta tabla se encuentran los casos que se clasificaron como agregaciones inespecíficas, posiblemente de riesgo moderado, por no reunir los criterios particulares de un síndrome específico. En este tipo de agregaciones en los últimos años se ha sugerido analizar genes de susceptibilidad de menor riesgo, anotados en esta tabla. Sin descartar la posibilidad de que algunas agregaciones puedan corresponder a “fenocopias” (casos que muestran las características fenotípicas pero que no “tienen” la supuesta alteración molecular) o; corresponden a agregaciones al azar, dado la alta prevalencia de estos padecimientos en la población general.

Cáncer en el caso-probando	Total de casos	Antecedente de cáncer		Criterios clínicos							
				Edad temprana		Tumores <i>multis</i>		Transmisión vertical		Penetrancia incompleta	
	<i>N</i>	<i>N</i>	%	<i>n</i>	%	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%
Localización anatómica											
Mama	84	49	58.3	10	11.9	2	2.4	7	8.3	1	1.2
Próstata	72	23	31.9	2	2.8	---	---	1	1.4	---	---
Colorrectal	59	22	37.3	14	23.7	2	3.4	3	5.1	3	5.1
Primario desconocido	46	17	37.0	12	26.1	---	---	---	---	1	2
Riñón	41	20	48.8	4	9.8	2	4.9	1	2.4	2	4.9
Tiroides	38	16	42.1	7	18.4	---	---	1	2.6	---	---
Testículo	35	16	45.7	28	80.0	1	2.9	1	2.9	1	3
Estomago	31	16	51.6	3	9.7	---	---	1	3.2	1	3
Sarcomas	28	8	28.6	12	42.9	---	---	---	---	1	4
Melanoma	26	7	26.9	3	11.5	1	3.8	---	---	1	4
Bronquios y pulmón	15	8	53.3	2	13.3	1	6.7	---	---	---	---
Cérvico uterino	9	1	11.1	---	---	---	---	---	---	---	---
Ovario	9	6	66.7	4	44.4	2	22.2	--	---	1	11
Páncreas	9	4	44.4	---	---	---	---	---	---	---	---
Leucemias y linfomas	9	1	11.1	2	22.2	---	---	---	---	---	---
Vejiga	9	5	55.6	---	---	---	---	---	---	---	---
Hígado	8	3	37.5	1	12.5	---	---	---	---	---	---
Carcinomas*	122	42	34.4	7	5.7	1	0.8	---	---	1	0.8
Total	650	264	40.6	111	17.1	12	1.8	15	2.3	13	2.0

*:Otros carcinomas en varias localizaciones diferentes a las anotadas.

Tabla 1. Localización anatómica de cáncer en el probando, frecuencia del antecedente de cáncer y de criterios clínicos en 650 casos.

			Edad Temprana		Tumores <i>multis</i> ²	
Caso-Probando	Total		N	% ³	N	%
Antecedentes de cáncer	Si	264	56	21	11	4.2
	No	386	58	15	1	0.3
Riesgo relativo ⁴			1.52 (1.01–2.29)		16.7 (2.15–130)	
Significancia (p=)			0.0462		0.0003	
		Total	N	%	N	%
Transmisión vertical	Si	15	8	53	2	13
	No	635	106	17	10	1.6
Riesgo relativo			5.70 (2.02–16.1)		9.62 (1.91–48.3)	
Significancia (p)			0.0015		0.0287	
		Total	N	%	N	%
Penetrancia incompleta	Si	13	8	62	2	15
	No	637	109	17	10	1.6
Riesgo relativo			7.75 (2.49–24.1)		11.4 (2.23–58.2)	
Significancia (p)			0.0005		0.0218	

¹Transmisión vertical. Penetrancia incompleta.²Tumores: bilateral, múltiple primario o multifocal

³Porcentaje en relación al total de hilera.⁴Valor e intervalo de confianza 95%.

Tabla 2. Asociación entre edad temprana (ET) y tumores MULTIS en probandos según el antecedente de cáncer y del patrón de herencia. Se muestra el análisis de la asociación de edad temprana (ET) y *MULTIS* en las familias en las que ACA (antecedente de cáncer) conforma un patrón de herencia de TV ó de PI. En familias con TV la frecuencia de ET fue de 53%, RR de 5.70 altamente significativo 0.0015; la de *t.multis* fue de 13% RR de 9.62 la significancia estadística 0.02. En familias con PI la frecuencia de ET correspondió al 62%, RR de 7.75, *p* 0.0005 y la de *Multis* fue de 15%, RR de 11.4 con significancia de 0.02.

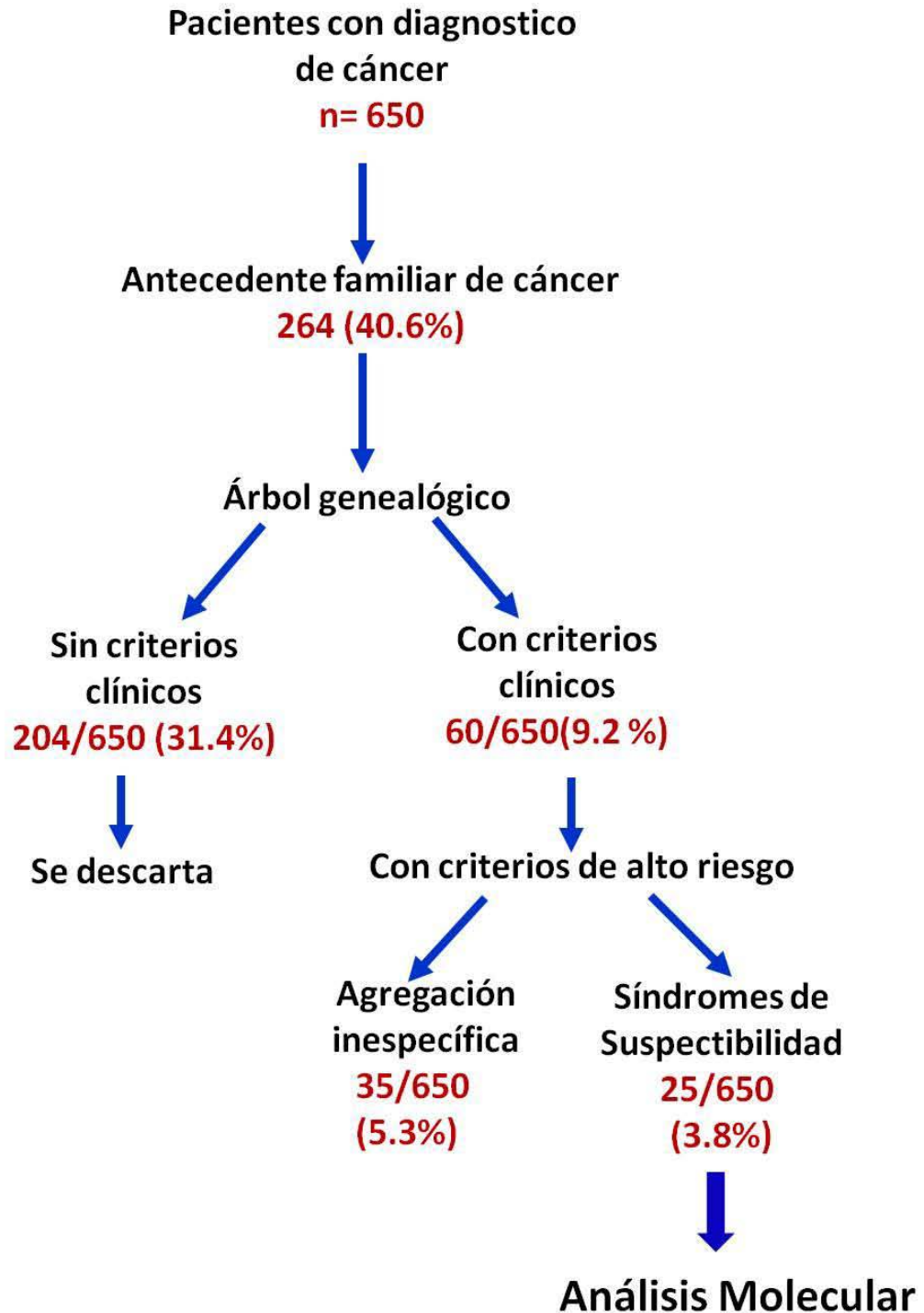


Figura 4. Resultados del tamizaje genético-oncológico. El 40.6% (264 casos) del total de los 650 casos presentaron antecedente de cáncer (ACA) en los cuales se realizó estudio genealógico. En el 9.2% (60 casos) se observó agregación de neoplasias y alguno de los criterios. En el 5.3% (35 casos) la agregación de neoplasias es inespecífica, difícil de clasificar. En el 3.8% (25 casos), la agregación de neoplasias es más específica y cumple con criterios particulares de alto riesgo, sugestivos de algún síndrome de susceptibilidad, en los que podría indicarse análisis molecular de genes específicos.

Cáncer, localización en el caso-probando	Síndrome de susceptibilidad	No de casos	Gen SC	Agregación inespecífica	Gen SC	Total
C. mama	CA. Mama y ovario	8	<i>BRCA1-2</i>	12	<i>CDH1, PALB2</i>	20
C. de estómago ¹	S. de Lynch	2	MMR	6	<i>CDH1</i>	8
C. de riñón ²		5		3	<i>CHEK2</i>	8
C. colorrectal	S. de Lynch	2	MMR	5	<i>STK11, CHK2</i>	7
C. de testículo ³	CA Familiar de testículo	2		5		7
C. de próstata ⁴	CA Familiar de próstata	3		3	<i>BRCA 2, PALB2</i>	6
C. de ovario ⁵	CA Mama y ovario	2	<i>BRCA1</i>	1	<i>PALB2</i>	3
Melanoma	Retino-blastoma	1	<i>RB1</i>	0	<i>RB1, P16</i>	1
Total		25		35		60

Tabla 3. Localización de cáncer en el probando, síndrome de susceptibilidad familiar identificado, agregación inespecífica y posible gen(es) de susceptibilidad involucrado (gen SC).

En la Tabla 3, en el grupo de cáncer de mama, se anotan 8 familias en las que la agregación sugiere que podrían corresponder a un síndrome de susceptibilidad hereditaria para cáncer de mama-ovario. Las figuras 5, 6, y 7 ilustran tres ejemplos de este tipo de familias. Mientras que doce familias con este diagnóstico se clasificaron como posibles agregaciones inespecíficas, porque se observaron cánceres diferentes a los que habitualmente se encuentran en el síndrome *BRCA1/2*; en la Tabla 3 se indican los genes de menor riesgo que se han involucrado en agregaciones semejantes. Un ejemplo de este tipo de familias se ilustra en la figura 8.

Como se puede observar en la tabla 3, se encontraron 4 familias sugestivas de Síndrome de Lynch. La figura 9 ilustra una de estas familias.

Siguiendo el orden de la Tabla 3, se anotan familias en las que todos los afectados muestran el mismo tipo de neoplasias. Los criterios de alto riesgo para

estas familias, establecen que cualquier agregación de 3 o más cánceres del mismo tipo, en familiares de 1º o 2º grado se consideran de alto riesgo, aún cuando no se hayan identificado los genes específicos asociados a la susceptibilidad correspondiente (razón por la que no se anotan en la tabla). Como por ejemplo en el caso del cáncer de testículo, o de próstata que se ilustran en las figuras 10 y 11 respectivamente que se evaluaron mediante los criterios propuestos por Hampel y cols; 37). Dentro del grupo de casos con cáncer de próstata, puede haber hombres afectados con este tumor e historia familiar con diferentes neoplasias en la agregación, en la que se incluye cáncer de mama, un ejemplo en la figura 12. Sugestivo de analizar alteraciones en el gen *BRCA2*, por el riesgo que en este síndrome muestran los hombres portadores de la mutación, para cáncer de próstata, mama y páncreas. En las mujeres el riesgo es mayor para cáncer de mama y ovario.

En el grupo de casos con cáncer de ovario, se encontraron dos familias sugestivas de corresponder al síndrome de susceptibilidad para cáncer de mama-ovario, como la que se muestra en la figura 13.

Otra familia de alto riesgo es la de un probando con diagnóstico de melanoma maligno consecutivo a una segunda neoplasia. El primer tumor correspondió a un retinoblastoma, neoplasia que presentaron varios miembros de la familia. El estudio genealógico se muestra en la figura 14

Fam 111

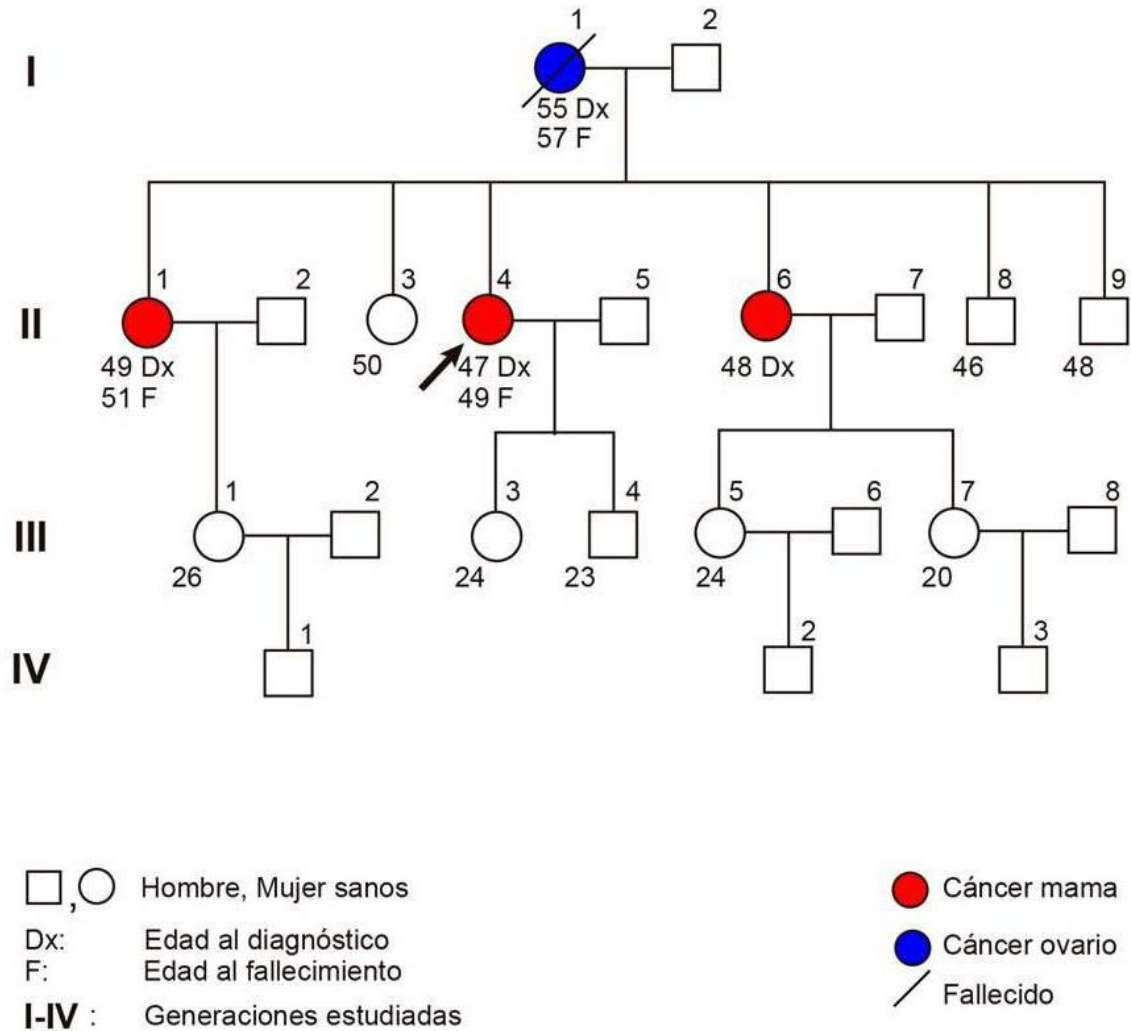


Figura 5. Cáncer hereditario: mama-ovario. Criterios de evaluación para el síndrome: cáncer de mama-ovario de riesgo elevado, Hampel y cols (37): Tres casos con cáncer de mama-ovario; al menos un caso con cáncer de ovario en familiar de 1º o 2º grado. Esta agregación familiar muestra TV de madre (con cáncer de ovario) a tres hijas con cáncer de mama. Posiblemente secundario a mutaciones en alguno de los genes *BRCA1/2*.

Fam 267

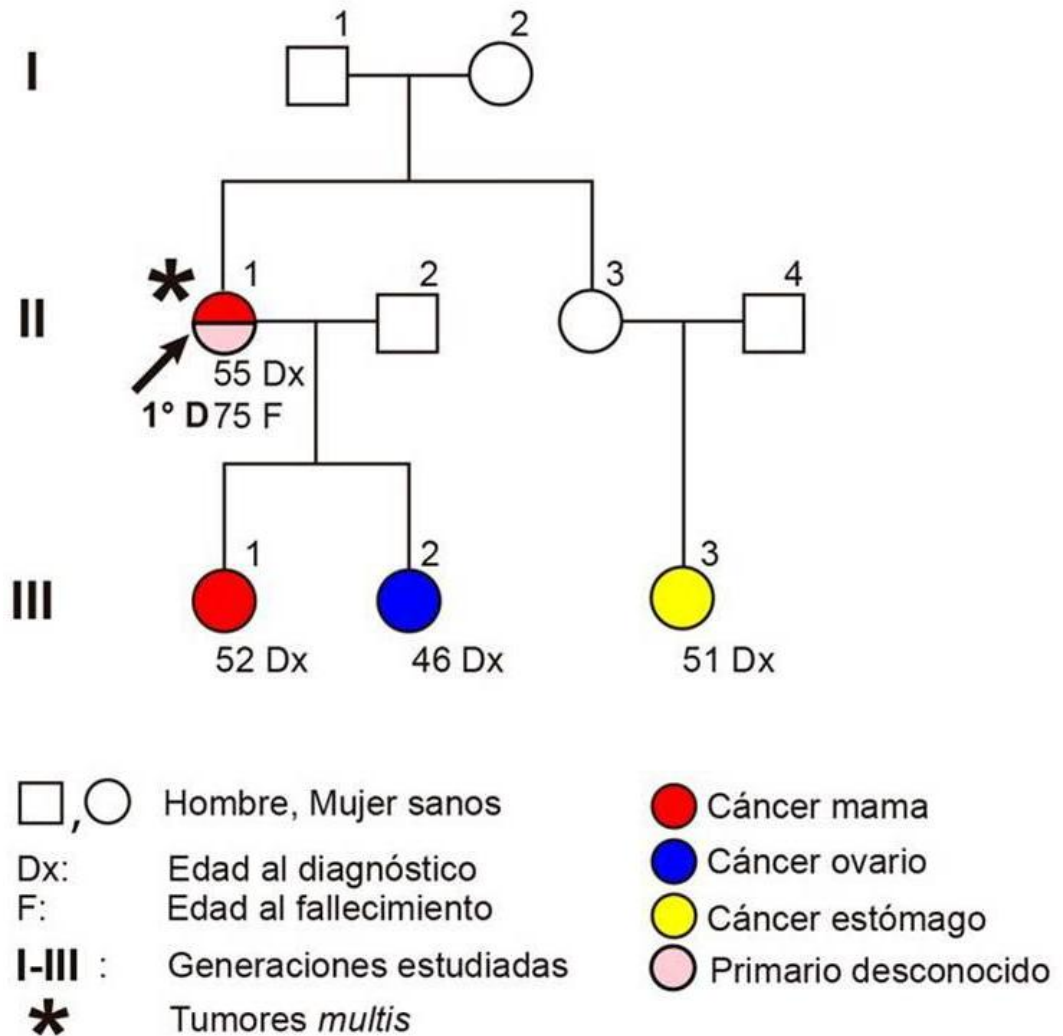


Figura 6. Cáncer hereditario: mama-ovario. Criterios de evaluación Hampel y cols; 37): riesgo elevado: 3 casos de cáncer de mama-ovario; al menos uno con cáncer de ovario en familiares de primer grado. Esta familia muestra agregación de cáncer de mama y ovario en familiares de primer grado evidenciando TV (madre a hijas); la *propósita* (↑) además de cáncer de mama, desarrolló otro tumor primario, (*MULTIS*) clasificado como de sitio desconocido. En otro familiar cercano, con cáncer gástrico, tumor frecuentemente reportado en familias portadoras de mutaciones en el gen *BRCA2*.

Fam 157

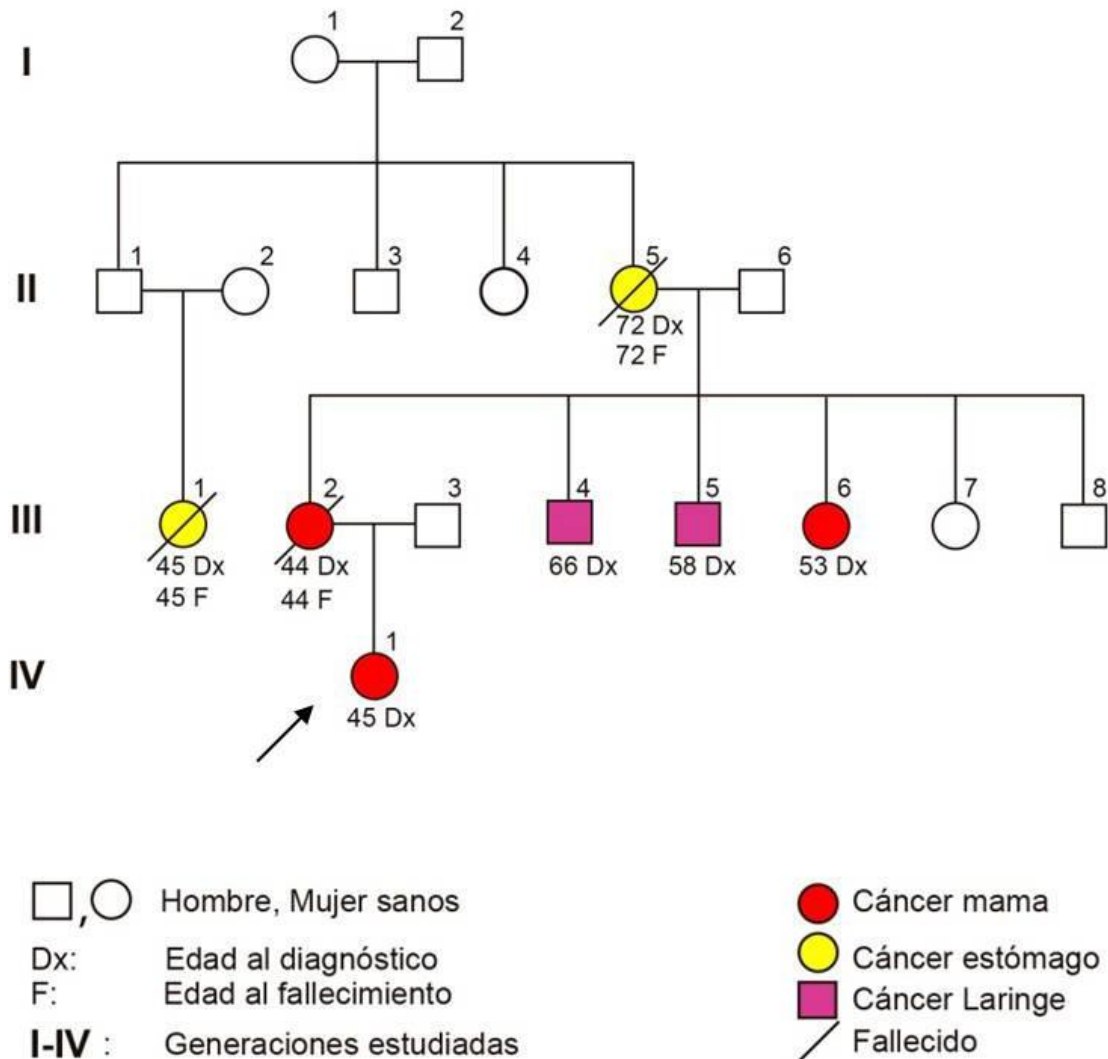


Figura 7. Cáncer hereditario: mama-ovario. Criterios de evaluación riesgo elevado: NCCN (Compilados por Hampel y cols; 37): Historia personal de cáncer de mama (↑) a cualquier edad, con dos familiares cercanos especialmente si una de ellas es diagnosticada antes de los 50 años de edad. En esta familia el caso índice con historia personal de cáncer de mama. Dos familiares de primer grado madre-hija (TV) y uno de segundo grado la tía materna. Diagnóstico antes de los 50 años de edad en dos de ellas. Adicionalmente se encuentran dos familiares cercanos con cáncer de estómago y dos con cáncer de la laringe. Todos los afectados en la rama materna. Sugiere analizar mutaciones en el gen *CDH1* (descrito en cáncer de estómago) además de los *BRCA1/2*. (38).

Fam 369

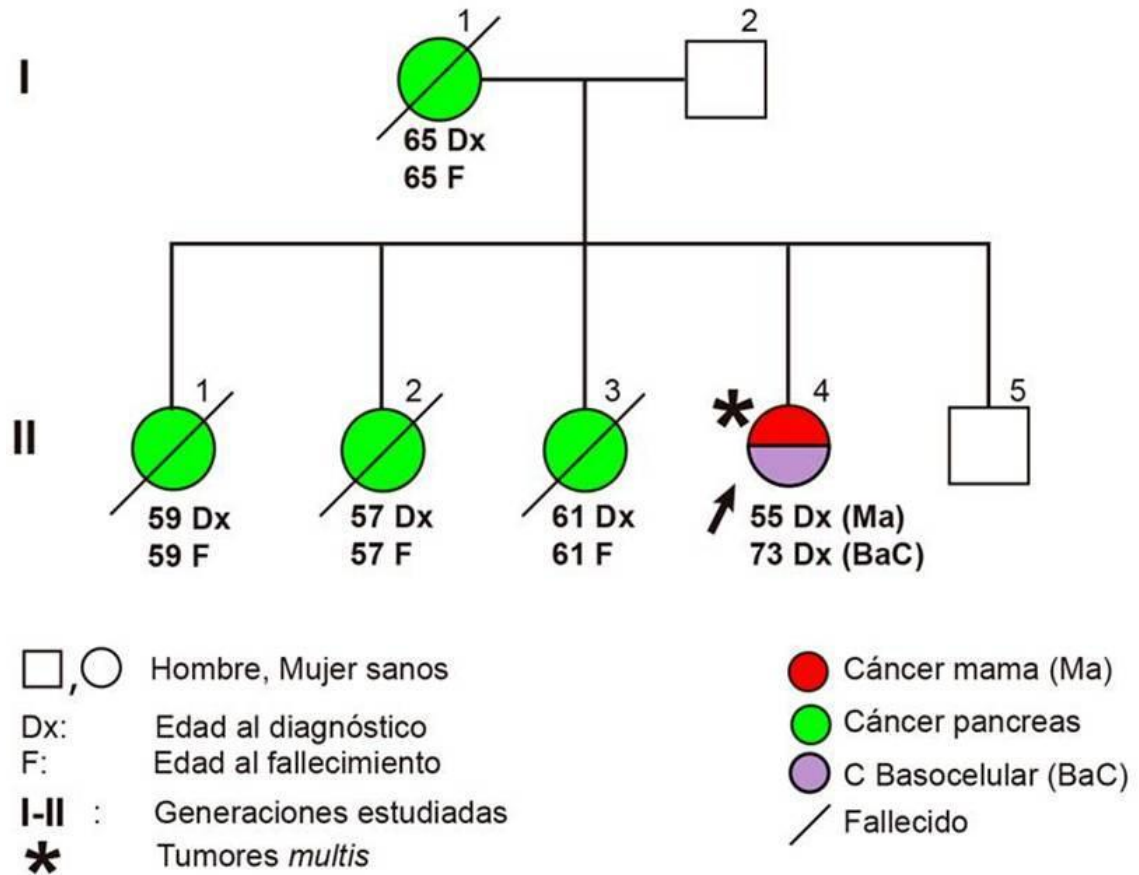


Figura 8. Cáncer hereditario: mama y páncreas. En esta familia la agregación incluye tumores *multis* en la probando (↑), cáncer de mama y posteriormente cáncer basocelular en el ala nasal. Es notable la presencia de cáncer de páncreas en 4 familiares de primer grado en dos generaciones sucesivas (TV) Criterios de evaluación Canto MI y cols; 39).

Fam 8

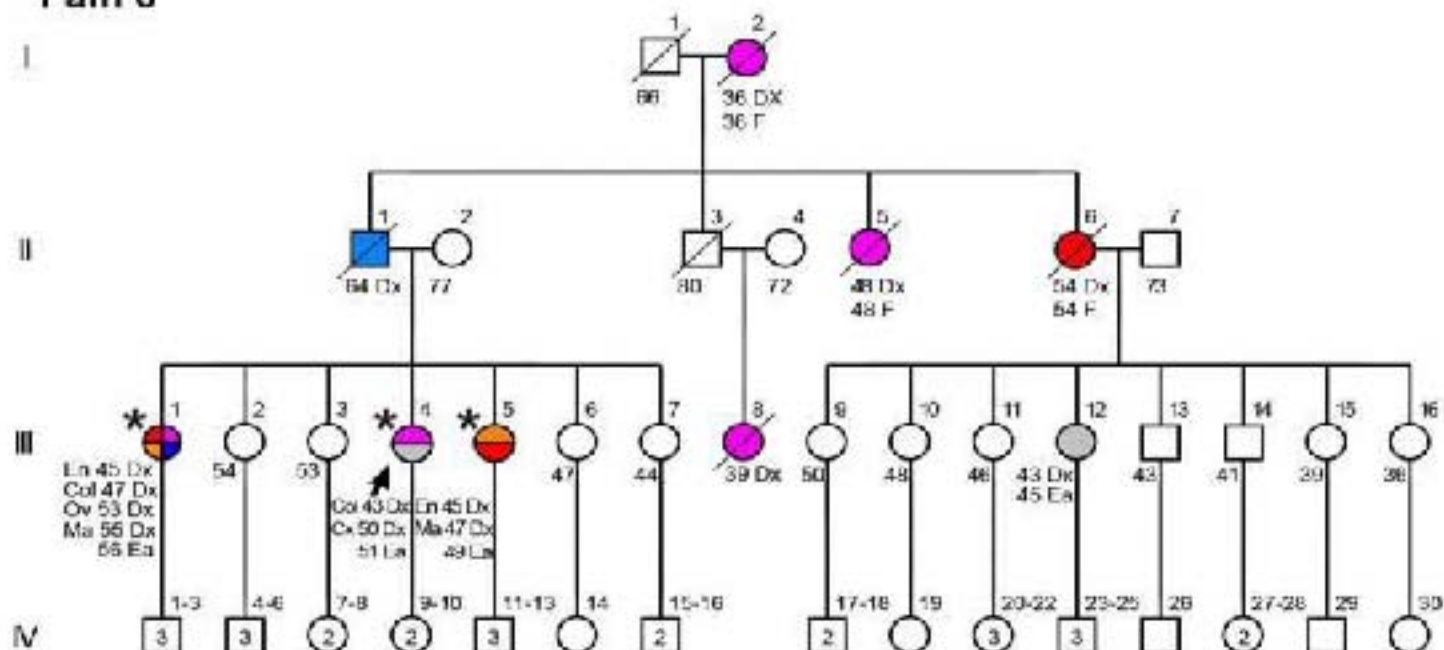


Figura 9.

- , ○ Hombre, Mujer sanos
- 1 2 Número de miembro de la familia
- ↗ Caso índice Probando
- ☐ ☉ Total de hijos
- Fallecidos
- Dx: Edad al diagnóstico
- F: Edad al fallecimiento
- Ea: Edad actual
- I-IV: Generaciones estudiadas

- Colon (Col)
- Prostata (Pst)
- Mama (Ma)
- Ovario (Ov)
- Endometrio (En)
- Cervix (Cx)
- * T. múltiple

Fam 293

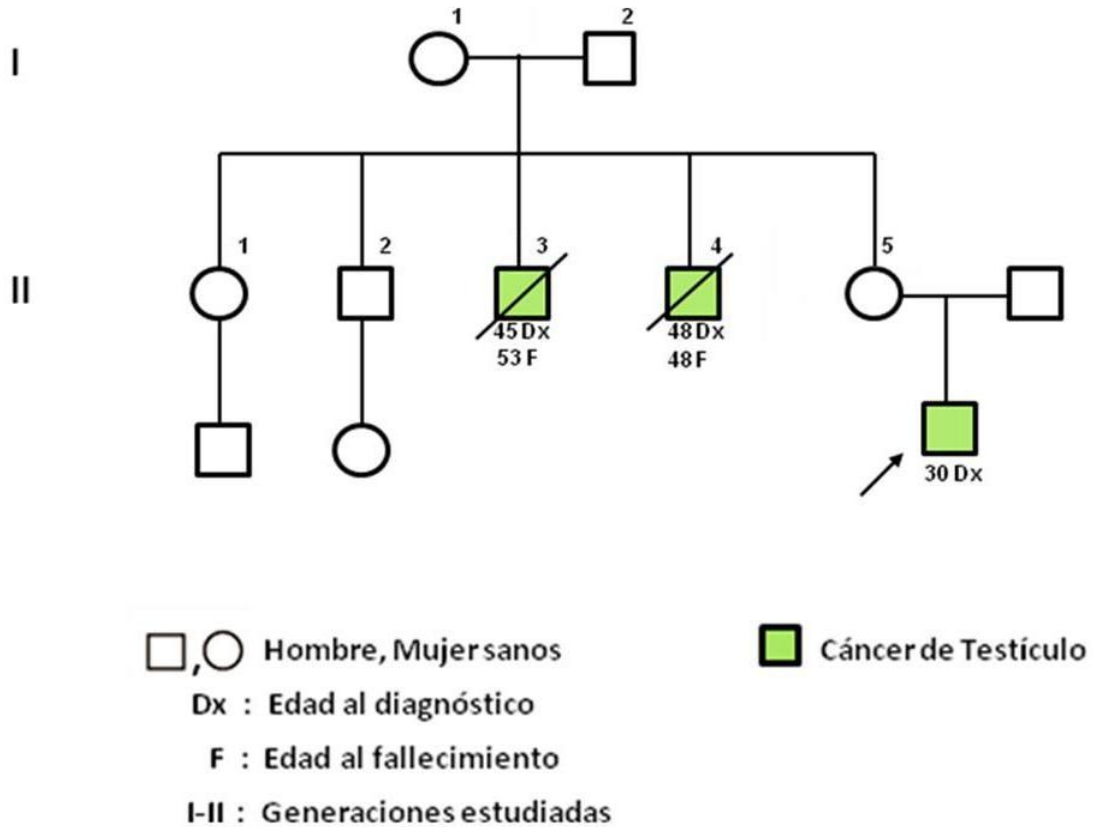


Figura 10.

Figura 9. Síndrome de Lynch. Criterios de evaluación: Criterios de Ámsterdam II (Criterios de Ámsterdam Revisados Vasen HF y cols;40) Debe haber por lo menos tres miembros con cánceres asociados (endometrio, ovario, gástrico, hepatobiliar, carcinoma de la pelvis renal o uretero) además de reunir: Un afectado debe ser familiar de primer grado de los otros dos. Al menos dos generaciones sucesivas deben estar afectadas (TV). Al menos uno debe ser diagnosticado antes de los 50 años de edad (ET). Los tumores deben ser verificados por patología. Los afectados muestran las neoplasias más frecuentes descritas en este síndrome: cáncer colorectal y cáncer de endometrio y neoplasias extracolónicas que se asocian a este síndrome indicadas en los afectados; algunos muestran ET, algunos con *MULTIS*, hallazgos frecuentes en este síndrome. Todos corresponden a la rama materna en tres generaciones sucesivas (TV).

Figura 10. Cáncer familiar de testículo. La agregación familiar muestra dos familiares de primer grado (hermanos) con cáncer de testículo, además de uno de 2º grado (sobrino) con esta neoplasia. En familias semejantes, la principal prueba para cuantificar el riesgo, sigue siendo la historia familiar. La estratificación de riesgo se determina a partir del número y grado de parentesco de los miembros afectados. Por el número de afectados y la proximidad del parentesco esta familia puede corresponder a riesgo elevado. Criterios de evaluación; Hampel y cols; 37).

Fam 214

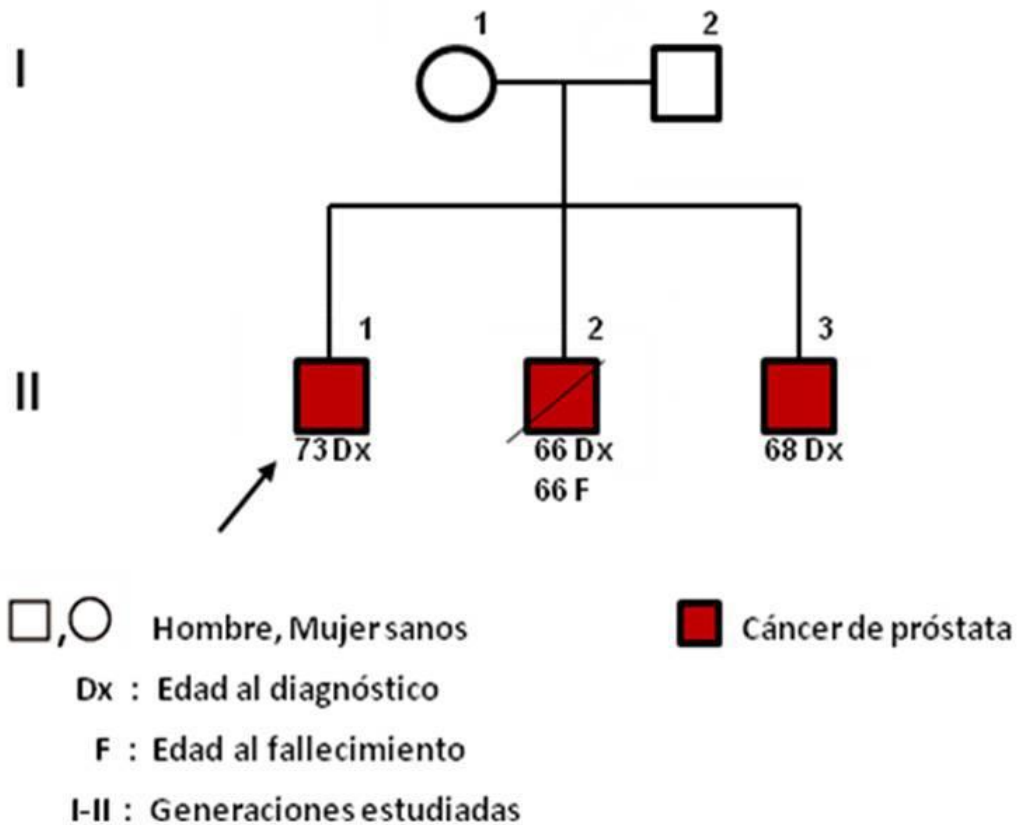


Figura 11. Cáncer familiar de próstata. Criterios de evaluación Hampel y cols; 37): Tres familiares afectados de cualquier edad con el mismo tipo de neoplasia.. Los criterios para cáncer de próstata de riesgo elevado se basan en que las familias tengan tres o más afectados. También es válido un criterio más laxo, que considera al menos dos afectados, pero uno menor de 60 años de edad; consideración en base al posible patrón de herencia ligado al sexo que limitaría el número de afectados, debido al estatus de no afectado de una madre o mujer portadora.

Fam 208

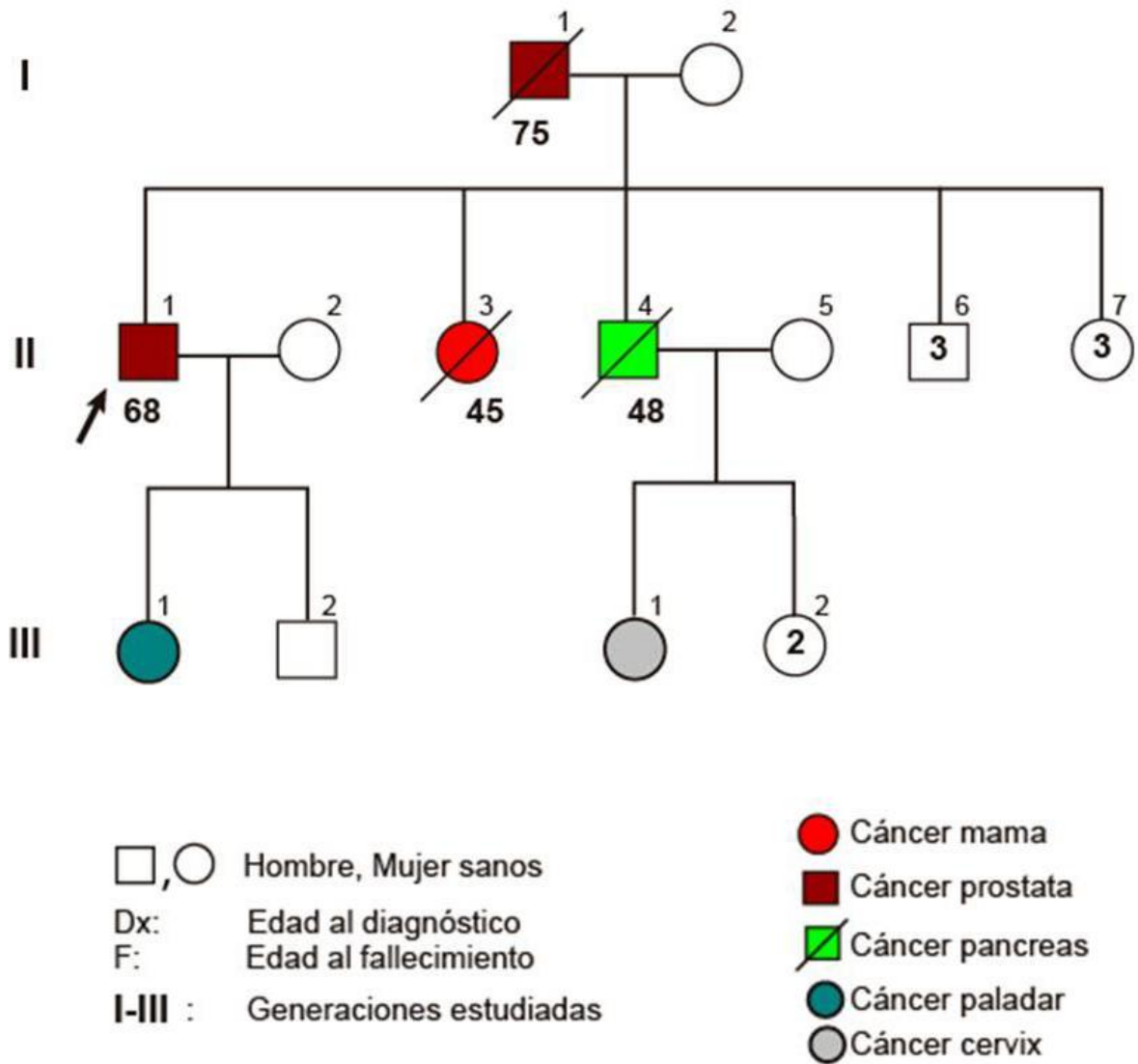
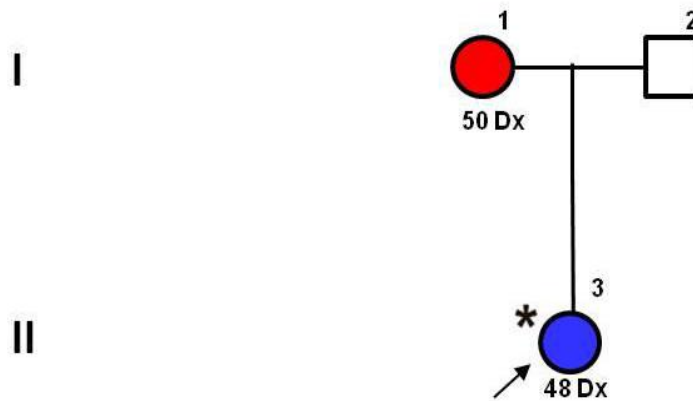


Figura 12. Cáncer hereditario: mama-ovario? El probando (↑) con cáncer de próstata y tres hijos afectados (TV) agregación que incluye: cáncer de próstata en padre e hijo, cáncer de mama (en mujer), cáncer del páncreas (en hombre) y otras neoplasias, que se transmiten con TV. Neoplasias frecuentes en el síndrome de cáncer de mama-ovario en portadores de mutaciones en el gen *BRCA2*. Apostolou P y cols; 38).

Fam 316



□, ○ Hombre, Mujer sanos

Dx : Edad al diagnóstico

F : Edad al fallecimiento

I-II : Generaciones estudiadas

● Cáncer de mama

● Cáncer de ovario bilateral

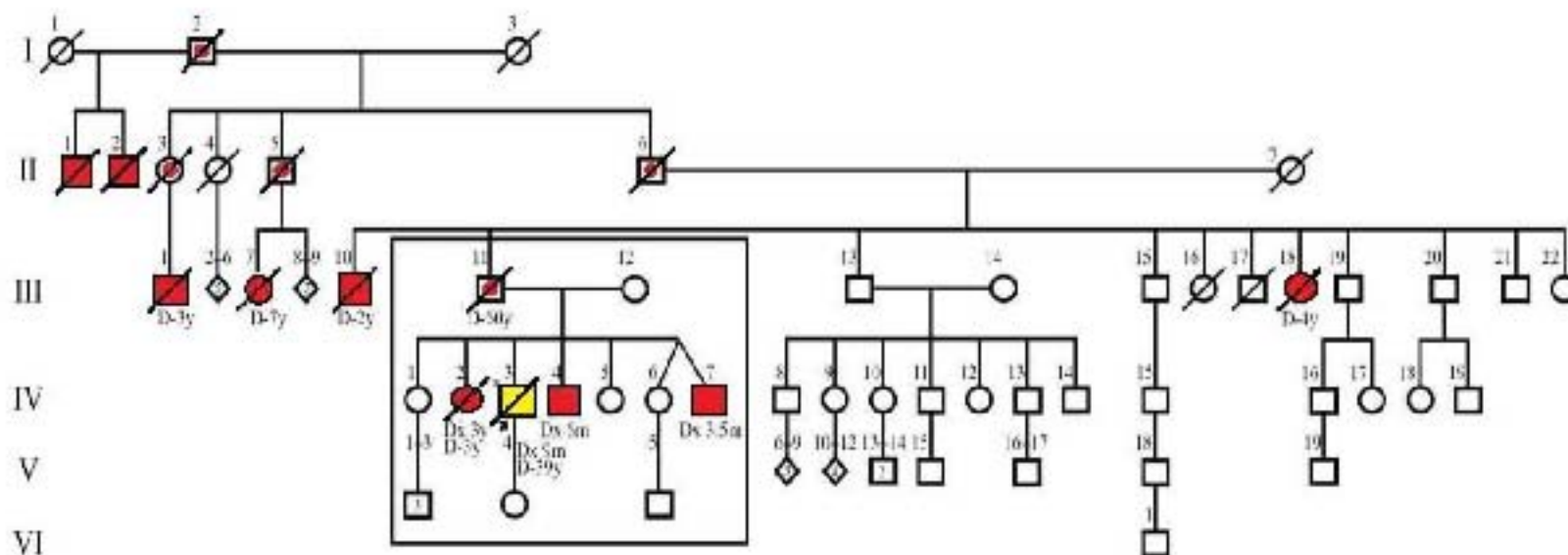
* Tumores *multis*

Figura 13

Figura 13. Cáncer hereditario mama-ovario. Criterios de evaluación riesgo elevado: NCCN compilados por Hampel y cols.; 37) historia personal (↑) de cáncer de ovario, uno o más familiares cercanos con cáncer de mama \leq a 50 años de edad. Se observa TV por medio de la madre, quién desarrolló cáncer de mama. La propósita (↑) además presenta tumor primario en ambos ovarios bilateral (*MULTIS*).

Figura 14. Retinoblastoma unilateral. El pedigree de esta familia muestra un árbol genealógico característico de retinoblastoma hereditario, con varios afectados de la generación II a la IV en el que es evidente la transmisión TV (con PI). La familia nuclear del recuadro muestra al caso índice, él y tres hermanos (IV-2, 3 y 4) presentaron retinoblastoma unilateral de inicio ET; además el caso índice presentó el criterio de tumores *multis* (retinoblastoma y melanoma). En el recuadro de la derecha se destaca el número total de afectados y portadores.

Fam RBF60



- Hombre sano
- Mujer sano
- Retinoblastoma Unilateral
- Caso índice: Retinoblastoma Unilateral, Melanoma
- ◻◻ Portador obligado
- ◇ Numero total de hijos
- ⊃ Defunción: edad al Dx. edad de defunción.
- I-IV: Generaciones estudiadas

Generación	Afectado		Portador obligado	
	Hombres	Mujeres	Hombre	Mujer
I			1	
II	2		2	1
III	2	2	1	
IV	3	1		
TOTAL	7	3	4	1

Figura 14

El proceso de tamizaje y la respectiva aplicación de criterios de discriminación, demuestra que cada etapa de esta metodología, es progresivamente más selectiva hacia familias sugestivas de síndromes específicos consecutivos a alteraciones de los genes particulares. Debido a que el análisis involucra a todos los miembros de cada familia nuclear (ambos padres e hijos) y al conjunto de estas que conforman la genealogía completa, se puede seguir la transmisión de un rasgo o enfermedad a través de cada generación y determinar con confiabilidad: **a)** el patrón de herencia mendeliana (áutosómico dominante, recesiva, ligada al sexo) que se transmite en la genealogía completa, **b)** determinar si alguna de las familias nucleares que la conforman muestra variación en comparación al patrón general de la genealogía, **c)** la combinación de este análisis con criterios particulares (en este estudio para identificar propensión a cáncer) aumenta la probabilidad de identificar la transmisión de alteraciones moleculares de genes específicos (que se propone estudiar) y facilita discriminar dentro de la misma familia, a las personas portadoras de las libres de la alteración familiar (22,25,36).

En base a las bondades de esta metodología se seleccionó la familia portadora de retinoblastoma para someter a prueba, la hipótesis que se desarrolla en la segunda parte de esta investigación.

VI. DISCUSIÓN

Los 650 casos estudiados representan una muestra del 7.6% del total de los casos de primera vez que captó el hospital, durante el mismo lapso en el que se realizó esta investigación. La frecuencia por género fue semejante, el 49.3% (265 casos) correspondió a mujeres y el 50.6% (368 casos) a hombres; con mediana de edad de 59 años. Las localizaciones más frecuentes en orden de frecuencia correspondieron a cáncer de mama, colon, recto, próstata como se observan en la Tabla 1.

En un estudio epidemiológico realizado en el mismo hospital, para conocer la frecuencia, tipo distribución y tendencia de la morbilidad de pacientes con cáncer, Martínez-Sánchez y cols. (41) encontraron mayor frecuencia de mujeres (60%), mientras que en el presente estudio la frecuencia en ambos géneros fue semejante. En cambio la mediana de edad y las localizaciones de cáncer, resultaron semejantes en ambos estudios. Nuestros resultados contrastados con los del estudio mencionado (41), indican que el tamizaje genético estuvo correctamente aleatorizado ya que, los resultados de ese estudio pueden ser más representativos puesto que se analizó la población captada en el lapso de 8 años. El tamizaje realizado coincidió con uno de esos años.

El porcentaje de casos (40.6%) con antecedente de cáncer (ACA), es semejante al encontrado en un estudio de casos y controles en niños derechohabientes del IMSS, con diagnóstico de cáncer para identificar factores hereditarios (42). Los altos porcentajes encontrados tanto en familias de niños como en las de adultos,

posiblemente reflejen la alta prevalencia de estos padecimientos en la población general, consecutivos a múltiples factores (1,6) o alta frecuencia de estos padecimientos en la población derechohabiente del IMSS (42,43). Solo el 27% de los casos tamizados presentó por lo menos un familiar de primer grado afectado, lo que sugiere otra clase de componentes en la etiología. Este dato coincide con lo reportado por Hemminki quién señala a la alta frecuencia de familiares de primer grado afectados con cáncer, como evidencia de predisposición familiar (14). En relación a los criterios clínicos la frecuencia de ET (17%) es mayor en comparación con la frecuencia observada de los demás criterios. Sin embargo la frecuencia encontrada de ET, en el total de casos, no se pudo considerar en forma estricta ya que en México, las estadísticas sobre incidencia de neoplasias malignas en general son escasas (41,43). Esto dificulta conocer la edad de mayor ocurrencia de determinadas neoplasias en la población, importante para contrastar con la edad de ocurrencia en los casos familiares. Es conocido que en adultos, la incidencia de tumores se eleva considerablemente después de los 50 años de edad, por lo que en este estudio se tomó 40 años de edad, como criterio que podría ser válido; además de que esta edad también ha sido considerada como criterio de edad temprana en otros estudios (34,37). El análisis de ET en relación al antecedente de cáncer ACA (familiares con cáncer) se encontró sin riesgo significativo, a diferencia del elevado RR 16.7 para *T. MULTIS* altamente significativo (0.0003). De acuerdo a lo reportado, este solo hallazgo es indicativo de vigilancia médica especial en la persona que lo presente (23,24,37). En contraste, como se observa en la Tabla 2, el análisis de estos dos criterios ET y *T. MULTIS* en familias en las que el antecedente de cáncer conforma un patrón

de herencia, ya sea de TV o de PI, el RR es mayor a 5 veces (5.7) cuando alguno de los miembros presenta ET y más de 9 veces (9.62) si alguno desarrolla *T. MULTIS*. Los intervalos de confianza son muy amplios, probablemente se requiere una muestra mayor.

La penetrancia incompleta (PI) forma particular de herencia dominante que en la patología genética es de gran interés, debido a que entre otras, indica la presencia de genes de “menor penetrancia” que podrían tener efecto fenotípico moderado; en los padecimientos neoplásicos familiares, también se observa esta modalidad de herencia (44). Es importante identificarla, por la posibilidad de analizar con nuevas tecnologías, no solo genes que confieren riesgo elevado por ser altamente penetrantes como *BRCA1/2* o *MMR (HMLH1, PMS1, etc.)* sino además, genes de riesgo moderado o estándar, que en conjunto ayuden a explicar diferentes tipos de agregaciones de cáncer, e incidir en medidas de detección y prevención más efectivas en mayor número de familias (38,45,46).

Los resultados respecto a los criterios clínicos (ET, *MULTIS*, TV) revelaron que el 9.2% de las familias podría tener riesgo elevado por la posibilidad de corresponder a un síndrome de susceptibilidad hereditaria. Este resultado confirma lo reportado en la literatura en que casi sin excepción, las familias portadoras de síndromes hereditarios muestran estas características esenciales (22,25,36,37). Lo que indica que la historia personal y el “pedigree” completo son las pruebas iniciales para continuar el estudio y confirmar esta posibilidad, por medio de los estudios moleculares correspondientes y poder identificar con mayor probabilidad personas con mayor riesgo (36,37). Esta metodología ha demostrado que, la probabilidad de encontrar genes anormales en ellos, es mucho mayor y

confiable que, en las personas o familias que no reúnen estas características (22,23 36,37).

En el diagrama de la figura 4, se observa la utilidad del análisis con criterios de alto riesgo, ya que en el 3.8% (25 casos) se pudo identificar síndromes de susceptibilidad, en los que está indicado el análisis de genes considerados de alto riesgo; mientras que en el 5.3%, estos criterios sugieren análisis en genes de riesgo moderado que también se han asociado a susceptibilidad hereditaria, como los anotados en la Tabla 3 (38,45,46).

Mediante los criterios de alto riesgo se identificaron 8 familias 10% del total de las 84 (con cáncer de mama), captadas en el estudio, con posible síndrome de cáncer de mama-ovario. Porcentaje que coincide con lo reportado en relación a que solo, entre el 5 al 10% de los casos, muestra un componente hereditario “fuerte” y de estos, entre el 4 al 5% se explicarían por mutaciones en genes altamente penetrantes que se transmiten con patrón dominante como *BRCA1* y *BRCA2* que son los genes comúnmente mutados (38).

Con los avances tecnológicos se han identificado nuevos genes asociados a cáncer de mama hereditario, tanto de alta como de penetrancia intermedia. Algunos asociados a otros cánceres como ovario, páncreas, colorectal. Sin embargo, para realizar cualquier prueba molecular, en particular estos paneles (38,45), se deben seguir recomendaciones específicas y determinados criterios que los pacientes deben reunir. Con estos paneles se podría estudiar el 5.3% que por el momento se dificulta clasificar (38,45-47). Este último punto es relevante particularmente en familias como las que se ilustraron con cáncer de

mama y cáncer gástrico o bien cáncer de mama y cáncer de páncreas, en las que aún se desconoce si forman parte del síndrome original, si es un síndrome diferente o es una variante puesto que se han encontrado, como se observa en la tabla 3, mutaciones en otros genes que confieren diferentes rangos de riesgo (38,39).

Por otro lado, no todas las familias portadoras del mismo síndrome tienen los mismos genes mutados, como por ejemplo en el síndrome de Lynch. En estos pacientes, el tamizaje, debe incluir las historias personal y familiar, inmunohistoquímica en los tumores para la identificación de deficiencia en los genes MMR (de reparación). Esta batería de estudios es necesaria antes decidir hacia cual de los 4 genes involucrados en este síndrome, orientar el análisis, o que prueba molecular analizar en una familia particular (48,49).

Entre los aspectos importantes en el estudio de familias susceptibles, está el relacionado al patrón de herencia. Con alguna frecuencia se observa que los transmisores de mutaciones patogénicas son sanos o, que las neoplasias son más prevalentes en alguno de los géneros, como el caso de la familia que se muestra en la figura 14 portadora de retinoblastoma. Aún cuando este padecimiento es dominante, se encontró penetrancia incompleta porque los transmisores son sanos. Esto indica que el tipo de mutación posiblemente no sea del tipo habitual descrito y en estos casos, es necesario un análisis genético-clínico más detallado para proponer el análisis molecular correspondiente. Al respecto, las características clínicas que muestra la familia mencionada (Figura 14) sugirieron análisis molecular dirigido a identificar alteraciones epigenéticas, específicamente metilación en el promotor del gen *RB1*, para tratar de explicar la

penetrancia incompleta, el exceso de hombres afectados y portadores así como el desarrollo unilateral de retinoblastoma. Características que se desvían de lo esperado para un padecimiento autosómico dominante, como lo es el retinoblastoma. Para lo cual se propuso probar la hipótesis, que constituye la segunda parte de este trabajo.

VII. CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos indican que el estudio de las familias donde varios de sus miembros enferman de cáncer, es una actividad de gran relevancia. Saber que el 5% de los pacientes de primera vez de un hospital de alta especialidad oncológica, pueden ser portadores de síndromes de susceptibilidad, implicaría establecer medidas de detección precoz. Acciones que podrían tener gran repercusión familiar e institucional, por la posibilidad de mejorar el tratamiento y pronóstico si se detectan oportunamente, cuando la enfermedad es mínima, (a diferencia de un estado avanzado frecuentemente fatal); lo cual conlleva a incremento de costos emocional, familiar, laboral y económico institucional (39,43). Se demuestra además que la historia oncológica personal y familiar, es imprescindible no solo para llegar al diagnóstico genético-oncológico sino que además es fundamental para orientar individualmente el estudio molecular y profundizar con nuevas tecnologías el estudio de estos padecimientos.

VIII. PERSPECTIVAS.

1. La identificación de familias susceptibles a cáncer es potencialmente un método altamente efectivo para la detección precoz y prevención oportuna de las enfermedades neoplásicas. Su efectividad podría ser mayor en las unidades de alta especialidad que cuentan con la tecnología y grupos multidisciplinarios, para el mejor manejo y estudio de esta población en riesgo (38,39).
2. El estudio de este tipo de familias puede ser sumamente estimulante, puesto que cada familia representa un reto para proporcionar un diagnóstico genético-oncológico y molecular, lo más preciso posible; Información indispensable para el asesoramiento genético y de gran apoyo para establecer el tratamiento y pronóstico a nivel individual y familiar. Aspectos que representan una fuente inagotable de posibilidades para avanzar en el conocimiento básico de estas enfermedades.

SEGUNDA PARTE

METILACIÓN GERMINAL DEL PROMOTOR DEL GEN *RB1* COMO MECANISMO DE SUSCEPTIBILIDAD EN RETINOBLASTOMA HEREDITARIO

I. INTRODUCCIÓN

1. REGULACIÓN EPIGENÉTICA

En las últimas décadas la epigenética ha revolucionado el campo de la biología retando al clásico código genético como el determinante clave del funcionamiento génico celular y sus alteraciones como causa mayor de enfermedades humanas. El vertiginoso avance ha permitido reconocer su gran potencial al regular procesos requeridos para preservar la identidad celular y el origen de las enfermedades.

C.H. Waddington definió por primera vez el término epigenética en 1942 en el contexto de la biología del desarrollo embrionario como “el estudio de los procesos por los cuales el genotipo conduce hacia un fenotipo”, bajo la premisa *epigénesis + genética = epigenética*, aclarando el debate de la época sobre *epigénesis vs preformacionismo* de la embriología neoclásica y así, unir la epigénesis a la biología del desarrollo, y el preformacionismo a la genética (50). Jacob puso punto final al añejo debate entre la epigénesis y el preformacionismo al introducir el concepto de “programas de desarrollo” (51). No obstante, en el

curso del tiempo, el uso del término epigenética ha evocado una variedad de procesos biológicos. Históricamente, esta palabra comienza a aparecer a partir de los años 60 en algunos artículos científicos generalmente relacionados con modificaciones de la actividad génica por metilación del DNA o, con estados de condensación de la cromatina (51).

A pesar de décadas de investigación y debate, aún no hay consenso en la definición ni en el uso del término (52). Un concepto ampliamente referido es: que la epigenética tiene que ver con el estudio de cambios heredables en la expresión génica que ocurren independientes de cambios en la secuencia primaria del DNA (53). Esta heredabilidad de patrones de expresión ocurre durante el desarrollo y se mantiene a través de múltiples ciclos de división celular, durante los cuales, los precursores de esas células conforman su destino, en un proceso de diferenciación por etapas, que es dirigido por una multitud de componentes (de posición, señalamiento, etc.) mediado por modificaciones epigenéticas. Entre estas modificaciones se incluyen la metilación de la base citosina del DNA, modificaciones postraduccionales de las histonas, el posicionamiento de los nucleosomas en el DNA, RNAs pequeños y la posición de los diferentes genes dentro del núcleo. A estas modificaciones colectivamente se les refiere como el epigenoma; el cual confiere un mecanismo para la diversidad celular, al regular la información genética que debe ser accesada por la maquinaria celular (53,54). La herencia de las marcas epigenéticas en particular la metilación del DNA, confiere una memoria molecular que asegura la herencia fiel de los programas transcripcionales durante el desarrollo (55). Los cambios epigenéticos forman barreras para asegurar que la especificación del tipo celular sea hacia una sola

vía; de esta manera, las células de un organismo adulto quedan comprometidas a realizar funciones altamente especializadas o a permanecer en un “pool” de células “stem” (progenitoras) adultas con un potencial limitado. Fallas en el establecimiento o mantenimiento adecuado, pueden ocasionar inactivación o activación inapropiada o inhibir vías de señalamiento que pueden conducir a diversos estados patológicos incluyendo cáncer (53,56). Dado la importancia de las marcas epigenéticas en la fisiología normal y la trascendencia que tienen en la etiopatogenia de enfermedades humanas cuando se presentan irregularidades en su establecimiento, amerita señalar algunos aspectos básicos de la dinámica epigenética durante el ciclo de vida de mamíferos, enfocados: 1) al aspecto de metilación del DNA, 2) al de impronta genómica (reprogramación) en las células germinales primordiales (primordial germ cells (PGCs) y en la preimplantación del embrión (55-57). Lo anterior con el propósito de ubicar en el contexto de “herencia epigenética” la propuesta central de este trabajo: Metilación germinal del promotor del gen *RB1* como mecanismo de susceptibilidad en retinoblastoma hereditario.

2. METILACIÓN DEL DNA

2.1 En la fisiología normal.

Aunque los principios básicos de la reprogramación epigenética en el embrión y en las células germinales han sido estudiados desde hace mucho tiempo, algunos aspectos incluyendo la dinámica de estos procesos siguen siendo enigmáticos, indicativo de la gran complejidad de este fenómeno. Sin embargo dos aspectos han permitido avanzar en el campo: **a)** Los estudios mediante plataformas de secuenciación de siguiente generación han facilitado el análisis epigenético a gran escala del genoma humano, sorprendentemente con una cantidad mínima de material biológico y, ahora se tiene conocimiento sobre el estado epigenético de las células germinales y del embrión en etapas tempranas (58); **b)** El otro punto relevante se refiere a la identificación de actividades enzimáticas que inician el borrado activo de la metilación del DNA en las células germinales y en las células somáticas del embrión; hecho que ha contribuido a descifrar uno de los enigmas que ha prevalecido por mucho tiempo (59).

2.2 La “quinta base” 5-metilcitosina y sus funciones.

La metilación del carbono 5 de la citosina produce 5-metilcitosina (5mC), referida como la “quinta base” del DNA (Figura 15). Aún cuando desde principios de los años 20 Johnson reportó la 5-metilcitosina como constituyente de los ácidos nucleicos del bacilo de la tuberculosis y en los años 40 el DNA metilado fue identificado en mamíferos, las funciones biológicas permanecieron sin caracterizar por décadas (60,61).

En 1975 dos estudios demostraron el importante papel que esta modificación ejerce sobre la expresión génica y destacaron el significado del “quinto nucleótido” en la biología de eucariotes (62,63). Al final de los años 80 comienza a ocupar un lugar importantísimo en la genética de mamíferos, con el reporte de tres grupos que demostraron que la expresión de transgenes depende del progenitor que lo transmita, además de encontrarse metilado el transgen que no se expresa (64-66).

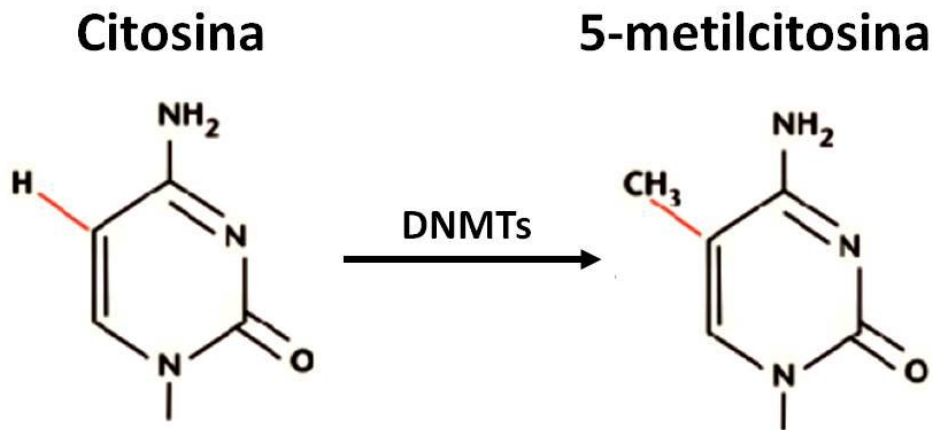


Figura 15. 5-metilcitosina. La posición 5 de la citosina es covalentemente metilada por DNA citosina metiltransferasas (56).

La metilación del DNA se encuentra en eucariotes desde hongos hasta vertebrados, en los que su significado y función varía ampliamente. Inicialmente no se había detectado metilación del DNA en *Drosophila melanogaster*, sin embargo se ha demostrado un nivel bajo de metilación en estadios tempranos del desarrollo. En contraste en *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* aparentemente no se presenta este fenómeno. En los mamíferos es vital

para el desarrollo y la homeostasis durante la vida adulta. Durante esta etapa normalmente se encuentra en la posición 5' de las citosinas presentes en los dinucleótidos CpG, frecuentemente en un contexto de CpG simétricos. Los primeros metilomas globales mostraron una distribución bimodal de CpGs. Aquellos que se encuentran solos o aislados unos de otros generalmente están hipermetilados (60-90%) dependiente del tipo celular; otros, se encuentran en regiones de 500 a 2000 pb de longitud, donde su densidad está incrementada conformando las llamadas islas CpG (CGIs); estas generalmente se encuentran en los promotores génicos y permanecen predominantemente hipometiladas (67; Figura 16).

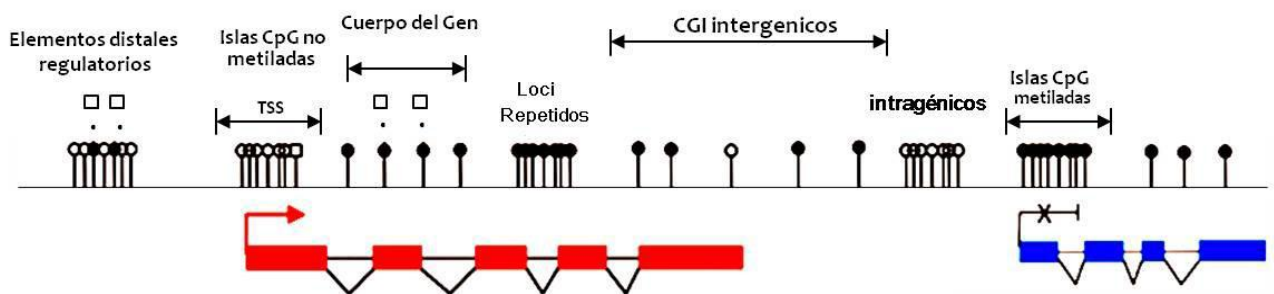


Figura 16. Distribución de la metilación de los dinucleótidos CpG en el genoma de vertebrados. Los CpG generalmente están altamente metilados (■). Las CGIs en el extremo 5' de los promotores génicos asociadas con los sitios de inicio de la transcripción (TSS) se encuentran sin metilar (☐) y se correlacionan positivamente con actividad transcripcional (exones cajas en rojo). En un pequeño número de genes están hipermetiladas, reprimidas y silentes de manera célula tipo-específico (cajas azules). En el cuerpo del gen a menudo se encuentran metiladas (□ en el cuerpo del gen). Tomada de Meng H y cols.; 56).

2.3. Papel de la metilación del DNA en el control transcripcional.

Las CGIs se encuentran principalmente en los promotores de los genes ligados al desarrollo o en los promotores de los genes constitutivos donde se mantienen hipometiladas. Históricamente la metilación del DNA se ha ligado a represión transcripcional. Sin embargo el análisis detallado de las CGIs asociadas a los promotores y su efecto sobre la actividad transcripcional, ha permitido clasificarlas en categorías en base al contenido de CpGs, y a la longitud de su secuencia: **LCPs** (“Low”) estos promotores con baja densidad de CpGs, generalmente están hipermetilados y con transcripción activa, independiente de su estado de metilación; **ICPs**, (intermediate) son promotores con densidad intermedia de CpGs; se inactivan cuando se metilan, sin embargo con frecuencia la hipermetilación en este tipo de islas es diferenciación-dependiente; por ejemplo la que ocurre en el promotor de genes de pluripotencia o, en promotores de genes célula-germinal específica, donde se cree que la metilación actúa como un mecanismo de seguridad, para reforzar el mecanismo de silenciamiento durante la diferenciación; **HCPs** (High), en contraste estos promotores con alta densidad de CpGs es muy raro que se encuentren metilados. De hecho, se ha observado que la excepcional metilación encontrada en HCPs ocasiona eficiente silenciamiento génico; lo cual apoya el concepto tradicional que la metilación del ADN reprime la transcripción (55,67,68; Figura 17).

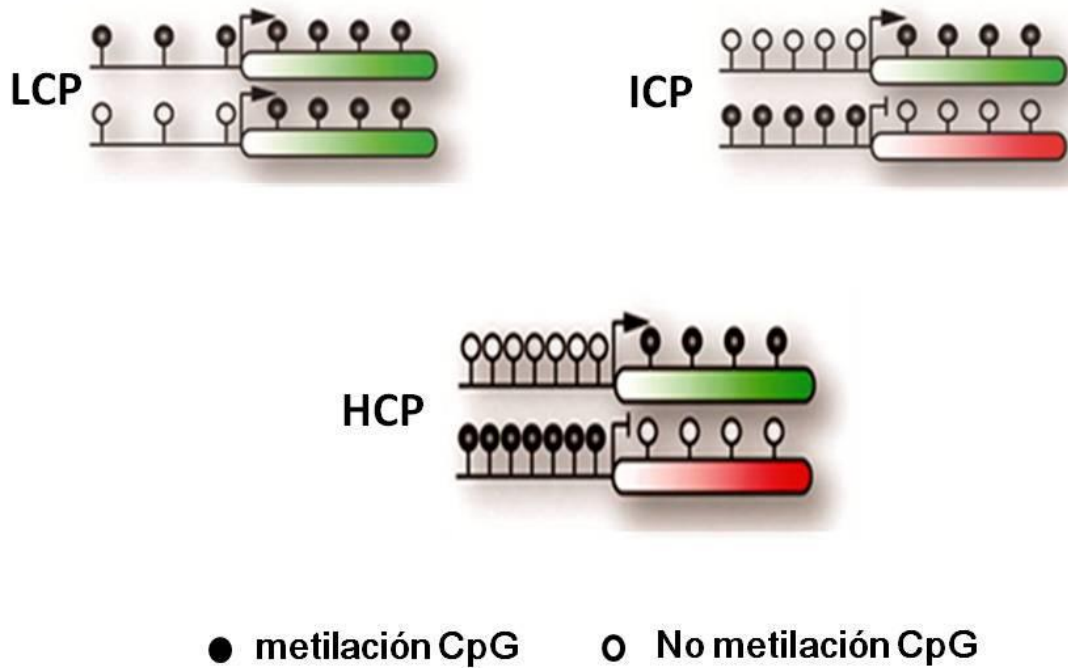


Figura 17. Tres categorías de promotores génicos y respuesta diferencial a metilación, de acuerdo a la densidad de CpG: **LCP** promotores con baja densidad de CpG. generalmente están hipermetilados, permanecen activos independientemente del estado de metilación como indica la flecha. **ICP** promotores con densidad intermedia de CpG se inactivan cuando se metilan (indicado con la barra roja) la metilación es diferenciación-dependiente. **HCP** promotores con alta densidad de CpG; generalmente están hipometilados, la metilación genera silenciamiento (barra roja). Modificada de Messerschmidt DM y cols.; 55).

En otras regiones del genoma también, se han observado patrones de metilación como en “enhancers” (elementos distales de regulación); la hipometilación de estas secuencias se ha correlacionado con expresión génica e interacción con promotores, favoreciendo la diferenciación tejido-específico; en cambio la metilación de estos “enhancers”, se ha observado estrechamente relacionada con cambios de expresión génica en células neoplásicas.

La metilación del DNA también juega un papel muy importante en otras regiones distintas (55): transposones, repetidos pericentroméricos, inactivación del cromosoma X y en los genes improntados (Figura 18).

a) Transposones. La metilación del DNA se ha conservado durante la evolución reprimiendo estos elementos móviles, particularmente LINEs (elementos nucleares largos dispersos) y LTR (repetidos terminales largos); los cuales conforman el 40% del genoma humano, por lo que contribuyen significativamente con el estado de hipermetilación total del genoma. La pérdida de metilación de estas secuencias puede causar activación transcripcional masiva y retrotransposición.

b) Repetidos pericentroméricos. Estos elementos muestran actividad transcripcional latente, la cual se mantiene reprimida por metilación del DNA, que es fundamental durante el alineamiento y segregación cromosómica. En contraste, la transcripción continua de estos repetidos origina alineamiento erróneo de los cromosomas durante la mitosis. La importancia de mantener esta represión también es evidente en el

síndrome de inmunodeficiencia y en el síndrome de anomalías faciales (ICF) consecutivos a inestabilidad centromérica.

- c)** Inactivación del cromosoma “X”. En el género femenino, la metilación del ADN media el control de la dosis génica, vía inactivación del segundo cromosoma X. La metilación resulta de una cascada de eventos que se inicia con la activación en *cis* de RNA no codificante, *Xist* el cual cubre al cromosoma X promoviendo el desplazamiento de factores de transcripción, cambios de cromatina y, finalmente metilación de la isla CGI del promotor. Los estudios sugieren que este proceso de metilación en el cromosoma X inactivo es, mantener a largo plazo la inactivación, más que iniciarla.
- d)** Genes “improntados”. El atributo característico de este tipo de genes es su expresión progenitor-específico, la cual se establece y mantiene por metilación diferencial del DNA (de alelos maternos o paternos) coordinada por los centros de control de “imprinting” (ICRs), mediante mecanismos como la unión de proteínas insulador o la expresión antisentido de RNA no codificantes, que conllevan a la expresión o represión alelo-específico de un conglomerado de genes Figura 19. Esta metilación progenitor-específico, ocurre durante la diferenciación de los gametos y se mantiene durante toda la vida.

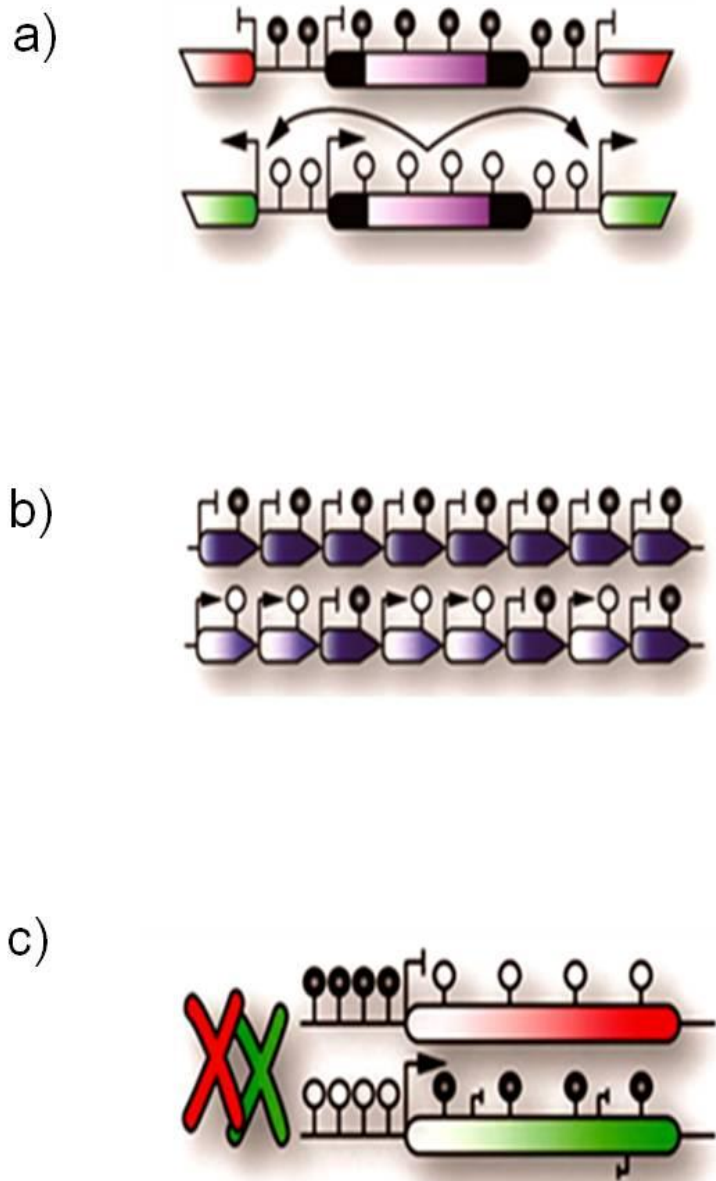
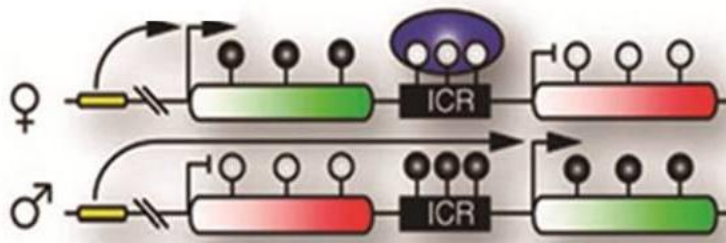


Figura 18. Metilación en distintas regiones del genoma. En **a)** Retrotransposones, son reprimidos por metilación del DNA, la desrepresión puede ocasionar coactivación de genes vecinos como lo indica la flecha; **b)** Repetidos centroméricos, la transcripción basal interfiere con el alineamiento cromosómico y es reprimida por metilación del ADN; **c)** Cromosoma X, la metilación del DNA refuerza el silenciamiento del cromosoma X inactivo (cromosoma en rojo). Modificada de Messerschmidt DM y cols.; 55).

a)



b)

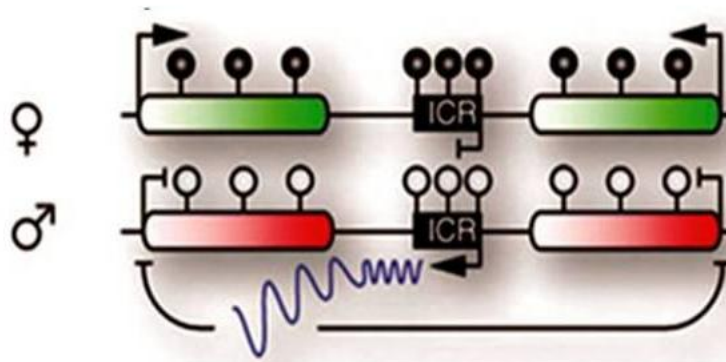


Figura 19. Imprints genómicos y expresión alelo específica. En **a)** La metilación en las regiones de control de impronta (ICR) regula la unión de proteínas "insulator". En el gameto materno a ICR sin metilar, se unen proteínas "insulator" (morado) que impiden la transcripción río abajo (barra roja), silenciando al alelo materno (barra roja); **b)** La ausencia de metilación en el ICR en el gameto paterno, permite la expresión antisentido de un RNA no codificante (ncRNAs) que actúan en *cis* y bloque la expresión del alelo paterno. Modificada de Messerschmidt DM y cols.; 55).

2.4. Maquinaria de metilación del DNA.

El papel clave en el mantenimiento de metilación del DNA, (aunque aquí simplificado), está representado por la ADN metiltransferasa 1(Dnmt1) y la proteína nuclear 95 (NP95 o UHRF1). ADN metiltransferasas catalizan el traslado de un metilo de S-adenosil-1-metionina a la posición 5 de residuos de citosina de dinucleótidos CpG (Figura 20). El posicionamiento predominante de CpGs simétricos, permitió la propuesta inicial de herencia de la metilación, por medio del mecanismo de replicación semiconservativa del ADN, que implicó dos modos de actividad de metilación: de mantenimiento y *de novo* (63).

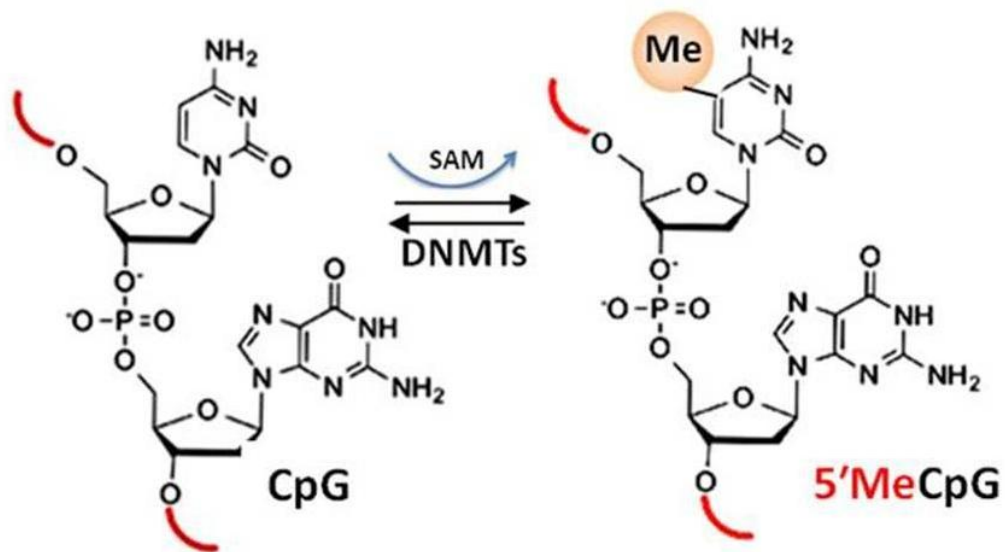


Figura 20. Metilación de la citosina en los dinucleótidos CpG. La metilación de dinucleótidos CpG por ADN metiltransferasa (DNMT) ocurre sobre el carbono 5 de la citosina en presencia del cofactor SAM: S-adenosil-metionina (donador del grupo metilo CH₃).

2.5. Mantenimiento de la metilación.

La primera enzima con actividad de metiltransferasa (DNMT1) identificada en eucariotes mostró gran afinidad por CpGs hemimetilados (69). La proteína URF1 (NP95) (70) reconoce ADN hemimetilado en la horquilla de replicación, donde recluta específicamente a DNMT1, la cual copia las marcas de metilación de la cadena parental a la cadena hija recién sintetizada, como se observa en el recuadro rosa de la figura 21. La importancia de mantener la metilación se evidencia al deletar al gen de la *Dnmt1* de ratón después de la gastrulación, pues ocasiona letalidad, resultante de la pérdida global de metilación (71). En contraste las metiltransferasas *de novo* DNMT3A, DNMT3B y su cofactor DNMT3L, no dependen de ADN hemimetilado y pueden establecer nuevos patrones de metilación de ADN como se observa a la derecha de la figura 21. La primera, establece los patrones de metilación del ADN en ICRs en los gametos (masculino y femenino). *Dnmt3b* se expresa considerablemente en la etapa de blastocisto, restringida al linaje del epiblasto; la delección génica causa letalidad embrionaria. DNMT3L actúa como cofactor activador de DNMT3A/B en los ICRs en los gametos (72).

La metilación del ADN es una marca de control epigenético esencial para el desarrollo normal en mamíferos y el mantenimiento de los patrones de expresión hacia sus futuros linajes tejido específico. Constituye una barrera que guía y restringe la diferenciación e impide la regresión hacia un estado indiferenciado. También desempeña un importante papel en la compensación de dosis de los

cromosomas sexuales, la represión de retrotransposones que amenazan la integridad del genoma y en la expresión coordinada de los genes improntados.

En las últimas décadas el avance del conocimiento en este campo ha permitido ampliar la importancia de la metilación del ADN no solo como el proceso dinámico de transmisión de marcas epigenéticas, sino como un factor involucrado en diversos procesos regulatorios y en la patofisiología de múltiples enfermedades incluyendo cáncer.

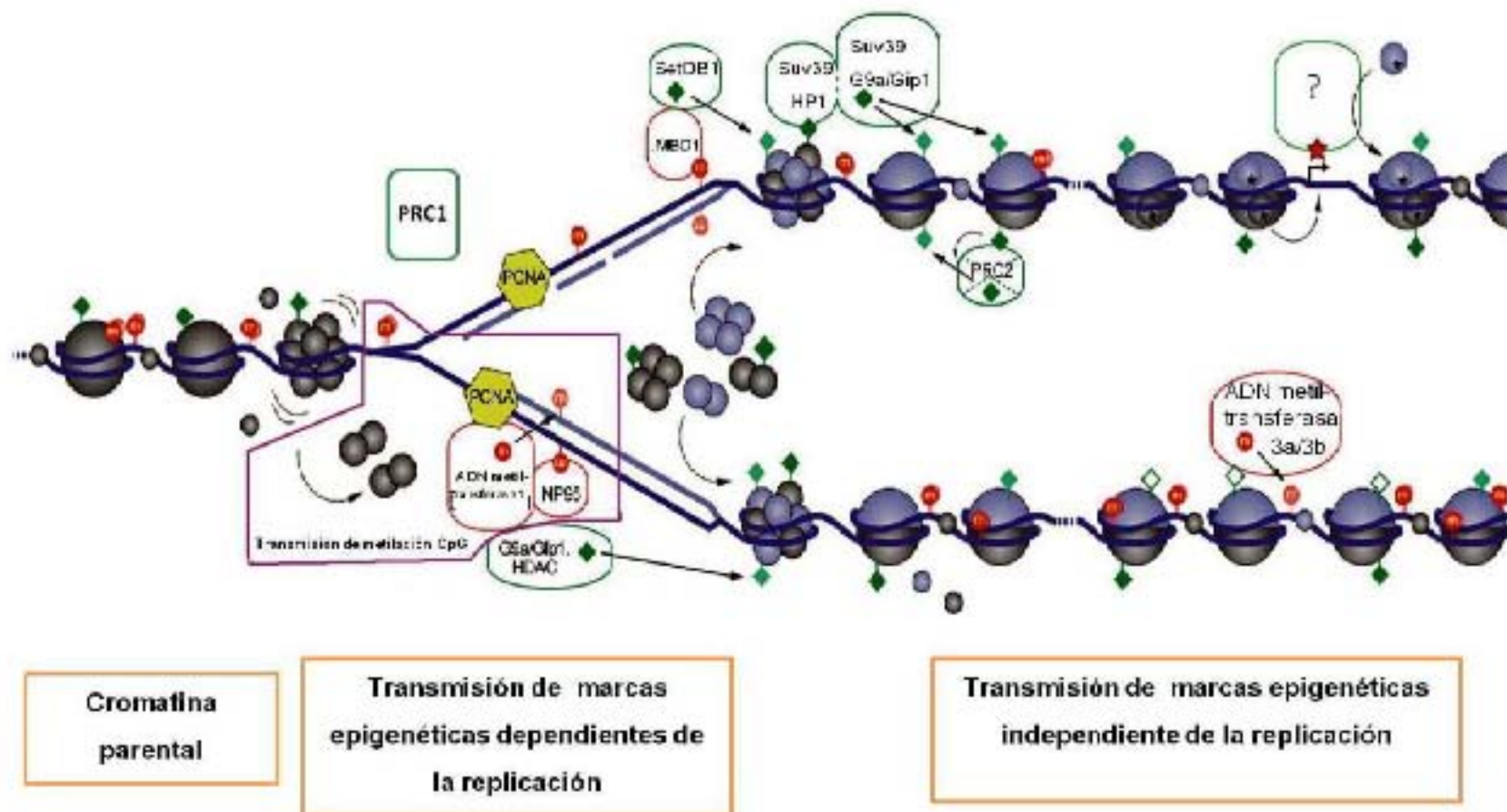


Figura 21

Figura 21. Mecanismos de mantenimiento de metilación del DNA. Los mecanismos responsables del mantenimiento de metilación del DNA pueden ser: dependiente de la replicación como se muestra en el recuadro rosa dentro de la horquilla de replicación del ADN, donde se indica la transmisión mitótica de marcas epigenéticas (metilos en círculos rojos), vía el acoplamiento de la maquinaria de replicación por DNAMT1, PCNA y NP95. A la derecha de la figura se observa el mecanismo independiente de la replicación, vía Dnmt 3a/3b. Figura modificada de Lange UC y cols.; 54).

2.6. Desmetilación del ADN.

En contraste con lo descrito sobre el mecanismo de metilación, además del mecanismo pasivo, en fechas recientes se ha identificado un mecanismo activo de desmetilación.

Mecanismo pasivo de desmetilación.

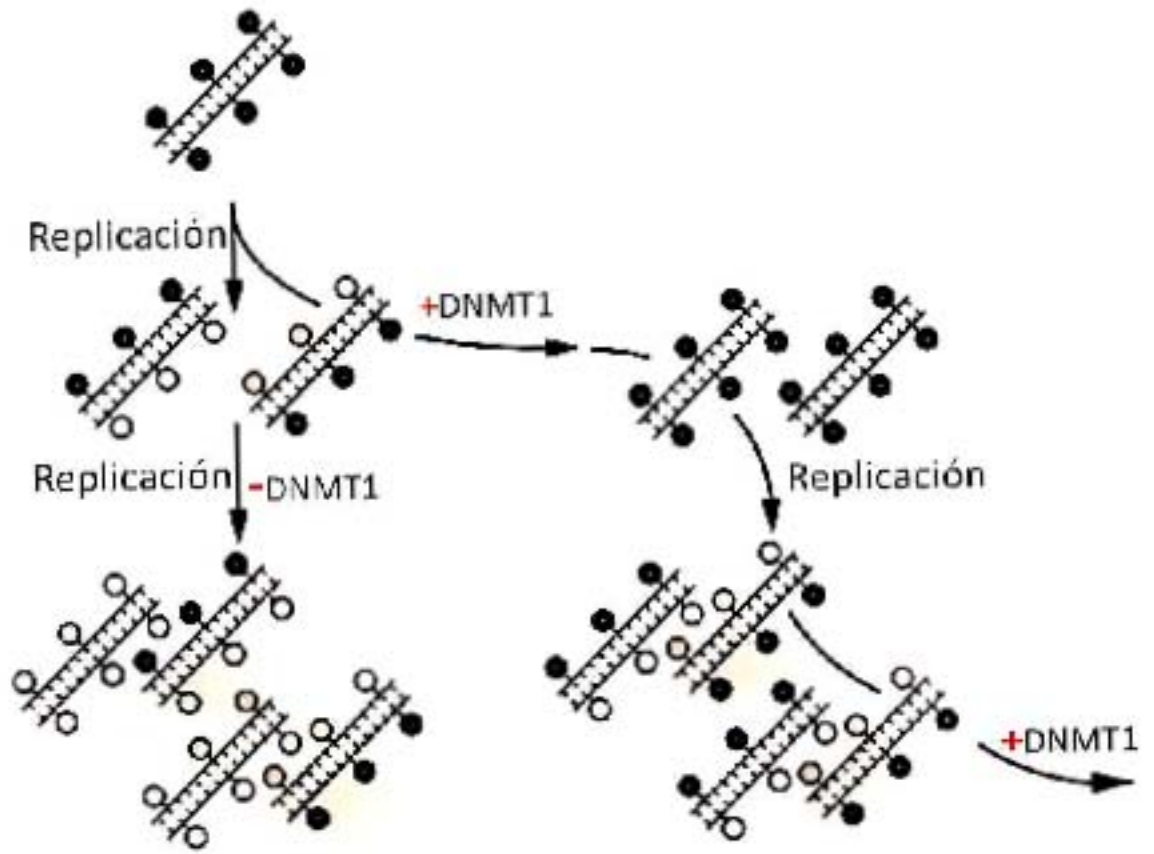
La pérdida de 5mC puede lograrse por regulación a la baja o exclusión del mantenimiento por DNMT1 (Figura 22A). Aunque permite desmetilación global eficiente, el mecanismo depende de la replicación repetida del ADN y, por lo tanto no puede contribuir a la pérdida de metilación rápida en células que se dividen lentamente o en las que no se dividen. Por otro lado, este mecanismo solo permite la remoción global y no la de marcas locus-específico (56)

Desmetilación activa.

La existencia de una “sexta base” la hidroximetilcitosina (5hmC), aunque identificada en cerebro de ratón desde 1972, el reciente descubrimiento de la familia de enzimas desoxigenasas TET (“Ten-Eleven Translocation”), que catalizan la oxidación iterativa de 5mC a 5hmC (5 hidroximetilcitosina, 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxicitosina (5caC) (73) explican una nueva posibilidad

de desmetilación activa, en la que la desaminación de 5mC, 5hmC potencialmente ayudada entre otras por AID (desaminasa) produciría timina o hidroximetiluracilo respectivamente; el mecanismo de reparación por escisión de bases (BER) dirigido a los productos desaminados llevaría a la remoción de la marca de metilación, para reinstalar una citosina sin modificar. Por lo que, la conversión catalizada por TET de 5mC a 5hmC es un mecanismo posible que puede permitir a la célula remover la metilación, independiente del ciclo celular. Sin embargo aún hay debate respecto al mecanismo que atrae a TET y, al destino final de los productos desaminados. Por otra parte, se especula la existencia de una desmetilasa que convierta directamente 5mC a citosina (Figura 22B).

A



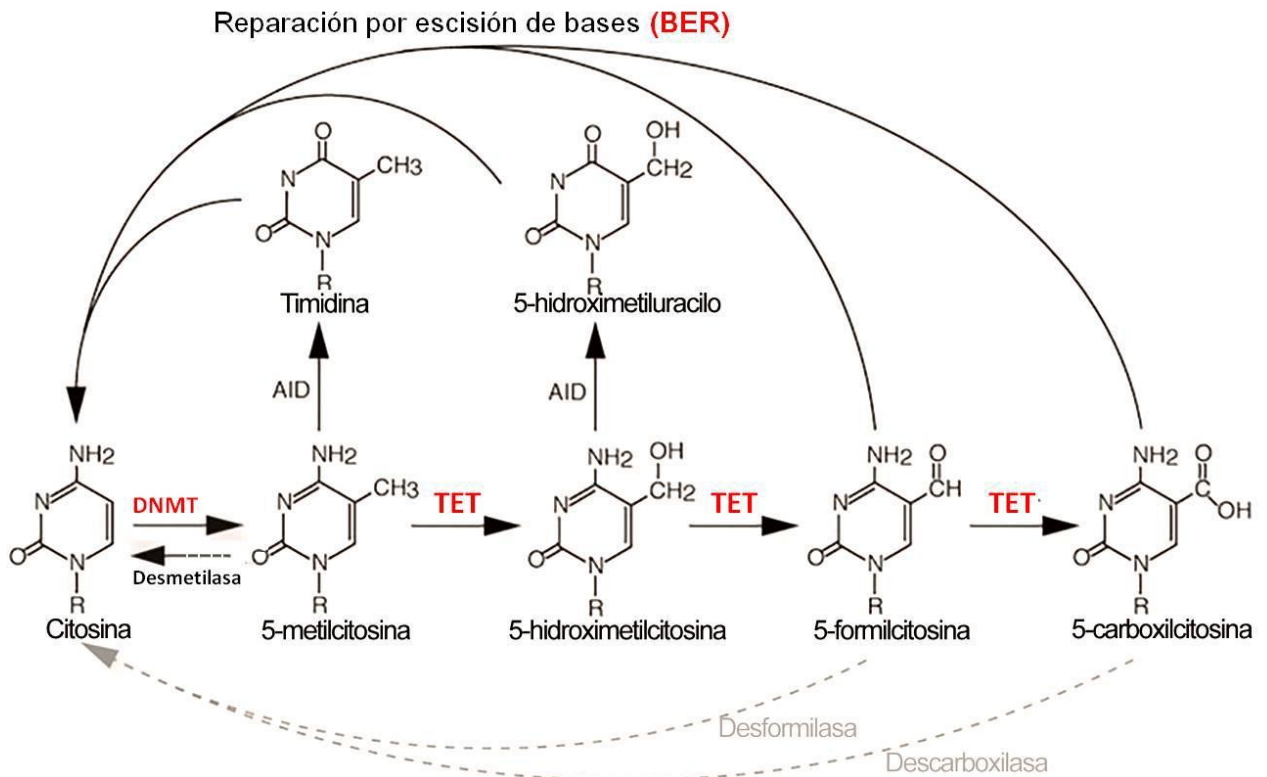
B

Figura 22. Mecanismos de metilación y desmetilación del DNA. A) Metilación y desmetilación pasiva. La naturaleza palindrómica de CpGs en la replicación del DNA genera DNA hemimetilado. La DNMT1 (+DNMT1) restablece la metilación en el DNA (♣). Mientras que la ausencia de DNMT1 (-DNMT1) deja al DNA sin metilar (♠), después de un ciclo de división celular.

B) Mecanismo propuesto de desmetilación activa. Aún se especula la existencia de una desmetilasa. Mecanismo propuesto: Las enzimas **TET** oxidan 5mC a 5hmC, 5fC y 5caC. La desaminasa AID genera timidina y 5-hidroximetiluracilo. **BER** el mecanismo de reparación por escisión de bases, sustituiría los productos de desaminación por citosinas sin modificar (Modificada de Messerschmidt DM y cols.; 55).

La herencia de las marcas epigenéticas en particular la metilación de los CpGs confiere una memoria molecular que asegura fielmente los programas transcripcionales. Sin embargo durante la reprogramación ocurre una hipometilación global simultáneamente con la pérdida de esta memoria, lo cual es la base de la pluripotencia. En el “corazón” de los mecanismos que regulan el borrado de la memoria y el restablecimiento de esas marcas epigenéticas, se encuentra el papel fundamental de las enzimas TET. Este mecanismo ha abierto un campo de extensa investigación en la reprogramación experimental, con enormes perspectivas para la medicina regenerativa, propósitos terapéuticos entre otros, por la posibilidad de reprogramar una célula y orientarla hacia otras direcciones de diferenciación.

3. IMPRONTA GENÓMICA. REPROGRAMACIÓN EPIGENÉTICA EN LAS CELULAS GERMINALES PRIMORDIALES PGCs.

En la línea germinal hay dos ondas de desmetilación extensa del genoma: 1) la primera inmediatamente después de la fertilización en el cigoto y 2) la segunda justamente durante el establecimiento de las células germinales primordiales (PGCs) que son las progenitoras de los espermatozoides y de los oocitos (55, 74, 75; Figura 23).

Las células precursoras de las células PGCs se diferencian a partir del epiblasto (un tejido con alta capacidad de desarrollo, característicamente dirigido hacia

linaje somático) del embrión en desarrollo, alrededor del día embrionario 6.5 (E6.5) (Figura 23). En esta etapa las PGCs heredan rasgos epigenéticos presentes en las células del epiblasto, y otras células somáticas, incluido el alto grado de metilación global, (particularmente en genes de pluripotencia y en los genes línea germinal-específicos). En consecuencia, las PGCs necesitan reprogramar este patrón somático hacia el de las células germinales (que tienen el potencial epigenético para dar origen a los gametos, con la capacidad para formar el cigoto totipotente en la siguiente generación); de manera que en los siguientes 7 días pierden el 90% de su metilación global, como se observa en la figura 23. Recientes avances han comenzado a aclarar estos procesos, pero aún no se cuenta con los detalles mecánicos precisos de la reprogramación y sus consecuencias (55,74,75).

La desmetilación en las PGCs ocurre en dos fases: la primera durante la migración hacia el análogo de gónada que comienza alrededor del día E8; este proceso ocurre principalmente por inactivación del sistema de metilación de mantenimiento (desmetilación pasiva), a su llegada queda reducido al 30% de su nivel global. Presumiblemente el mecanismo involucra la transcripción a la baja de *Uhrf1* y exclusión del núcleo de la proteína UHRF1 NP95. En este proceso también participa la regulación a la baja de DNMT3A, 3B, y 3L que al imposibilitar el restablecimiento de los patrones de metilación, contribuyen a una rápida desmetilación durante la primera onda. Notablemente a pesar de esta extensa desmetilación, secuencias específicas como las DMRs (del inglés: differential methylated regions) de loci improntados, CGIs del cromosoma X y genes línea germinal-específicos, permanecen metiladas hasta que ocurre la segunda fase de

desmetilación, alrededor del día E11.5 (Figura 23). La desmetilación de estas secuencias aparentemente requiere de las proteínas TET que oxidan 5mC a 5hmC y en la que participarían los componentes antes mencionados en esta vía; sin embargo este mecanismo aún no está completamente aclarado. Por otro lado se ha observado la prevalente presencia de DNMT1 y reducción y exclusión nuclear de NP95. Se piensa que esto podría indicar un mecanismo de metilación de mantenimiento en ADN no canónico, como posible mecanismo de protección de loci improntados en el embrión temprano; lo que ha complicado aún más la interpretación de estos complejos procesos (55,73-75).

Otras secuencias que resisten la onda de desmetilación, incluye a miembros de la familia de retrotransposones de la partícula intracisternal A (IAP) y CGIs adyacentes, así como aproximadamente 250 CGIs del genoma que muestran borrado variable (VECs) (55,74,75). Esta modalidad puede ser significativa porque representa un mecanismo potencial de transmisión de rasgos epigenéticos adquiridos, de una generación a la siguiente, incluyendo el fenotipo metabólico recientemente observado en modelos animales (76). Para explicar lo raro que es la herencia epigenética transgeneracional en mamíferos, se ha evocado al borrado a gran escala de las marcas epigenéticas que ocurre en la línea germinal, mientras que esta herencia es común en plantas que no pasan por reprogramación epigenética en la línea germinal (74).

Después de la desmetilación en las PGCs tempranas, debe ocurrir la metilación *de novo* para adquirir los altos niveles de metilación que se encuentran en los gametos maduros. En las células germinales femeninas los niveles de metilación permanecen bajos hasta el día E16 (Figura 23). En contraste las PGCs

masculinas en igual tiempo, han alcanzado el 50% de la metilación global, iniciada a partir del día E14.5 en las proespermatogonias detenidas en G1 de la mitosis. Al nacimiento los patrones de metilación quedan completamente establecidos y se mantienen durante muchos ciclos celulares antes de entrar en meiosis (55,74,75). La posibilidad de acumular errores de metilación en el ADN y la propagación de mutaciones, debidas a desaminaciones de 5hmC durante este largo período de replicación, es mayor en gametos masculinos que en los oocitos (55,75). En contraste, la remetilación de gametos femeninos, se inicia hasta el nacimiento durante la fase de crecimiento del oocito, mientras los óvulos permanecen detenidos en la profase de meiosis I. El resultado de esta metilación *de novo*, con la participación de DNMT3A y DNMT3L, es un patrón de metilación que refleja el destino de las células germinales, con un conjunto de improntas representativas del sexo del embrión, ilustrado en la figura 19. Sin embargo el resultado final del reestablecimiento de metilación global parece ser diferente entre las células germinales: el espermatozoide es altamente metilado con aproximadamente 85% de metilación global CG, mientras que los oocitos son moderadamente metilados, con niveles alrededor del 30% (74,75; Figura 23).

En el ciclo de vida de los mamíferos, el proceso de impronta está calificado como el proceso de mayor complejidad durante la reprogramación epigenética ya que, los patrones de metilación en primer lugar deben ser borrados (marcas somáticas) en las PGCs, posteriormente reestablecerse de manera sexo-específico y célula germinal-específica, conjuntamente con los perfiles de transcripción que permitan el proceso altamente complejo y especializado de maduración meiótica y fertilización y, finalmente la remoción post-fertilización de estas marcas, para

disparar el programa de desarrollo embrionario y comenzar otro nuevo ciclo de vida (74,75; Figura 23).

Aún cuando se conocían con anterioridad las ondas de metilación y desmetilación global, ahora se conocen con más detalle estos procesos; por ejemplo el mecanismo de desmetilación de las células progenitoras germinales, que en la primera etapa se realiza por medio del sistema de desmetilación pasiva y no afecta a secuencias específicas como las DMR de los genes improntados. Además de la interesante desmetilación activa de estas secuencias por las proteínas TET, que ocurre durante la segunda etapa de desmetilación. Mecanismos que han permitido adentrarse cada vez más no solo en el conocimiento de los procesos de reprogramación de las enigmáticas células PGCs, sino además del singular proceso de reprogramación que ha abierto un nuevo campo, por la posibilidad de manipular este proceso para diversos fines. El conocimiento en tiempo, espacio así como los múltiples factores que puedan participar en estos procesos, quizá serán la base para comprender que puede haber diferentes patrones de herencia epigenética, al igual que ocurre en la herencia mendeliana; los cuales son consecutivos a diferentes mecanismos. Si en la herencia mendeliana se ha registrado gran variabilidad, es de esperarse que en la herencia epigenética esta sea mayor por la naturaleza dinámica del epigenoma (donde se ubica la metilación) y por los misma naturaleza de los procesos de reprogramación, como se ha mencionado.

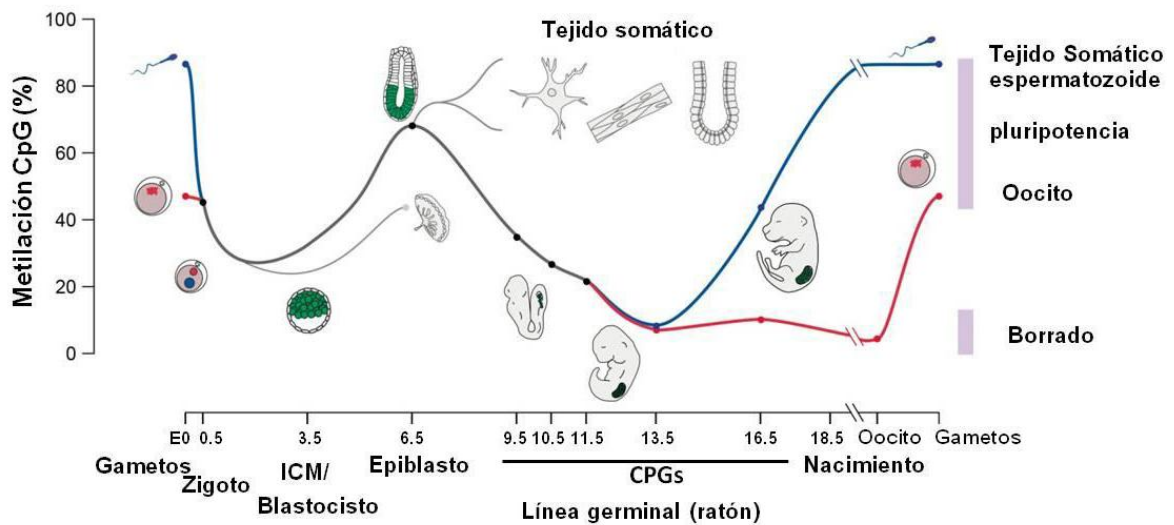


Figura 23. Ondas de desmetilación en la línea germinal de ratón. Ocurren dos ondas mayores de desmetilación: **1^a**) en el embrión temprano donde el genoma paterno (en azul) es activamente desmetilado antes y durante la replicación; después de esto, ambos genomas paterno y materno (en rojo) pierden pasivamente metilación hasta la etapa de blastocisto E3.5. **2^a**) onda de desmetilación, ocurre en las células germinales primordiales (PGC) entre E6.5 y 13.5 conforme surgen del epiblasto. La metilación se reestablece de manera sexo-específico, después de E 13.5 en el espermatozoide y después de la etapa de no crecimiento del oocito hasta el nacimiento. En el proceso de borrado, las células PGC muestran menos del 10% de metilación, mientras que el tejido somático del que derivan (epiblasto) muestra metilación entre el 70 a 85%. De Lee HJ y cols.; 74).

4. REPROGRAMACIÓN EPIGENÉTICA EN EL ZIGOTO Y EN LA PREIMPLANTACIÓN DEL EMBRIÓN.

La otra onda de desmetilación mayor en la línea germinal de mamíferos ocurre en el embrión temprano (Figura 23). Los patrones de metilación establecidos en el espermatozoide y en el oocito son reprogramados una vez más, cuando los genomas de ambos progenitores son reunidos en el cigoto después de la fertilización (E0.5). El genoma de cada progenitor empaquetado independientemente en pronúcleos separados, sigue vías diferentes que involucran remodelado epigenético extenso. El genoma paterno que muestra 80 a 90% de metilación CpG, (el más alto de cualquier célula en ratón) se desmetila en un proceso rápido de desmetilación activa a gran escala que aparentemente ocurre en dos etapas, previo a y posteriormente, coincidiendo con la replicación del ADN, completándose antes de la primera división celular, proceso en el que se ha implicado la hidroxilación por las proteínas TET (aparentemente también afectan al genoma materno). El genoma materno escapa a la desmetilación rápida en el cigoto y es pasivamente desmetilado en las divisiones celulares subsecuentes por exclusión de la DNMT1 del núcleo (74,75; Figura 23).

Al igual que en las PGCs, la inactivación de las metiltransferasas de mantenimiento y *de novo*, aparentemente también juegan un papel en la desmetilación después de la etapa de cigoto, durante la preimplantación del embrión.

La onda de reprogramación epigenética global que ocurre durante la embriogénesis temprana, es crucial para el establecimiento de la pluripotencia.

Durante la división celular temprana en el embrión de mamíferos, las células hijas derivadas del cigoto, heredan un genoma reprogramado con baja metilación, epigenéticamente son indistinguibles una de otra; el primer evento que diferencia las células ocurre en la etapa de mórula; las células periféricas están destinadas al tejido extraembrionario, mientras que las centrales que formarán propiamente al embrión ya muestran metilación; en el blastocisto E3.5 (32 a 34 células) las diferencias epigenéticas entre estos dos linajes ya son evidentes: las más externas (trofoectodermo) muestran niveles bajos de metilación y las de la masa interna (ICM) que originan el embrión restablecen la metilación. Sin embargo este proceso difiere del de las PGCs en dos aspectos: **1)** En las PGCs la desmetilación es casi absoluta con excepción de los retroelementos resistentes. En el embrión, la metilación de las regiones improntadas se debe preservar para permitir más tarde la expresión tisular progenitor-específico (Figura 23). La inactivación del cromosoma X paterno improntado, igualmente se preserva hasta el epiblasto tardío E6.5; **2)** El genoma del cigoto que contiene contribución haploide del genoma del oocito y del espermatozoide, sigue diferente cinética de desmetilación después de la fertilización (55,74,75).

Es indiscutible que la desmetilación global en el embrión temprano se requiere para la apertura del estado totipotente o pluripotente en el epiblasto en formación; sin embargo, no está claro por qué la desmetilación activa está dirigida solo al genoma paterno. En especies mamíferas, la desmetilación activa del genoma paterno, de inmediato es seguida por remetilación *de novo*, antes de que ocurra la desmetilación pasiva del genoma materno. Se desconoce si esto representa una medida para asegurar la reprogramación eficiente o si es porque el oocito está

programado para remover marcas epigenéticas paternas que pudieran favorecer a un embrión en particular.

En resumen, aún cuando se han registrado notables avances para conocer estos complejos procesos, persisten múltiples interrogantes. Por ejemplo la desaminación por AID aún no ha sido concluyentemente evaluada in vivo; la desmetilación dependiente de TET puede ocurrir mediante múltiples vías interconectadas. De manera que futuros experimentos determinarán si efectivamente estas enzimas que median la desmetilación activa, actúan en forma separada, en vías paralelas o bien río arriba o río abajo una de otra. Por otro lado ha quedado demostrado en las PGCs la protección de las regiones improntadas, donde aparentemente son desmetiladas después de ser excluidas de la onda de desmetilación pasiva. Sin embargo, se desconoce el porqué de este retraso. Aun no se aclara si este retraso es funcional o un subproducto del propio mantenimiento de la impronta. Por otra parte la desmetilación de las regiones improntadas sigue la misma cinética que el grueso del genoma; además en ausencia de enzimas TET, los genes improntados son eventualmente reprogramados. Esto es un importante contraste con el embrión temprano en el cual es vital el mantenimiento de metilación de impronta genómica, donde estas marcas nunca deben derribarse o debilitarse. El mantenimiento de la metilación del ADN en el embrión temprano, posiblemente esté más allá de comprender el proceso de impronta genómica o, este sea de mayor complejidad, demostrado por los hallazgos mencionados de metilación en ADN no canónico (55).

Es innegable el avance en el conocimiento de estos procesos; sin embargo, también es un hecho, que aún hay profundas lagunas de interrogantes que limitan un claro entendimiento de los procesos normales de estos fenómenos, de ahí la dificultad de entender y asociar la presencia de marcas epigenéticas (metilación del ADN) en la patología humana. Como ya se ha mencionado en la introducción, en este trabajo interesa analizar un aspecto de metilación en el promotor del gen *RB1*; debido a que se trata de un gen improntado, proceso en el cual la metilación de regiones génicas específicas ocupa un lugar predominante, conviene aclarar la región particular que se analiza en la presente investigación, la cual corresponde a la isla CpG 106 del promotor del gen *RB1* que se muestra más adelante; esta isla está constituida por 27 CpGs como se verá posteriormente.

5. EPIGENÉTICA DEL GEN *RB1* HUMANO EN RETINOBLASTOMA

5.1. Generalidades.

Los avances tecnológicos han permitido el estudio de los procesos epigenéticos a gran escala, con lo cual se ha podido identificar una gran variedad de alteraciones epigenéticas en los retinoblastomas, entre las que se encuentran mirRNAs (RNAs pequeños no codificantes), metilación en los promotores de los genes *p16*, *RASSF1A*, entre otros. Hallazgos que indican un panorama de gran complejidad genética y epigenética, que se han imputado tanto en el desarrollo como en pronóstico y posibilidades de tratamiento en esta neoplasia (77). Sin embargo en el retinoblastoma, la alteración epigenética más conocida y estudiada

es el silenciamiento consecutivo a metilación en la región promotora (CpG 106) del gen *RB1*.

Debido a la condición de gen improntado, la epigenética en el retinoblastoma podría ser abordada al menos desde dos aspectos: **1)** El silenciamiento consecutivo a metilación en el promotor (CpG 106) de *RB1* (entre otras posibles alteraciones epigenéticas) y **2)** Alteraciones por metilación (u otras aberraciones epigenéticas) en la región de impronta de este gen (CpG 85).

Respecto a alteraciones en el promotor, corresponde a Greger en 1989 (78) el primer informe de silenciamiento por metilación del promotor del gen *RB1* en retinoblastomas. Hecho que señaló la importancia del silenciamiento por metilación del promotor de un gen supresor de tumores en la oncogénesis. En estudios posteriores en ADN de retinoblastomas, se ha determinado que aproximadamente el 10% muestra metilación de la región 5' del gen *RB1* (región donde se encuentra la isla CpG 106) (79-81). Ohtani-Fujita y cols., experimentalmente demostraron que la metilación *in vitro* del promotor del gen *RB1* redujo la expresión; además identificaron que dos factores de transcripción no se unen al promotor de este gen cuando su secuencia de reconocimiento se encuentra metilada (82).

Por otra parte, desde los años 80 ha llamado la atención en los pacientes con retinoblastoma efectos que son progenitor específico, como la retención preferencial del alelo paterno en los tumores y la distorsión de la transmisión del rasgo entre la descendencia de hombres afectados. Sesgos que se han tratado de explicar en consecuencia, a diferencias funcionales entre alelos maternos y paternos, característicos de los genes improntados (83, 84). Sin embargo hasta

la fecha no hay reportes de alteraciones en la región de impronta del gen *RB1* ni relacionados con retinoblastoma, ni indicativos de los sesgos mencionados en esas familias. Se encontró un reporte relacionado con alteración en la región de impronta del gen *RB1* en un caso esporádico de cáncer hepático (85).

5.2. El gen *RB1* humano es un gen improntado.

En el ratón se han identificado más de 150 genes improntados, aproximadamente el 50% se han conservado en el humano. Este tipo de genes se encuentran organizados predominantemente en conglomerados. También se conocen genes únicos improntados que no forman parte del conglomerado; algunos corresponden a retrogenes improntados (genes que codifican proteínas, se generan durante la evolución por retrotransposición de mRNAs o de elementos móviles en regiones intragénicas o en intrones de genes preexistentes). Los promotores de estos genes están asociados a islas CpG diferencialmente metiladas en la línea germinal, ocasionando expresión improntada del gen huésped. En contraste, los pseudogenes (copias no funcionales de genes, han perdido su potencial codificante), también se integran por retrotransposición de mRNAs procesados en regiones intragénicas o en intrones de genes preexistentes (86). La impronta del gen *RB1* humano, se debe precisamente a la inserción durante la evolución, de un pseudogen *PPP1R26P1* en el intrón 2. Esta secuencia se integró por retrotransposición, en sentido inverso, respecto a la dirección de la transcripción del gen *RB1*. Hasta ahora el locus del gen *RB1* es el único que muestra este tipo de control de la impronta, representando una nueva

clase de genes improntados (87). En el cromosoma paterno, esta isla se encuentra sin metilar y actúa como promotor para un transcrito alternativo 2B, que interfiere con la transcripción del promotor del gen *RB1* (Figura 24). Mientras que en el cromosoma materno, CpG 85 se encuentra metilada y, no interfiere con la transcripción del promotor. En consecuencia los niveles de mRNA materno vs paterno son desiguales 3:1. La expresión paterna se ha asociado con represión en *cis* del transcrito de longitud completa. Esto ha sugerido que la transcripción en sí o el propio inicio de esta en el promotor CpG 85, podría ser relevante para la transcripción del gen *RB1*, más que la longitud misma del transcrito (87-89; Figura 24).

Para explicar el desbalance observado entre los niveles de ambos transcritos, se ha propuesto el mecanismo de “interferencia transcripcional” definido como -un proceso de transcripción que reprime en *cis* a otro proceso de transcripción- (90). En el caso particular del gen *RB1*, un promotor río abajo, el de CpG 85, interfiere con la producción del transcrito del promotor río arriba. Como se ilustra en el modelo propuesto por Buiting K y cols, (Figura 25).

Por lo anterior es importante resaltar y tener en cuenta la expresión diferencial materna del gen *RB1* debida a su condición de impronta, en relación a la neoplasia paradigmática, el retinoblastoma, tumor ocular consecutivo a alteraciones en la secuencia de este gen supresor de tumores.

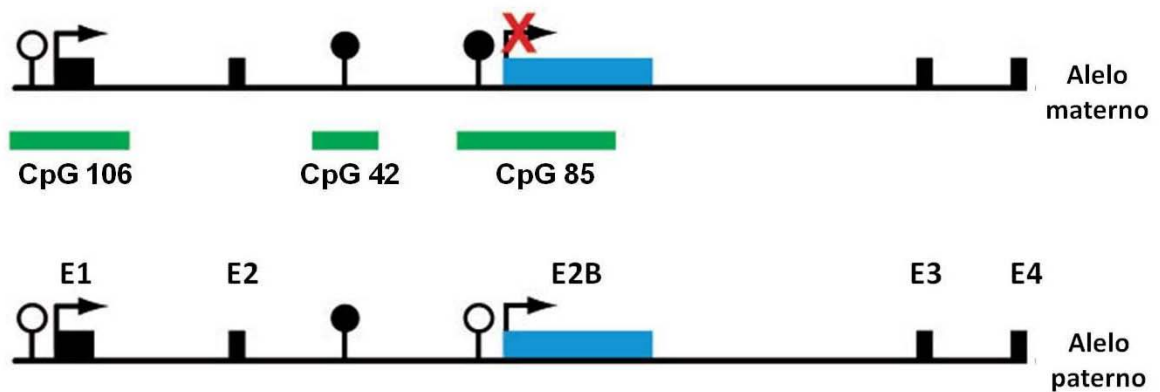


Figura 24. Esquema que muestra la localización de las islas CpG (en verde: CpG 106, CpG 42 y CpG 85) en la región 5' del gen *RB1*. CpG 106 es la isla del promotor del gen *RB1*, normalmente se encuentra sin metilar (☺) en ambos alelos. CpG 42 y CpG 85, corresponden a la región de impronta. CpG 42 muestra metilación (●) en ambos alelos, mientras que en CpG 85, solo el alelo materno muestra metilación. E1, E2, E3, E4 son los primeros exones del gen *RB1*. E2B, es el nuevo exón que corresponde a la región de impronta, el cual es el exón de inicio del transcrito alternativo *RB1-2B*. Figura Modificada, Buiting K y cols.; 88).

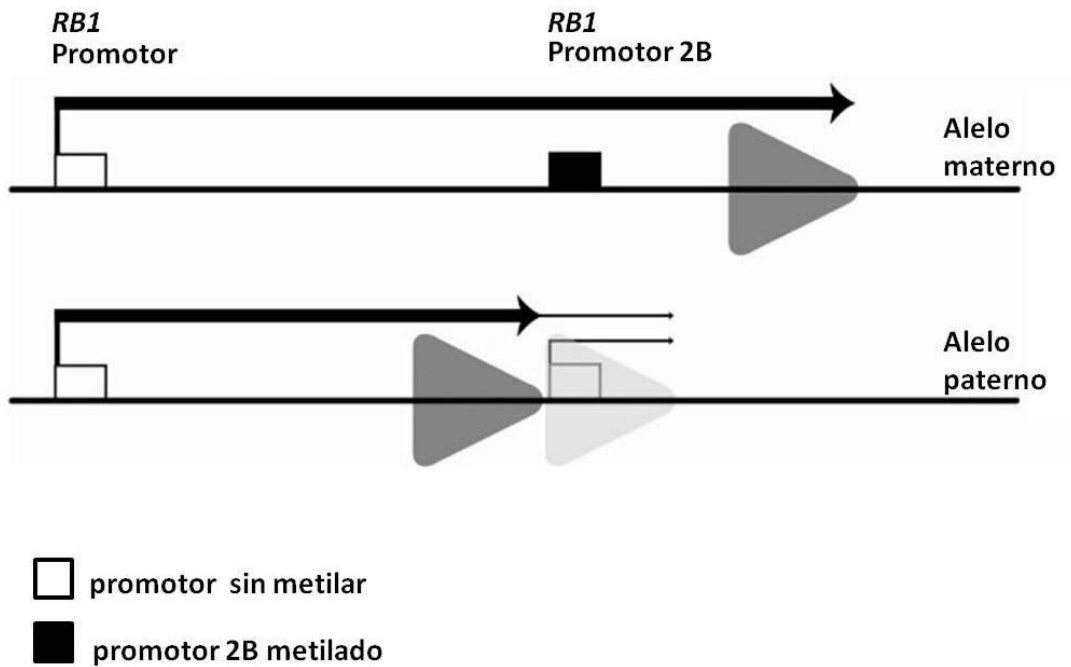


Figura 25. Modelo de “Ruta Bloqueada” de interferencia transcripcional. La unión del complejo de transcripción en el promotor 2B sin metilar, en el alelo paterno (Triangulo gris claro complejo de transcripción del transcrito *RB1-2B*) actúa como bloque para el complejo de transcripción en el mismo alelo. Triangulo oscuro complejo de transcripción del transcrito *RB1*. Modificada, Buiting K y cols.; 88).

6. GENÉTICA DEL LOCUS DEL GEN *RB1* HUMANO.

6.1. Características moleculares.

El gen *RB1* con acceso al GeneBank L11910 consiste de 27 exones distribuidos en una secuencia genómica de 183 kb en el cromosoma 13 q14.2 (77; Figura 26). En su extremo 5' se localiza una isla CpG (CpG 106) que normalmente se encuentra sin metilar. La región promotora contiene motivos de unión entre otros para factores de transcripción como Sp1, ATF, RBF1, E2F y también para el factor nuclear multifuncional CTCF (81; Figura 27).

El gen se transcribe en un mRNA de 4.7 kb. El marco de lectura abierto inicia en el exón 1 y termina en el exón 27; se extiende 2.7 kb seguido por una región sin traducir de 2 kb. Codifica pRB, una fosfoproteína nuclear de 928 aminoácidos de 110 kD; pRB es parte de una familia de proteínas nucleares que incluye a p107 y p130. Estas proteínas comparten homología de secuencia en dos áreas discontinuas que constituyen el dominio "pocket" A/B. El dominio pocket puede unir a miembros de la familia E2F de factores de transcripción y otras proteínas nucleares que contengan el motivo LxCxE (como desacetilasas de histonas 1 y 2). Una importante función de la proteína pRB es su función de "gatekeeper" que regula negativamente la progresión del ciclo celular a través de la fase G1. Durante esta fase pRB está hipofosforilada, en esta forma se puede unir a E2F y ocasionar represión de la transcripción mediada por E2F. A partir de G1 tardía y durante la fase M (mitosis), pRB es fosforilada por c-cdk; una vez fosforilada, E2F

es liberado lo que promueve la expresión de genes que se requieren para la división celular. Consecuentemente, pRB controla la fase de transición del ciclo celular, por medio de represión transcripcional.

Alteraciones en el gen *RB1* que impidan su función crucial de “gatekeeper,” conducirán a la célula a “ciclar” indefinidamente, llevándola a proliferación celular descontrolada, característica de una neoplasia maligna. En este gen se han observado diversas alteraciones en una variedad de neoplasias: de mama, pulmón vejiga, osteosarcoma, melanoma y otras más (91). Sin embargo el gen toma su nombre de la neoplasia familiar, dónde fue primero identificado y donde ha sido extensamente estudiado: el retinoblastoma (30,31).

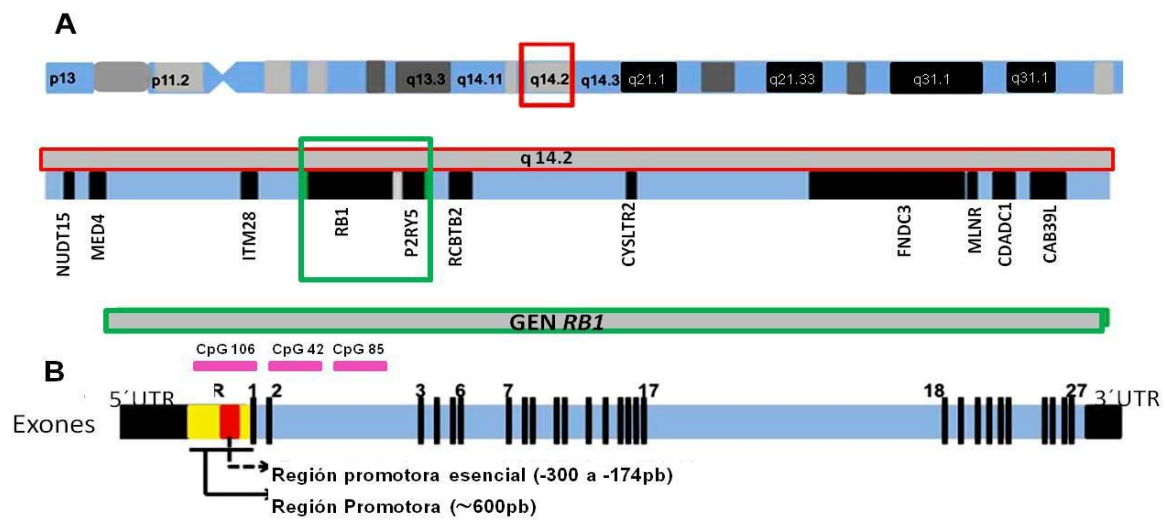


Figura 26. Cromosoma 13 y el gen *RB1*. **A.** El cromosoma 13 y la banda 14.2 en el recuadro rojo. La banda que contiene al gen *RB1* (en el recuadro en verde) y genes que lo flanquean; **B.** El gen *RB1* y exones del 1-27. Cuadros negros las regiones sin traducir (UTR) 5' y 3'. En la 5' se muestran dos regiones promotoras que se han investigado en estudios de metilación. Las barras en rosa muestran las islas CpG: 106 del promotor del gen; 42 y 85 CGIs correspondientes a la región de la impronta (Modificada de Reis AH y cols.; 77).



Figura 27. Secuencia nucleotídica de la región promotora del gen *RB1* y sitios de unión de factores de transcripción en la secuencia consenso de los dinucleótidos CpGs. Se observan los CpGs del 1 al 27 a partir de la 1773 a 1934 pb (GeneBank accession no L11910). Los sitios de unión a factores de transcripción se indican en color bajo la secuencia correspondiente, modificada de Stirzaker C y cols.; 81).

6.2. Características clínicas del retinoblastoma, hipótesis de Knudson y patrón de herencia.

El retinoblastoma OMIM 180200 (on line inheritance in man; 92) es una neoplasia maligna del ojo que se origina en la retina en desarrollo en niños menores de 5 años de edad. La incidencia es de 1: 15, 000 a 1: 20, 000 nacidos vivos (93). Knudson, determinó la etiología de esta neoplasia con su teoría de los dos "Hits", que sustenta los mecanismos genéticos tanto del retinoblastoma hereditario como del no hereditario (esporádico). Ambos tipos son causados por dos mutaciones M1, M2 (30,32; Figuras 1, 2 y 3).

El 40% de los casos son hereditarios (10% se deben a una mutación germinal en el gen supresor de tumores *RB1* (13q14) que transmite uno de los padres afectado, el 30% restante, es debido a una mutación germinal *de novo*), Tabla 1; (94). El restante 60% de los casos son esporádicos (94). La mutación germinal M1 (Figura 1) se transmite como un rasgo autosómico dominante y alta penetrancia; el 90% de los portadores de la mutación desarrollan retinoblastoma bilateral, mientras que en el restante 10% frecuentemente son asintomáticos fenómeno que se conoce como penetrancia incompleta (PI) o muestran retinoblastoma unilateral (94). El tumor se desarrolla con la segunda mutación M2 en tejido somático (Figura 2). En el 70% de los casos M2 se debe a pérdida de heterocigosis (LOH, 94; Tabla 4).

Los heterocigotos portadores de M1 muestran expresión fenotípica variable: **a)** desarrollan tumores en ambos ojos o en uno solo, o en ninguno (penetrancia incompleta), **b)** menor edad al diagnóstico en el retinoblastoma bilateral que en el

unilateral (11 y 22 meses respectivamente), **c)** mayor riesgo de desarrollar segundas neoplasias (neoplasias no oculares) como el sarcoma osteogénico, sarcomas de tejidos blandos y melanoma en los pacientes con retinoblastoma bilateral (95).

6.3. Mutaciones en el gen *RB1* y variación en la expresión fenotípica.

En el gen *RB1* se ha descrito un amplio rango de mutaciones como se observa en la Tabla 4. La mayoría de mutaciones germinales que han sido identificadas en pacientes con retinoblastoma hereditario son mutaciones puntuales que originan codones de terminación prematura (sin sentido o mutaciones con desviación en el marco de lectura) localizadas generalmente en los exones (2 al 25) raramente en el 26 y 27 o, en sitios invariables de procesamiento. Las familias que las portan muestran penetrancia completa y retinoblastoma bilateral (94).

Las mutaciones que ocurren en el promotor, las que afectan las señales de procesamiento (“splice”) o en regiones menos conservadas de intrones, pueden causar ya sea, reducción de la proteína (pRB) que normalmente se produce o generar una mutante parcialmente funcional. Estas mutaciones han sido identificadas en familias con (PI) y retinoblastoma de expresión unilateral (94). En el retinoblastoma no hereditario el espectro de la M1 en general es igual al de las mutaciones germinales.

El espectro de M2 (somática) difiere en dos aspectos: Primero, aproximadamente el 70% de los retinoblastomas muestran mecanismos cromosómicos que conducen a pérdida del alelo normal (pérdida de heterocigosidad) (94). Segundo,

aproximadamente el 10% de los retinoblastomas, muestran silenciamiento por un mecanismo epigenético de metilación en la isla CpG (CpG 106) asociada con el promotor del gen *RB1* (79,80).

➤ GERMINALES	%
•Sustituciones de una sola base	50
•Mutaciones de longitud pequeña	30
•Grandes deleciones	20
•Deleciones intersticiales o translocaciones de 13q	3-5
 ➤ SOMÁTICAS	
Además del espectro anterior	
•Pérdida de heterocigosidad	70
•Metilación	10

Lohmann DR. 2004

Tabla 4. Tipo y frecuencia de mutaciones en el gen *RB1*

Por tratarse de un padecimiento autosómico dominante altamente penetrante, llama la atención las observaciones epidemiológicas que han revelado sesgos en relación a mayor proporción de hombres afectados, mayor proporción de la transmisión del rasgo entre la descendencia de hombres afectados y mayor frecuencia de retención del alelo paterno en los tumores. Hasta la fecha no hay una explicación molecular a ello. Los escasos reportes que existen de familias que muestren sesgos semejantes, han evidenciado alteraciones moleculares

particulares en cada familia. Por otro lado el silenciamiento por metilación en el promotor del gen *RB1* en el 10% de los retinoblastomas (tanto esporádicos como hereditarios) solo se ha observado como M2. Sin embargo, al analizar los complejos procesos de metilación y desmetilación durante la reprogramación del genoma en las PGCs y durante la embriogénesis temprana, en un gen tan complejo como *RB1*, que cuenta con una región de impronta en donde normalmente, ocurre “asincronía” altamente regulada de estos procesos, entre la región de impronta con el resto del genoma, es posible que ocurran fallas (en tiempo, espacio, así como en deficiencia y/o función inadecuada de factores clave) durante el “borrado”, el restablecimiento o el mantenimiento de marcas epigenéticas, que puedan ocasionar marcas aberrantes de metilación, que permanecerán en la vida de ese organismo, con la posibilidad de transmitirse a la descendencia.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se desconoce el tipo de alteración génica que ocasiona penetrancia incompleta y mayor número de hombres portadores y afectados con retinoblastoma unilateral en la familia RBF60. En familias con padecimientos por genes improntados se ha reportado sesgo de género en la descendencia del progenitor transmisor. En los retinoblastomas se ha reportado retención del alelo paterno. En el 10% de los retinoblastomas tanto esporádicos como hereditarios, se ha observado silenciamiento por metilación del promotor del gen *RB1* (79,81,82). Esta alteración, no se ha observado en los linfocitos circulantes de esos pacientes y se ha catalogado como epimutación somática como M2 (80). Se desconoce si puede ocurrir a nivel germinal como M1 y al igual que en los genes improntados pudiera explicar el sesgo de afectados en esta familia.

III. HIPOTESIS

En la familia RBF60 portadora de retinoblastoma unilateral, la alteración que puede explicar el sesgo en el número y género de los afectados por este tumor, es consecutivo a la metilación en el ADN de la región promotora del gen *RB1* ocurrida a nivel germinal como M1, la cual es transmitida por el padre.

IV. OBJETIVO GENERAL

Identificar metilación en el promotor del gen *RB1* en el ADN del tumor y de linfocitos circulantes de un probando y su familia, portadores de retinoblastoma hereditario.

Objetivos particulares.

1. Identificar metilación en el promotor del gen *RB1* en el ADN de linfocitos circulantes y en el tumor del probando.
2. Identificar metilación en el promotor del gen *RB1* en el ADN de linfocitos circulantes en algunos de los hermanos del probando.

V. RESULTADOS

1. Clínicos: Patrón de herencia en la familia RBF60.

La Figura 28 muestra una genealogía de 6 generaciones (I-VI) donde la familia nuclear RB-F60 de la generación III a la V está enmarcada. El caso índice o probando (↑) IV-3 un paciente de 38 años de edad con diagnóstico de melanoma maligno en la región cervical, como segunda neoplasia, una de las causas más frecuentes de mortalidad en pacientes sobrevivientes a largo plazo de retinoblastoma hereditario (93). Este paciente desarrolló retinoblastoma (Rb) unilateral en el ojo derecho (OD) a los 9 meses de edad, igual que tres de seis hermanos (IV-2, IV-4 y IV-7)) afectados con Rb unilateral OI. El caso IV-2 se diagnosticó y falleció a los tres años de edad; el diagnóstico en IV-4 y IV-7 se hizo a los 6 y 3 1/2 meses de edad respectivamente. Ninguno de los afectados presentó malformaciones congénitas asociadas.

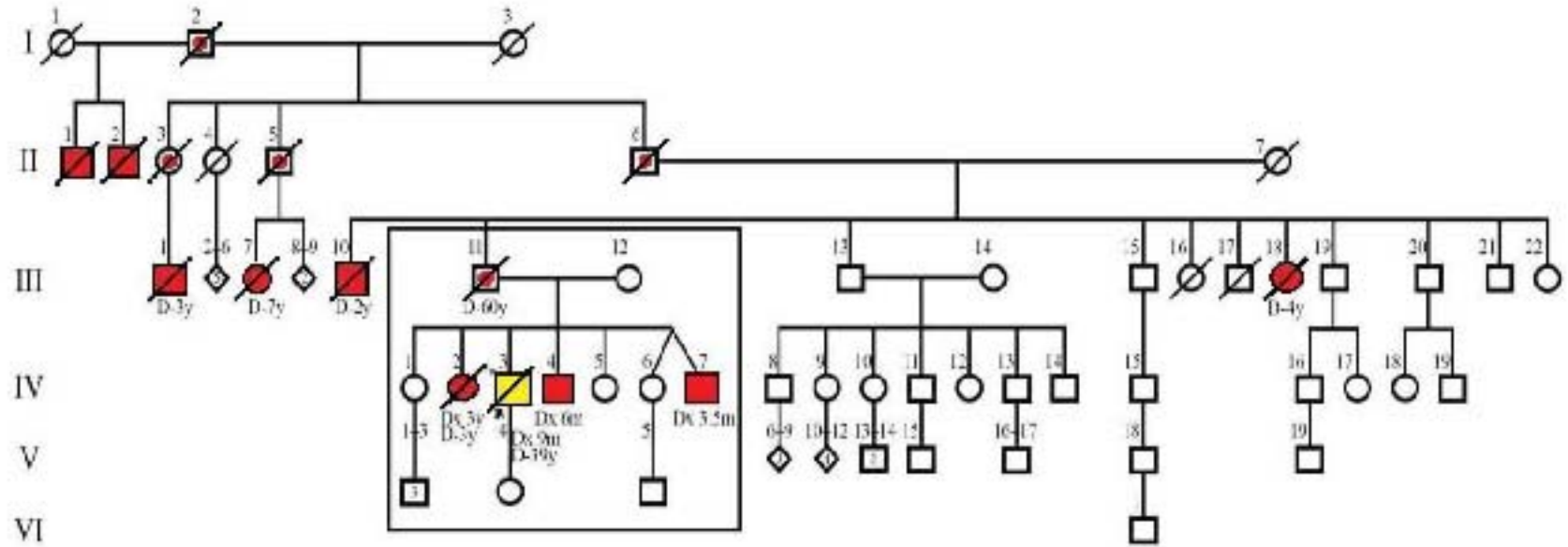
En cada generación se indica, la distribución y número total de afectados y portadores obligados. El primer portador obligado, hombre sano individuo 2 de la generación I, [I-2,], los dos hijos del primer matrimonio fueron hombres afectados fallecidos II-1 y II-2. En el segundo matrimonio transmitió la mutación a 3 generaciones sucesivas por medio de 4 portadores sanos (II-3, II-5, II-6 y III-11). La relación hombre mujer fue 3:1. Los cinco portadores son padres de 10 descendientes afectados (siete hombres y tres mujeres) con Rb unilateral. La relación de afectados hombre-mujer es de 2.3:1.

El 33% de los hijos de I-2 (II-1 y II-2) son afectados; el 50% son portadores obligados sanos (II-3, II-5 y II-6). La portadora II-3 solo tuvo un hijo (género

masculino) que falleció y afectado. El porcentaje de hijos afectados de II-5 fue de 33% (1 de 3 hijos afectado) y el de II-6 fue del 18% (2 de 11). En contraste, el porcentaje de hijos afectados de III-11 (Portador sano y transmisor obligado de RBF-60) fue del 57% (4 de 7 hijos con Rb).

En el recuadro inferior de la figura 30 se muestra el total de afectados en la genealogía (siete hombres y tres mujeres), además del total de portadores obligados (cuatro hombres y una mujer). La relación total hombre mujer es de 2.75:1.

Fam RBF60



- Hombre sano
- Mujer sana
- Retinoblastoma Unilateral
- Caso índice: Retinoblastoma un lateral, Melanoma
- Portador obligado
- ◇ Numero total de hijos
- / Defunción, edad al Dx, edad de defunción.
- I-IV : Generaciones estudiadas

Generación	Afectado		Portador obligado	
	Hombres	Mujeres	Hombre	Mujer
I			1	
II	2		2	
III	2	2	1	
IV	5	1		
TOTAL	7	3	4	1

Figura 28

Figura 28. Genealogía de 6 generaciones (I-VI) en el recuadro la familia nuclear RBF60. Se analizan seis generaciones (I-VI). Los afectados (■ hombre, ● mujer), con retinoblastoma se encuentran de la II-IV, es evidente el predominio de hombres. En la mayoría de ellos, el progenitor es de género masculino. Se observa que todos los progenitores transmisores (portadores obligados □ ●) no presentan retinoblastoma (salto generacional frecuente en PI). Los familiares sanos: □ ○; el número total de hijos: ◇ ambos géneros ; persona fallecida /. La familia nuclear RBF60 se muestra en el recuadro dentro de la genealogía. En el recuadro independiente a la derecha de la figura, se resume el total de afectados y portadores tanto hombres como mujeres. Resalta la preponderancia de hombres en ambos grupos (afectados y portadores).

Resumiendo, el contraste de los porcentaje 33% y 18% en los afectados de la generación II vs el porcentaje 57% de afectados en la generación III (RBF60), indica un cambio de penetrancia. Los primeros, corresponden a lo esperado cuando se trata de penetrancia incompleta; en cambio el 57% observado en RBF60, es el porcentaje esperado de afectados en un padecimiento autosómico dominante con penetrancia completa. Este porcentaje en la familia, demuestra con claridad el cambio de penetrancia, en comparación con el de afectados en la restante genealogía. El hecho de que se conserve el fenotipo de retinoblastoma unilateral y el sesgo en género de afectados (que comparte con toda la genealogía), es congruente con lo reportado en relación a que la primera mutación define la penetrancia y el fenotipo (80,94). No obstante hasta aquí, el cambio de penetrancia queda aún sin explicar.

2. Resultados moleculares:

2.1 Patrón de metilación del DNA: en linfocitos de sangre periférica y en el melanoma del probando.

1. El estatus de metilación de los 27 dinucleótidos CpGs que constituyen el corazón del promotor del gen *RB1*, se analizó mediante ADN previo tratamiento con bisulfito de sodio, seguido por clonación y secuenciación genómica. El bisulfito convierte todas las citosinas sin metilar a uracilos. Las únicas citosinas que permanecen en la secuencia genómica derivan de las citosinas metiladas (81). Se observó un patrón heterogéneo de metilación en el ADN de linfocitos circulantes en la madre, el caso índice sus hermanos y su hija, abarcando tres generaciones. Este patrón también se encontró en el melanoma del probando.

2. En 16 de los 27 CpGs en las posiciones: 1,2,3,5,8,11,13,14-16,19,22-24,26 y 27 del promotor del gen *RB1* se observó sistemáticamente metilación. La presencia de metilación se encontró en clonas que denominamos "C" porque presentaron dos cambios de base: c. [-187T>G; -188T>G] posición río arriba del codón de iniciación (96) (GeneBank Accession L11910.1 GI:292420) en dirección 3' del CpG 17 de la secuencia de reconocimiento del factor de activación de transcripción ATF (97) y la 5' del factor E2F (98) (aaGTGACGT TTTCCCGCG) cambiando a: aaGTGACGG GTTCCCGCG. Este cambio de secuencia se observa en la Figura 29. La figura 30 representa el corazón del promotor del gen *RB1* con los 27 CpGs que lo conforman, se enmarcan los sitios de unión de los factores de transcripción que se unen en esta región. La flecha roja en la figura, indica la posición de esta alteración en el promotor *RB1*.

3. Se observaron clonas que denominamos “W” (sin el mencionado cambio) con escasa metilación o, metilación en CpGs diferentes a los de las clonas “C”.

4. El porcentaje de clonas “C” con el cambio c. [-187T>G; -188T>G] en cada muestra analizada, fluctuó entre el 47% y el 100%. En las 8 muestras de linfocitos circulantes básicamente se identificaron dos patrones de metilación, dependientes del porcentaje de clonas “C” en cada muestra. Estos patrones se muestran en las Figuras 31 A, B y C. En cada uno de estos patrones se indican los 27 CpGs del promotor de del gen *RB1*, señalando con pantallas de colores aquellos donde se unen los diferentes factores de transcripción y los CpGs metilados.

La Figura 31A, corresponde a un patrón con 100% de clonas “C” que muestran metilación en los 16 CpGs mencionados. Este patrón se observó en el melanoma del caso índice, sugiriendo hemizigosidad. La Figura 31B, muestra el patrón mixto con un porcentaje equivalente de 50% de clonas “C” y 50% de clonas “W”, sugiriendo metilación monoalélica. Este patrón se observó en linfocitos circulantes de todos los miembros de la familia, incluyendo el caso índice y su hija.

La Figura 31C, muestra de manera esquemática el contraste del estatus de metilación entre los 27 CpGs de las clonas “C” versus el observado en las clonas “W”. Las clonas “W” de esta figura se seleccionaron del total de las muestras analizadas, para mostrar con claridad las diferencias de metilación y resaltar el contraste de los CpGs metilados entre las dos clonas. Se observa que el patrón de metilación de las clonas “C” involucra sistemáticamente CpGs específicos, en donde se unen factores de transcripción clave del gen *RB1*. El 100% de estas clonas muestran metilación en 4 de los 9 CpGs: 5,8,11 y 13, donde se une el

factor CTCF (99,100), en los CpGs 14,15 y 16 correspondientes a la secuencia consenso donde se traslapan los sitios de unión de los factores RBF1 y Sp1 (97,101) y metilación en el CpG 19 uno de los dos CpGs donde se une el factor E2F (98), además de metilación en los CpGs 23 -24 sitios de reconocimiento al factor nuclear Sp1 (102).

En contraste en las clonas "W", la metilación se observa en CpGs donde no se unen factores de transcripción o el porcentaje en el que coinciden con los CpGs de las clonas "C", es notoriamente bajo, como se observa en el esquema de la Figura. 31 C.

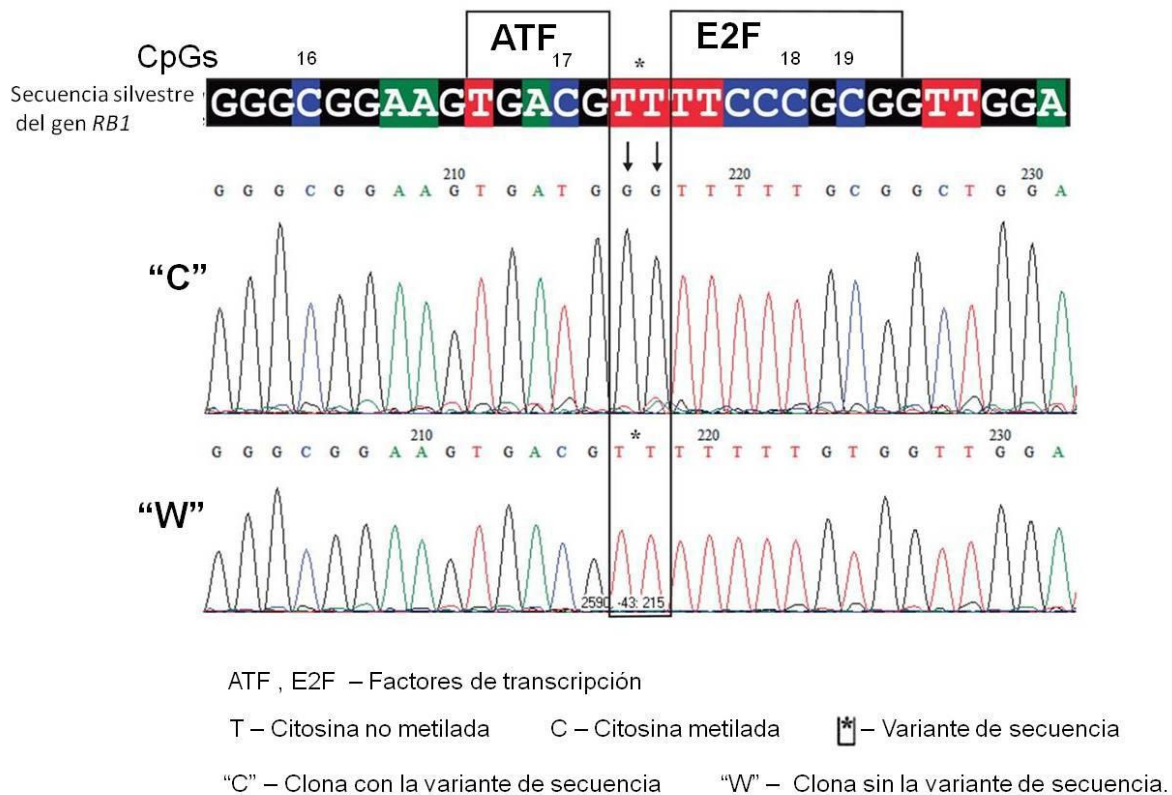


Figura 29. Variante de secuencia c. [-187T>G; -188T>G] en el promotor del gen *RB1* en ADN de linfocitos circulantes del caso índice previo tratamiento con bisulfito de sodio. El electroferograma muestra la clona “C” con la variante de secuencia y la clona “W” sin ésta alteración. Se observa la posición de la variante entre los sitios de unión de los factores ATF (dirección 3’) y de E2F (dirección 5’) indicando el cambio de bases TT a GG de las clonas “C”. En la parte superior de la figura se observa la secuencia silvestre del promotor *RB1* sin tratamiento con bisulfito.

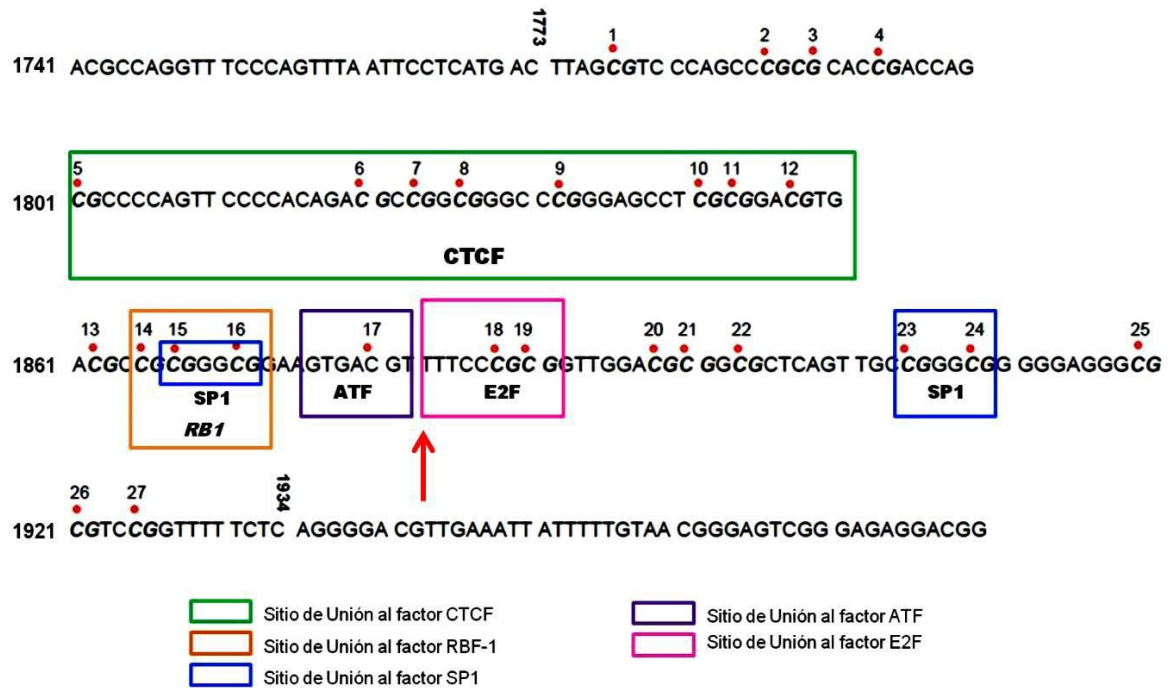
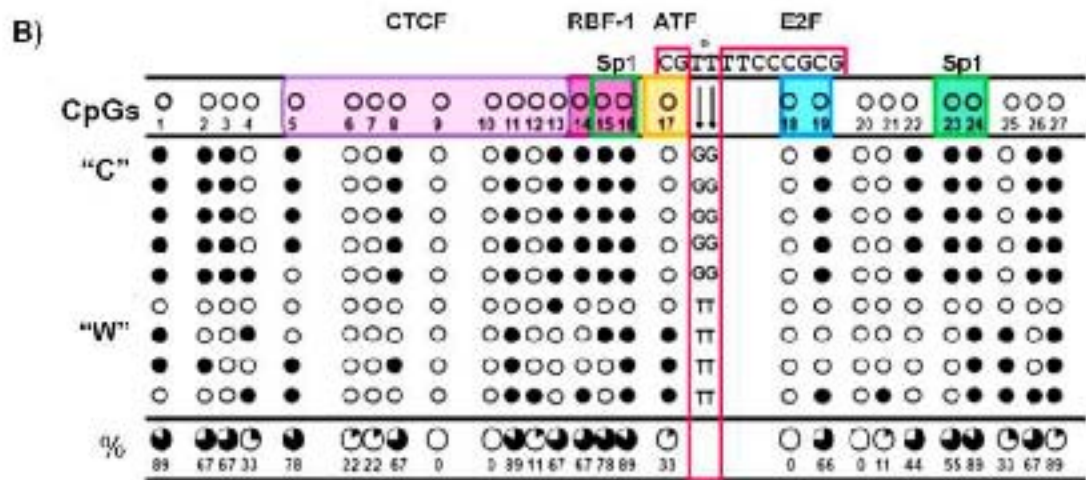
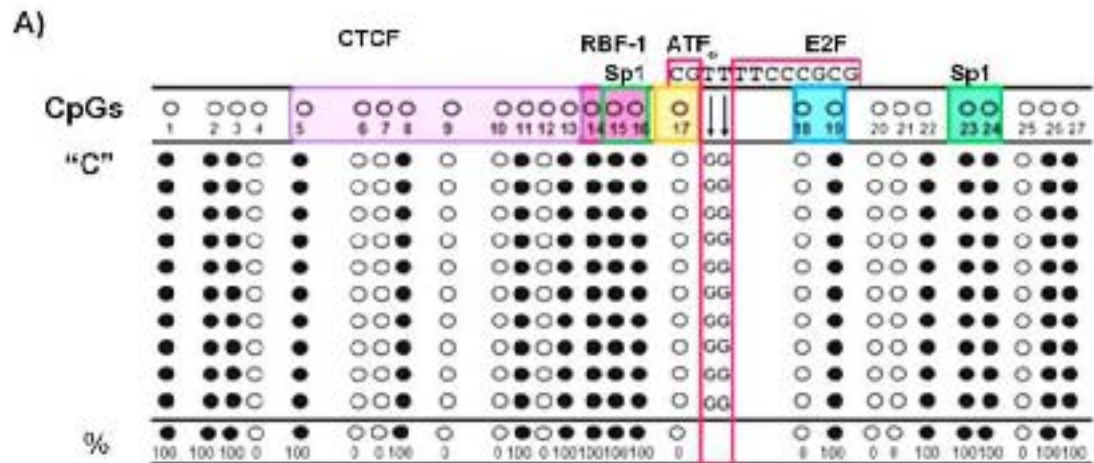


Figura 30. Secuencia del promotor del gen *RB1* y ubicación de la variante de secuencia c. [-187T>G; -188T>G]. Se señalan los CpGs del 1 al 27 a partir de 1773 a 1934 pb (GeneBank accession No L11910). En los recuadros a color se indica la secuencia de unión con los respectivos factores de transcripción. La flecha señala la ubicación de la variante entre las secuencia de los factores ATF y E2F en el contexto de los 27 CpGs que integran el corazón del promotor *RB1*; modificada de Stirzaker y cols.; 81)



● Metilado, ○ No metilado, % de metilación de CpG

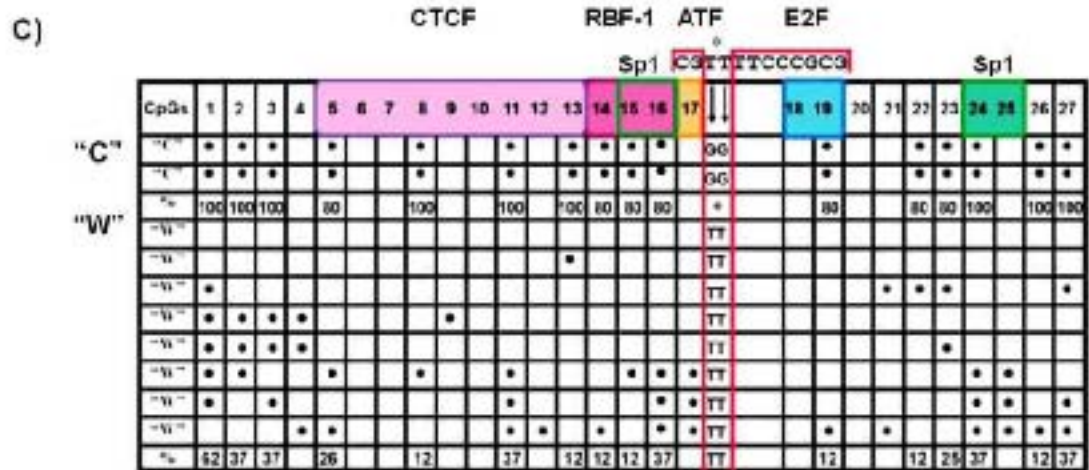


Figura 31

Figura 31. Esquemas de los patrones de metilación en el promotor del gen *RB1*. A. Melanoma del caso índice con 100 % de clonas “C”. Este patrón de metilación sugiere hemizigosidad, lo cual posiblemente corresponde a la presencia del alelo materno metilado y a la ausencia por pérdida de heterocigosidad (LOH) del alelo paterno. **B, Linfocitos circulantes del caso índice.** Se observa el porcentaje similar de clonas “C”, correspondientes al alelo materno metilado y clonas “W” correspondientes al alelo paterno sin metilar. **C. Porcentaje de metilación en CpGs específicos en las clonas “C” vs el porcentaje en las clonas “W”.** Se observa el contraste de CpGs metilados así como, la diferencia de los porcentajes de metilación en los diferentes CpGs entre las dos clonas. El bracket encierra el cambio de secuencia TT a GG entre el sitio del factor ATF y el de E2F.

De los resultados destacan los siguientes puntos:

1. El promotor del gen *RB1* efectivamente se encontró metilado sin embargo, este hallazgo se encontró en la madre y no en el padre como se propuso en la hipótesis; precisamente esto indica lo inesperado del resultado, ya que la madre se consideró como control, por ausencia de retinoblastoma en ella y su familia. Que esta alteración se observe además en los hijos, en el probando y su hija (generaciones IV y V) es indicativo del estado transmisor materno (germinal) con un patrón dominante que se manifestó en el 57% de los hijos (penetrancia completa). Otro hallazgo sorpresivo fue que la metilación se observó prácticamente solo en las clonas que mostraron el cambio de secuencia, indicando la ocurrencia en el mismo alelo, por lo que esta doble alteración (metilación y cambio de secuencia) se calificó como monoalélica y se denominó como “posible epimutación”.
2. El patrón de metilación encontrado en el melanoma del caso índice Figura 30A, sugiere hemizigosidad, representativa del alelo materno metilado y posiblemente ausencia del alelo paterno por pérdida de

heterocigosidad (LOH). En contraste, el patrón mixto que se observa en la Figura 30B en linfocitos circulantes del caso índice y los hermanos, sugiere metilación monoalélica por el alelo materno y clones sin metilar correspondientes al alelo paterno sin metilar. Puesto que la alteración se encontró en el melanoma y en linfocitos circulantes puede ser constitutiva en consecuencia, la alteración se calificó como “epimutación constitutiva”.

Los resultados indican que en el funcionamiento de la maquinaria epigenética también pueden ocurrir errores a cualquier nivel germinal o somático, pero además que posiblemente también pueden ocurrir tanto independientes como asociadas a alteraciones génicas (de secuencia) como lo observado en esta investigación. Lo que sugiere que las alteraciones epigenéticas pueden ser muy complejas y más aún al tratar de explicarlas en el nuevo campo de la herencia epigenética.

2.2 Haplotipos de microsatélites polimórficos.

Por fallecimiento del padre (transmisor de retinoblastoma) en la familia RB-F60 no se pudo realizar el análisis correspondiente. Por lo que el haplotipo paterno se dedujo del observado en los hijos. La segregación de todos los microsatélites analizados demostró certeza biológica del parentesco entre padres e hijos (haplotipos no mostrados). En la figura 32 se observa el árbol genealógico de la familia nuclear y se enlistan los microsatélites analizados. Se anota el haplotipo correspondiente a los marcadores D13S317 (cromosoma 13q 31.1) y D16S539 (cromosoma 16q14.1) en cada uno de los miembros de la familia (103, 104). Se destaca la diferencia de haplotipos correspondientes a los marcadores de dos cromosomas distintos, entre los afectados con retinoblastoma, *versus* el haplotipo de estos marcadores en los demás miembros de la familia. Los alelos informativos se observan en el recuadro de la derecha de esta figura.

De estos resultados destaca lo siguiente:

1. Debido al deceso del padre con el análisis de los marcadores polimórficos se esperaba encontrar un haplotipo informativo transmitido por él, mismo que se confirmó en el haplotipo específico de marcadores del cromosoma D en los hijos afectados. Además, el resultado imprevisto del haplotipo de este cromosoma conferido por la madre solo a los hijos afectados, refuerza el estado transmisor materno ya mencionado.
2. Es innegable que el padre es el transmisor del rasgo como lo demuestra su genealogía, lo que lo convierte en portador obligado, es decir

heterocigoto, portador de una alteración genética. Aún cuando en este estudio no se haya podido identificar; esta alteración desconocida la transmitió a los hijos, por lo tanto también son heterocigotos obligados y, de acuerdo con la hipótesis de Knudson son susceptibles. Debido a que la madre también es heterocigota portadora de una alteración (cambio de secuencia y metilación) que a su vez transmite a los hijos, los convierte en doble heterocigotos completándose en ellos la dosis del gen *RB1*-/*RB1*- necesaria para desarrollar retinoblastoma. Los haplotipos específicos conferidos por ambos padres confirman el estado heterocigoto de cada uno de ellos y el de doble heterocigosidad en los hijos. Resultados que se abordan con más detalle en la discusión correspondiente.

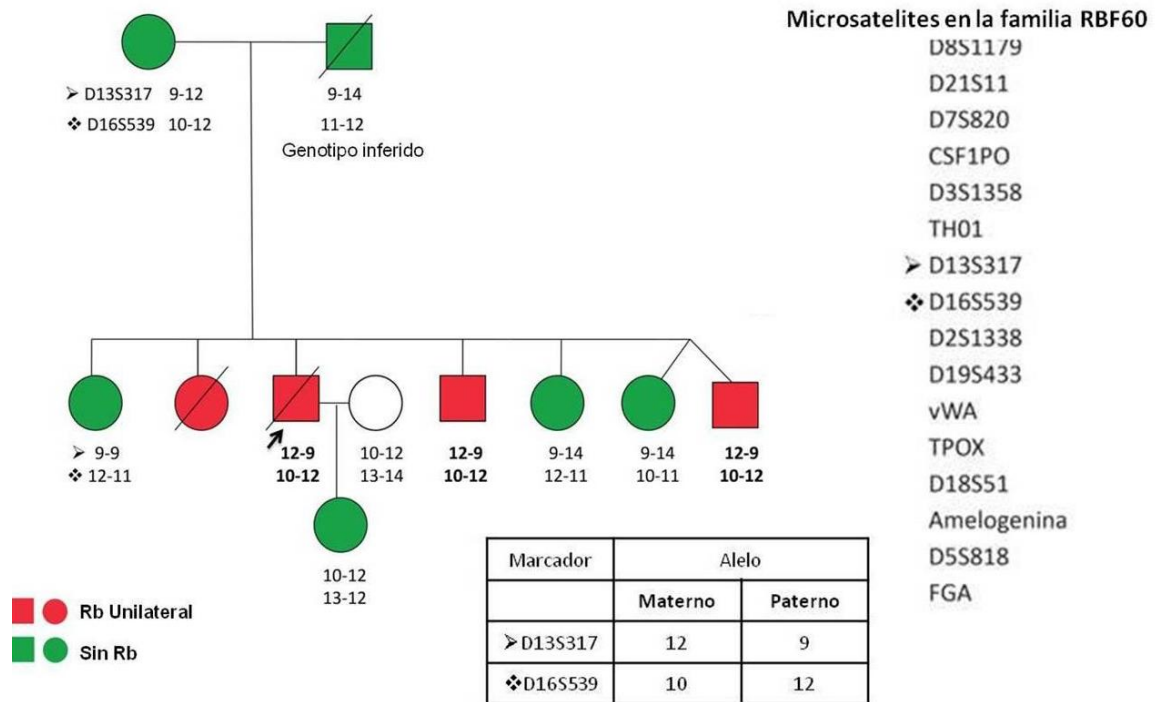


Figura32

Figura 32. Segregación de haplotipos de los microsatélites D13S317 y D16S539. En el árbol genealógico se muestran la segregación de haplotipos de los microsatélites polimórficos D13S317 correspondientes al cromosoma D13, los alelos informativos son el 12 materno y el 9 paterno. D16S539 corresponde al cromosoma 16, los alelos informativos son el 10 materno y el 12 paterno. En rojo se muestran los afectados cuyo haplotipo muestra alelos idénticos (maternos y paternos), en contraste con el haplotipo heterogéneo que muestran los hermanos sanos (en verde).

VI. DISCUSIÓN.

Los estudios en familias que presentan agregaciones de cáncer han identificado mutaciones germinales en los genes supresores de tumores que causan síndromes de predisposición hereditaria (23,24,37). En la última década se ha propuesto que también las epimutaciones causan estos padecimientos (115,116). Sin embargo la frecuencia de ocurrencia puede ser menor, el patrón de herencia puede no ser mendeliano por lo que, a nivel clínico se dificulta su identificación. Adicionalmente, su estudio también presenta limitantes. Por ejemplo, un tema de debate es el proceso por el cual se originan, pues se ha sugerido que se pueden generar sea por errores espontáneos en la línea germinal o, por borrado incompleto de las marcas epigenéticas en la reprogramación durante el desarrollo. Procesos que a la vez que explican su origen explican la inestabilidad de su permanencia en la descendencia. Además, también podrían ser consecutivas a mecanismos que aún se desconocen, suscitando la falta de una terminología universalmente aceptada. Así estos cambios por ahora se han denominado epimutaciones germinales o herencia epigenética.

Precisamente la relevancia de este estudio radica en el que no se haya reportado la coexistencia de una alteración genético-epigenética en el promotor (región reguladora) de un gen constitutivo como lo es el gen *RB1* y que esta alteración sea transmitida a la descendencia. Esta doble alteración probablemente indique interacciones muy complejas en la etiología de las epimutaciones, potencialmente transmisibles a la descendencia al igual que las mutaciones de secuencia. Lo que sugiere que el campo de la herencia epigenética quizá sea tan o más complejo

que el de la misma genética. La siguiente discusión intenta contribuir a entender su origen y transmisión en la descendencia en esta familia.

La familia estudiada muestra un patrón de herencia autosómico dominante característico de RB retinoblastoma hereditario, con afectados en cada generación (94). Sin embargo el número de afectados 18% y 33% en las generaciones II y III es menor al 50% esperado en este tipo de herencia y también el mayor número de hombres afectados se desvía de esta proporción. Por otra parte, ninguno de los 10 portadores obligados desarrolló retinoblastoma y en todos los afectados es unilateral. Estos datos familiares indican que corresponde al pequeño pero significativo número de familias en las que el retinoblastoma se hereda con penetrancia incompleta (PI) (94).

En contraste a lo observado en las generaciones II y III, en la IV correspondiente a la familia de éste estudio, 4 de los 7 hijos (57%) están afectados, observándose un cambio a penetrancia completa, sin embargo se conserva la expresividad moderada de tumores unilaterales y el sesgo de hombres afectados. Lo que indica, que la primera mutación es la que define el fenotipo que presentarán los portadores de esta, como se ha descrito en la literatura (80,94).

Se ha sugerido que estos sesgos se deben a mayor frecuencia de mutaciones en la espermatogénesis que en la oogénesis, deriva meiótica y también a la existencia de genes improntados (83,84,88,105,106). Klutz y cols., estudiaron dos familias con retinoblastoma y PI, no relacionadas portadoras de la misma mutación, que mostraron variación en la expresión fenotípica del retinoblastoma y

mayor número de afectados cuando el padre es el transmisor del alelo mutante (107).

Identificar la mutación germinal paterna que ha condicionado PI en la familia que se reporta, requeriría la secuenciación completa del gen *RB1*, ya que el tipo de mutaciones que portan las familias con PI, no forman parte del espectro de las mutaciones germinales que se encuentran en la mayoría de familias con retinoblastoma y, prácticamente cada familia presenta una mutación particular (104,108). Las mutaciones que confieren PI en general ocasionan disminución cuantitativa de la expresión o pérdida parcial de la función supresora del gen *RB1* (82,94,97,109). Se ha sugerido que en las familias con mutaciones que producen PI, la pérdida de LOH es oncogénicamente insuficiente porque la homocigosidad del alelo predisponente aún conserva actividad supresora por lo que los portadores serían asintomáticos (107,109). Para que se desarrolle el retinoblastoma, se requiere una mutación (M2) que ocasione pérdida completa de función en el alelo normal (97). Como estas mutaciones son menos frecuentes 30% v/s 70% de LOH, la proporción de afectados en estas familias puede ser menor (94,97). Situación que explicaría el menor número de afectados de las generaciones II y III. Otra explicación al menor número de afectados podría estar relacionada a la expresión diferencial del gen *RB1*, consecutivo a su estado normal de gen improntado (87,88). En este caso, la expresión diferencial del alelo materno podría suplir la baja expresión de la supuesta mutación germinal (PI) paterna, que evitaría el desarrollo de un retinoblastoma en los portadores asintomáticos de esta familia.

En cuanto al cambio de penetrancia específicamente en la familia nuclear RBF60, la posibilidad que podría ayudar a explicar este cambio, es el hallazgo de la variación de secuencia c. -[187T > G;188T > G] entre la secuencia de unión a los factores de transcripción ATF y E2F. En la primera, Sakai y cols., encontraron la transversión **G>T** (posición 189 río arriba del codón de iniciación) en una familia con retinoblastoma hereditario y PI, que permitió identificar el sitio de unión de este factor nuclear en el corazón del promotor del gen *RB1*, necesario para la activación de la transcripción del gen *RB1* y la supresión oncogénica (97). Mientras que el factor de transcripción E2F afecta la represión génica (98); estudios con reporteros transgénicos han demostrado que mutaciones en un solo sitio de unión al factor E2F afecta la represión génica, sugiriendo además que este factor puede contribuir a la regulación de la transcripción del gen *RB1* (111). El cambio observado en la familia objeto de este estudio se encuentra en posiciones 187 y 188 (río arriba del codón de iniciación) y la transversión también es diferente. Las mutaciones en el promotor del gen *RB1* son poco frecuentes. En la secuencia de unión a ATF se encontraron tres casos con mutaciones (104,108,109), mientras que en la secuencia de unión al factor E2F no se encontraron informes semejantes (104,108).

Cuatro aspectos llaman la atención en la variación de secuencia observada en la familia: **a)** involucra dos bases adyacentes una en un sitio activador y la otra en uno represor; esta variación no se encontró reportada. (104,108); **b)** la variación se encontró inesperadamente en ADN de linfocitos circulantes de la madre del probando y la transmitió a dos generaciones, incluidos todos sus hijos (generación IV) y la hija del probando (generación V), lo que sugiere ocurrencia germinal que

se ha segregado con un patrón de herencia dominante, **c)** coincide o se encuentra asociada a metilación principalmente de secuencias de reconocimiento a factores de transcripción en el promotor del gen *RB1*, **d)** la metilación aparentemente es alelo específico, porque las clonas sin este cambio, en general, no muestran metilación consistente.

Tanto las mutaciones de secuencia en el sitio de unión al factor ATF como la metilación del promotor son oncogénicas (79,81,82,97), por lo que se sugiere que esta variación de secuencia asociada a metilación también puede ser oncogénica. Por otro lado, el patrón de metilación observado en los linfocitos circulantes de esta familia presenta semejanzas con el patrón de metilación reportado por Stirzaker y col. en retinoblastomas (81), que muestran metilación en los 27 CpGs del promotor del gen *RB1*, incluidos los CpGs de unión a factores de transcripción, pero densidad variable de metilación entre los CpGs y de tumor a tumor, aunque algunos CpGs individuales están sin metilar, destacando el CpG del sitio E2F. En el presente estudio también se observa metilación extensa, pero es más consistente en los CpGs de unión a factores de transcripción, aunque el CpG del factor ATF se encontró sin metilar al igual que uno de los dos CpGs del sitio de E2F. Sin embargo no es posible hacer una comparación cuantitativa de metilación en CpGs específicos porque no se realizó cuantificación como en el estudio de Stirzaker.

Resulta interesante contrastar los resultados con los hallazgos de Dávalos y cols. (100) en la Figura 4C, en relación al patrón de metilación de células en cultivo, en las que se mutaron los sitios de unión a CTCF en el promotor del gen *RB1*. Se demostró que CTCF protege de metilación al promotor. Llama la atención las

semejanzas del patrón de metilación en el promotor de la familia estudiada con el patrón de metilación de esas células, carentes de la protección de CTCF, que además muestran bajos niveles de expresión de este gen. Análisis semejantes no se han realizado en la familia estudiada.

El silenciamiento del gen *RB1* consecutivo a metilación del promotor reportado en retinoblastomas (80-82) y la ganancia de metilación en el promotor de este gen, consecutiva a mutaciones en sitios clave de unión a factores de transcripción (82, 97-100,102), permiten sugerir que en RBF60, este doble hallazgo (metilación y cambio de secuencia) aparentemente en el mismo alelo, podría corresponder a una “epimutación” consecutiva a la transversión TT>GG posicionada entre una secuencia activadora y otra represora como se ha mencionado.

Este supuesto es sustentable en base a que en algunos padecimientos neoplásicos con predisposición hereditaria, se han reportado alteraciones semejantes a las observadas en este estudio. En donde coexisten variaciones de secuencia en genes contiguos o distantes que propician modificaciones epigenéticas, específicamente de metilación en los promotores de genes particulares (110,112, 113). Dichas alteraciones demuestran que en la etiología de esos padecimientos coexisten interacciones genético-epigenéticas muy complejas involucradas en el silenciamiento transcripcional, que entre otros es consecutivo a transcripción antisentido (114). Mecanismos que están ayudando a entender este nuevo campo de la herencia epigenética y de su transmisión hereditaria mediante epimutaciones. Desde luego que ha sido titánico el análisis extraordinario que han logrado entre otros Hesson y cols.(113), Ligtenberg y cols.(110), Hitchins (114) para delinear el nuevo campo de la herencia

epigenética y poder catalogarla como tal, lo cual es un avance indiscutible. No obstante, el problema de interpretación está vigente, sobre todo cuando se observan alteraciones que se desvían de las ya descritas, como es el caso de los hallazgos observados en el presente trabajo.

Cabe enfatizar que este tipo particular de epimutaciones son hereditarias, porque las modificaciones epigenéticas de metilación, son secundarias a cambios en *cis* en la secuencia de genes, que ocurren a nivel germinal y estas se transmiten a la descendencia con patrón dominante (112-114).

De manera especulativa se sugiere que, la variación de secuencia presente en RBF60, por algún mecanismo, por el momento desconocido, propicie la metilación del promotor del gen *RB1*, dando origen a una “epimutación constitutiva” (78,83), porque la metilación se encuentra tanto en el melanoma como en los linfocitos de sangre periférica. del probando. Sin embargo, el encontrarlo en la madre fue un hallazgo inesperado. De hecho se tomó como control del estudio puesto que en la familia materna no se encontraron datos de patología evidente y, como lo muestra la genealogía, es claro que la transmisión era solo de origen paterno.

Como el padre falleció se analizaron microsatélites polimórficos, pretendiendo demostrar el origen paterno del alelo mutante. Sorpresivamente los resultados sugieren que ambos padres serían portadores de mutaciones germinales. En el padre aún no identificada como ya se mencionó pero demostrado por el patrón de herencia de PI y la madre, portadora y transmisora de una probable epimutación constitutiva en el promotor del gen *RB1*.

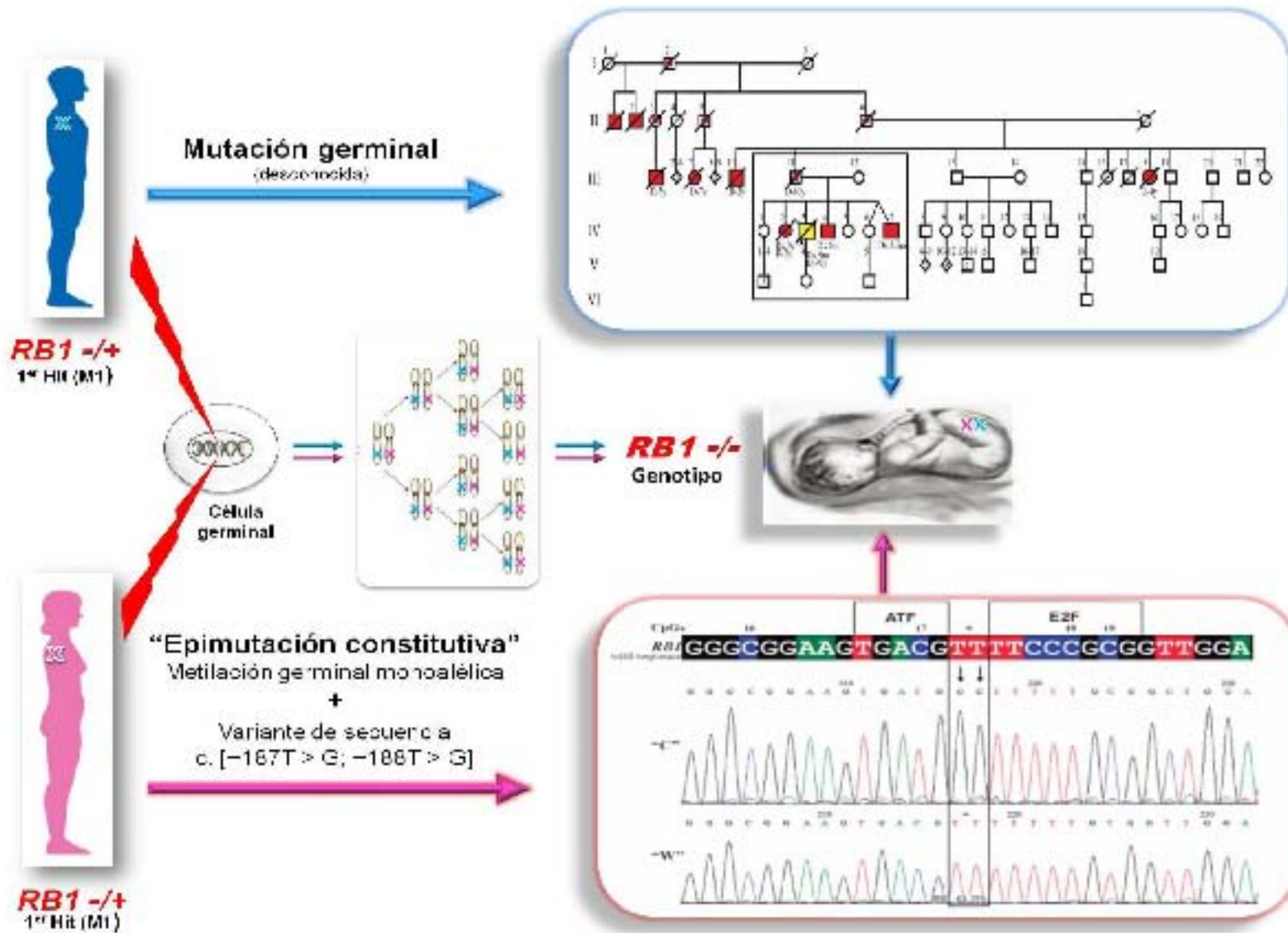
La contribución biparental (ambos progenitores) se apoya además en los resultados obtenidos con los marcadores de microsatélites ya que, se observó

segregación específica no solo de un alelo del cromosoma D paterno, sino también la especificidad de uno de los alelos del cromosoma D de origen materno, que se segregan con un haplotipo único en los afectados. Esto sugiere contribución germinal biparental de ambos cromosomas D, al fenotipo retinoblastoma. Impensadamente, también se observó participación biparental específica en los alelos del cromosoma 16, lo cual es un dato de interés adicional dado que, la delección del brazo largo de este cromosoma (16q) está relacionada con un tipo particular de retinoblastoma (117).

VII. CONCLUSIONES.

Los hijos afectados de la familia RBF60, en teoría son doble heterocigotos de mutaciones germinales, por lo que tuvieron mayor riesgo de desarrollar retinoblastoma probablemente de tipo difuso, a diferencia de las familias de las generaciones II y III que supuestamente solo son heterocigotas para la primera mutación germinal del gen *RB1*, la que causa penetrancia incompleta, afecta más al sexo masculino y se transmite por rama paterna. Los miembros de RBF60 comparten esa mutación que se transmite por rama paterna, pero además tienen la variación de secuencia y metilación (“epimutación”) que les transmite la madre confiriendo la doble heterocigosidad, como se reportó en la publicación que se anexa. En la Figura 33, se ilustra el modelo que se propone para explicar este hallazgo.

Figura 33. Modelo de doble heterocigosidad en retinoblastoma hereditario en la familia RBF60. El padre es heterocigoto (*RB1+*/*RB1-*) y transmisor de una mutación germinal (M1) desconocida que causa penetrancia incompleta y sesgo de hombres afectados y portadores (94). La madre también es heterocigota (*RB1+*/*RB1-*) porque es portadora y transmisora de la alteración monoalélica: variante de secuencia c. [-187T>G; -188T>G] mas metilación (“epimutación constitutiva” M1), que en los hijos afectados desenmascara la mutación paterna. Por lo tanto el hijo(s) es doble heterocigoto (*RB1-*/*RB1-*) y, como resultado de este genotipo desarrolla retinoblastoma unilateral.



VIII. PERSPECTIVAS

Se pueden destacar por lo menos tres aspectos:

1. El que impacta directamente a los pacientes en el campo de la genética oncológica respecto a la identificación de enfermos de alto riesgo para síndromes de cáncer con susceptibilidad hereditaria.

Los resultados del estudio indican que además de la ya conocida susceptibilidad hereditaria en el retinoblastoma, consecutiva a diversas alteraciones genéticas, ahora las alteraciones epigenéticas (entre estas, las posibles “epimutaciones constitutivas”), también podrían conformar un tipo particular de susceptibilidad hereditaria en el retinoblastoma, lo cual amplía el nuevo campo: el de la herencia epigenética. Esto es trascendente en una enfermedad tan compleja como lo es el cáncer, porque potencialmente amplía la prevención mediante identificación y detección tempranas en otro grupo de familias susceptibles. En este punto se enfatizan dos aspectos; **a)** la utilidad de analizar cuidadosamente la historia personal y familiar de cáncer, con particular atención en aquellos cuyo patrón de herencia se desvía del mendeliano previsto, por la posibilidad de identificar entre otros la herencia epigenética. Un aspecto importante es que este tipo de detección podría ser de mayor utilidad implantarlo en unidades de alta especialidad donde existen el equipo, material y grupos multidisciplinarios y de investigación para estudiar integralmente estas familias, **b)** a nivel de pruebas moleculares, estar alerta ante un resultado negativo de pruebas estándar en familias sugestivas, para tratar de investigar otras posibilidades, entre estas las alteraciones epigenéticas.

2. A nivel básico el doble hallazgo (variante de secuencia y metilación monoalélica) es sumamente incitante para probar diversas hipótesis. En primer lugar el estudio de la familia debe continuar:

- a.** Identificar la presencia de ambos alelos maternos (metilado y sin metilar; una propuesta es por medio de sondas Taqman, que informarían simultáneamente la presencia de ambos alelos además de proporcionar un dato cuantitativo.
- b.** Ampliar el análisis de segregación con otros marcadores polimórficos intra e intergénicos del gen *RB1*, para conocer con más precisión el estado de doble heterocigosidad; de ser posible con tecnología de frontera como por ejemplo microarreglos (kit citoescan).
- c.** Conocer el impacto de la “epimutación” sobre la expresión por medio de PCR Tiempo Real. Debido al estatus de impronta del gen *RB1*, la expresión mayoritaria es normalmente de origen materno. En RBF60 la madre es portadora y transmisora de la epimutación; sin embargo en ella, se desconoce cuál es el progenitor transmisor. Bajo estas condiciones el nivel de expresión es especulativo, tal vez disminuida, pero podría ser normal. Para evaluar tal posibilidad sería conveniente:
 - 1) Determinar el valor promedio de mRNA en un grupo de hombres y mujeres sanos; 2) Comparar estos valores con los obtenidos en cada uno de los miembros de RBF60; 3) Tomando en consideración que en esta familia hay 4 mujeres sanas y no hay hombres sanos; 4) Que se desconoce la mutación paterna y el efecto que pueda tener sobre la

expresión. Debido a la diversidad de genotipos esperados en los descendientes de ambos progenitores portadores de mutaciones germinales, se requiere un diseño correctamente estructurado.

Los análisis anteriores son indispensables para cubrir los criterios que recientemente se han publicado cuando se trata de definir epimutaciones constitucionales (118). Sin perder de vista que la alteración encontrada en este estudio no ha sido reportada, por lo tanto es posible que no reúna los criterios establecidos y/o que requiera diferentes pruebas. También es importante considerar que tal vez sea necesario primero conocer el significado biológico funcional de esta alteración antes de intentar un análisis de expresión.

3. Es un hecho que estos fenómenos no son aún comprendidos, por lo cual resulta altamente motivante la realización de estudios *in vitro*. Razón por la que se trató de obtener líneas celulares inmortalizadas a partir de linfocitos circulantes en muestras de esta familia con objeto de contar con material disponible para estudios posteriores (119). Se cuenta con una línea celular, correspondiente a uno de los miembros afectados que proporcionó una segunda muestra.

Dado el interés que generó este hallazgo y de la imposibilidad de realizar de inmediato el análisis de expresión, se tuvo la posibilidad de realizar un experimento enteramente preliminar en ADN extraído de células de la mencionada línea linfoblastoide inmortalizada. El propósito fue explorar la estructura de la cromatina en esta región del promotor del gen *RB1*. Mediante Chip (inmunoprecipitación de cromatina) y bajo el supuesto de que el factor CTCF no se uniría por estar metilados sus sitios de unión en el promotor del gen

RB1 (99,100); en contraste en razón de la metilación encontrada, se observarían marcas de MBP y MECP2 (proteínas que se unen cuando sus sitios de reconocimiento están metilados). Interesantemente, aparentemente esto es lo que se observa en el gel que se muestra en la Figura 34 en donde se observa la marca de CTCF disminuida, comparada con la del control, que se encuentra en el centro del gel (ADN de una línea inmortalizada de linfocitos normales). Sin embargo, para la interpretación correcta se requiere la confirmación del estado heterocigoto de la madre (metilación monoalélica) condición en la que en teoría, solo el 50% de los sitios de unión a CTCF estarían ocupados y la marca sería muy débil o de menor intensidad versus la del control. En cuanto a las marcas de MBDs y MECP2 se esperaría observar marcas de mayor intensidad en el afectado versus de menor intensidad o ausentes en los controles. Mientras que para la correcta interpretación de las tenues marcas de acetilación (marcas de las histonas H3 y H4 acetiladas) que se observan en el afectado con retinoblastoma, se requeriría previamente el análisis de expresión.

Las marcas de proteínas MBD y MECP2, la débil marca de factor CTCF y de histonas indican que el experimento se debe repetir, pues si estos resultados son consistentes sugerirían un análisis correctamente diseñado para conocer un posible estado de compactación de la cromatina y un estado de silenciamiento del promotor del gen *RB1*.

Desde luego ninguno de estos estudios son excluyentes uno de otro, por el contrario se requeriría un proyecto muy bien diseñado y otros experimentos para tratar de explicar el significado de esta alteración y poder avanzar en este nuevo campo.

Familia nuclear RBF60

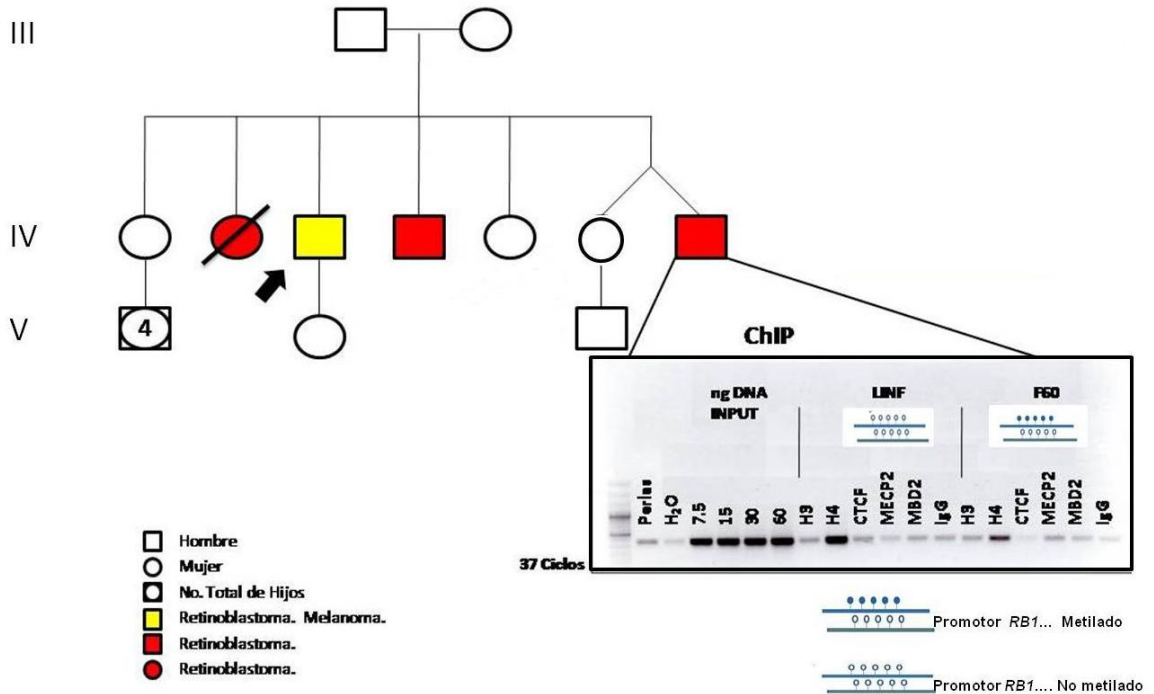


Figura 34

Figura 34. Árbol genealógico de la familia nuclear RBF60 y resultado de la inmunoprecipitación de cromatina (Chip) del promotor del gen *RB1* en DNA de una línea inmortalizada de linfocitos circulantes, correspondiente a un afectado de la familia RBF60. En el recuadro se observa un gel de agarosa que muestra el resultado comparativo de las marcas de anticuerpos contra histonas acetiladas H3, H4, el factor CTCF y contra proteínas que reconocen sitios metilados en el ADN (MECP2, MBD2). En el centro del gel se observa una muestra control de DNA de una línea inmortalizada de linfocitos normales (independiente de la familia), vs a la derecha el DNA de linfocitos de un afectado con retinoblastoma, miembro de RBF60. En esta muestra se observa una débil marca del factor CTCF (por estar metilados su sitios de unión en el promotor), en contraste, en los linfocitos normales, esta marca es de mayor intensidad. En cambio las marcas correspondientes a MECP2 y MBD2, que reconocen secuencias metiladas, son más intensas en el afectado y de menor intensidad en los linfocitos normales.

4. Falta identificar la alteración paterna que dió origen al peculiar patrón de herencia y retinoblastoma en esta familia. Como se mencionó, debido a la complejidad estructural y la diversidad de mutaciones descritas, sería muy informativo realizar secuenciación completa del gen. Otras opciones es analizar las mutaciones descritas que ocasionan PI y sesgo de afectados semejantes a lo observado en RBF60. Sin embargo la opción más viable es analizar la mutación muy recientemente publicada que afecta la región de impronta, la comparten una serie de familias no relacionadas, ocasiona PI y sesgo de afectados (120), características que RBF60 también comparte con esas familias.

IX CONCLUSIÓN GENERAL

Este estudio es una demostración más de la complejidad de los padecimientos oncológicos. Como se mencionó desde el principio, identificar factores hereditarios en la etiología del cáncer ha llevado mucho tiempo y, seguramente se seguirá invirtiendo aún más puesto que, uno de los aspectos prometedores en estas complejas y devastadoras enfermedades es identificar precozmente las personas en riesgo.

En esta investigación no se pudo dar respuesta a la pregunta fundamental (metilación en el promotor del gen *RB1* de origen paterno), no obstante se comprueba que el estudio de familias es una actividad necesaria para avanzar en el conocimiento básico de estas enfermedades. El análisis molecular de una sola familia permitió identificar alteraciones no conocidas, ubicando un panorama pleno de interesantes interrogantes, más que las inicialmente propuestas. No obstante queda una cierta incertidumbre frente a la familia del estudio por no tener una respuesta convincente para ella.

Los resultados obtenidos en la parte experimental indican claramente que para comprender el significado biológico de las interacciones genético-epigenéticas en el contexto de la herencia epigenética, el único camino es continuar el trabajo experimental

El trabajo experimental realizado, al igual que el trabajo clínico, demostró que desde un punto de vista de trabajo científico, el presente estudio es una pequeña muestra que ilustra tal vez, que no es la respuesta de una pregunta lo que hace el avance de la ciencia, mas bien, es la serie de interrogantes que genera, lo que induce a seguir en el camino que hace el avance.

X. PACIENTES, MATERIAL Y METODOS

Primera parte

- 1. Tipo de estudio:** Descriptivo y prospectivo “Tamizaje clínico genético-oncológico”
- 2. Población de estudio:** Pacientes de la consulta de primera vez que acuden al Hospital de Oncología del CMN, SXXI; de ambos sexos, de cualquier edad, con cualquier tipo de diagnóstico de neoplasia maligna, confirmado por histopatología.
- 3. Población de referencia:** Población derechohabiente usuaria adscrita al Hospital de Oncología, CMN, SXXI que procede principalmente de la Ciudad de México, Estado de México, y de los estados de Guerrero, Chiapas, Querétaro, Hidalgo y Morelos.
- 4. Período de estudio y tamaño de la muestra:** Se determinó estudiar el número de casos que se reunieran en el lapso de un año. Para identificar el caso índice o probando la selección fue al azar, uno de cada diez pacientes consecutivos independientemente del edad, género y diagnóstico.
- 5. Variables de estudio: criterios de discriminación.**
 - 5.1 Antecedente de cáncer (ACA).** Se consideró existente cuando en la familia del probando hubiera por lo menos un familiar de cualquier grado de parentesco que tuvieran o hayan tenido neoplasias malignas; independientemente de la edad en que se hizo el diagnóstico y del tipo de cáncer desarrollado. Se consideran familiares de primer grado a los padres, hermanos e hijos; de segundo a los

abuelos, tíos, tías maternos y paternos, los primos corresponden a familiares de tercer grado.

5.2 Agregación de neoplasias. Se consideró existente a la presencia de dos o más miembros de la genealogía, independientemente de la edad y género con igual o diferente tipo de neoplasias.

5.3 Criterios clínicos: (ET) Edad temprana. **(Multis)** Tumor bilateral, múltiple primario o multifocal. **(TV)** Transmisión vertical paso de una característica o rasgo, de una generación a la siguiente por medio de un afectado.

a) **ET.** Se consideró edad temprana, en términos generales, cuando alguno de los afectados desarrolló una neoplasia maligna antes de los 40 años de edad.

b) **MULTIS.** Se consideró existente ya fuera por la presencia de tumor bilateral (órganos pares con neoplasia) o, cuando el mismo paciente desarrolló tumores primarios en diferentes órganos o, presentación de más de un foco primario en el mismo órgano. Obligado el diagnóstico por estudio histopatológico para poder clasificar como tumor bilateral, multifocal o bien como múltiple primario.

c) **TV.** La agregación de afectados se catalogó con transmisión vertical, cuando la transmisión del rasgo (cáncer) a la siguiente generación, ocurrió por medio de alguno de los progenitores afectado (con cualquier tipo de neoplasia), a los hijos de ambos géneros, sin saltar generaciones y los afectados se encontraron distribuidos en una sola rama familiar, correspondiente a la del progenitor afectado.

6. Análisis con criterios de alto riesgo específicos para clasificación a síndromes de susceptibilidad.

Cada síndrome de susceptibilidad está constituido por criterios específicos, ya publicados (37), que las familias sugestivas de uno de estos síndromes deben cumplir; además de reunir las características esenciales de los criterios clínicos ya mencionados y una agregación particular de neoplasias,

El objetivo de los criterios de alto riesgo es identificar pacientes o familias que reúnan los criterios diagnósticos publicados para un síndrome particular. Se basan en la probabilidad de tener una mutación en genes de susceptibilidad o excedan el umbral de 10% de probabilidad de encontrar una mutación germinal en genes de susceptibilidad (23,24,33,34,37).

El objetivo de los criterios para riesgo moderado es identificar pacientes con un riesgo ≤ 2 de desarrollar un cáncer particular pero que no reúnen los criterios para un síndrome de susceptibilidad (34,35,37)

Ambos tipos de pacientes requieren asesoramiento genético y vigilancia médica especializada, mientras que la realización de un análisis molecular, está supeditada a la decisión individual de cada paciente (34,37).

7. Descripción general del estudio.

El estudio se realizó en la consulta externa de un hospital de alta especialidad, como se muestra en el diagrama de flujo (Figura 35). El personal de la consulta aplicó un cuestionario previamente validado que se muestra en el Anexo 1, a uno de cada diez pacientes de primera vez, independientemente de la edad, género y

tipo de diagnóstico de cáncer. Mediante este procedimiento se exploró el antecedente de cáncer con lo cual se identificó al caso índice o probando de cada familia. Los casos con al menos otro familiar afectado con igual o diferente tipo de cáncer al del probando, se citaron a la consulta externa de genética oncológica, para realizar un estudio genealógico completo (42). El método que se siguió para la selección de las familias fue el de averiguación única incompleta, que consiste en identificar a la familia por medio de un solo individuo enfermo, que se denomina el caso índice o probando (121).

8. Caso índice o probando. Persona independientemente del género y la edad, que acude a consulta por primera vez, con diagnóstico histopatológico de cualquier tipo de neoplasia maligna. Es la persona mediante la cual se detecta a la familia correspondiente.

9. Estudio genealógico. El estudio consistió en obtener información de por lo menos tres generaciones consecutivas del probando, quién debe tener un diagnóstico histopatológico confirmatorio de neoplasia maligna; además de anotar si corresponde a un tumor primario, bilateral, múltiple primario o multifocal. En cada generación se indica el orden preciso de nacimiento de todos y cada uno de los miembros de esa generación, las enfermedades, incluyendo los decesos y causa de estos. En los demás afectados o decesos por cáncer, se registró la edad en que se hizo el correspondiente diagnóstico y su fuente de confirmación; ya fuera por estudio histopatológico, por medio del expediente clínico, obtención del certificado de defunción o por historia familiar. En cada genealogía se analizó la

distribución de los afectados en las diferentes generaciones para determinar el patrón de herencia.

Una vez evaluados conjuntamente los criterios clínicos, se analiza la agregación del tipo de neoplasias que presentaron cada uno de los afectados, para su clasificación, de acuerdo a los criterios de alto riesgo, a un posible síndrome de susceptibilidad hereditaria o, a una agregación inespecífica posiblemente de menor riesgo. La evaluación concluye con la selección de familias candidato para el estudio molecular. A las familias seleccionadas se les otorga asesoramiento genético pre y post análisis molecular. Este asesoramiento, incluyó la información sobre el posible padecimiento oncológico familiar, las posibilidades de diagnóstico molecular, de su transmisión hereditaria, así como las posibilidades de detección temprana y prevención precoz de neoplasias particulares en cada familia.

Posteriormente, el análisis molecular se realiza únicamente en las familias que voluntariamente lo aceptaron, mediante un documento de consentimiento informado, Anexo 2. En el diagrama de la figura 34 se ilustra el proceso del tamizaje.

10. Análisis estadístico.

Se construyeron tablas de contingencia para analizar la relación entre variables categóricas utilizando la prueba exacta de Fisher para probar significancia estadística. Se calcularon riesgos relativos con sus correspondientes intervalos de confianza.

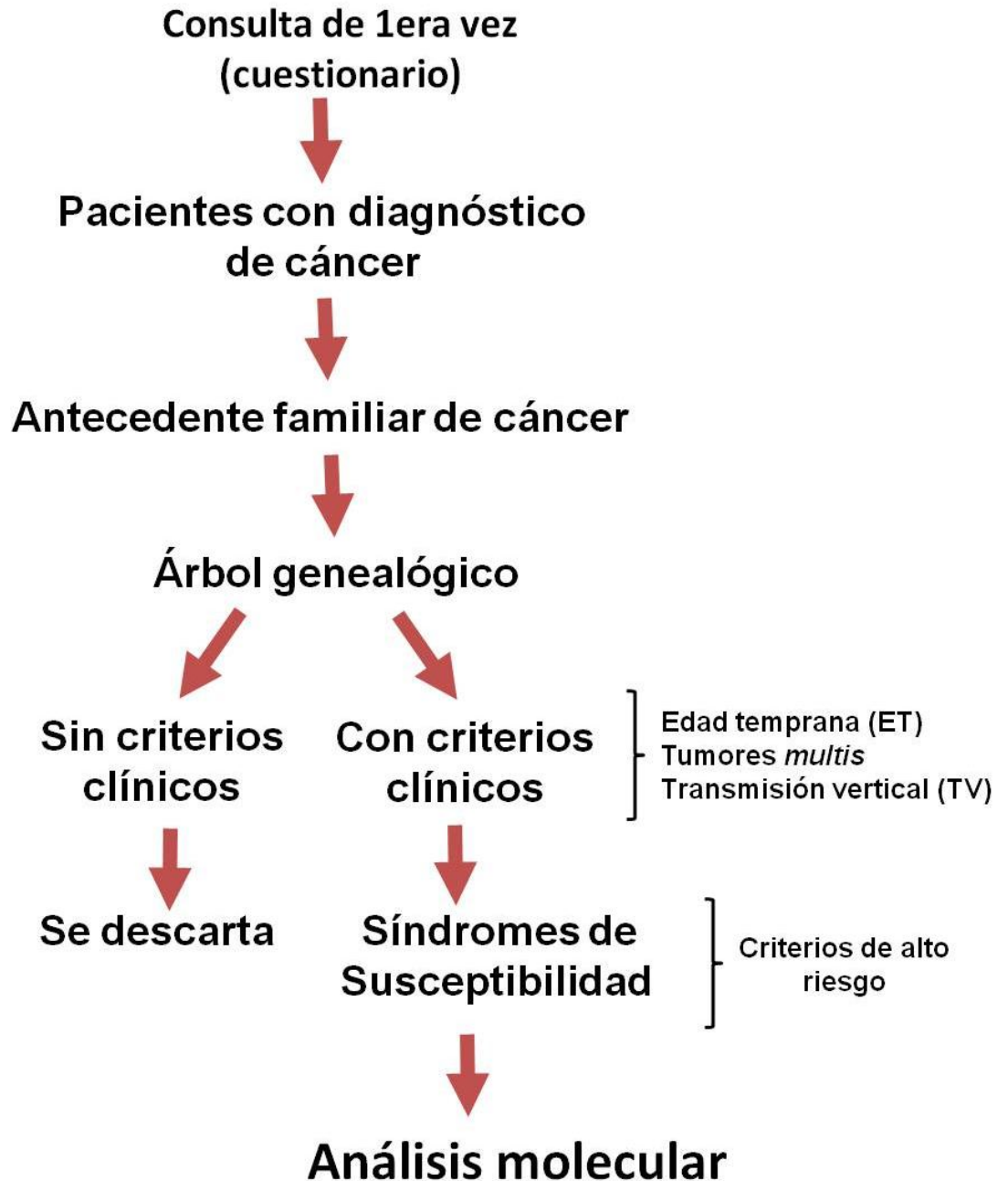


Figura 35. Tamizaje genético-oncológico. En el diagrama se indica que el paciente llega a la consulta de primera vez. Se aplica el cuestionario en el que se identifica si existe el antecedente de cáncer; en caso positivo se realiza el árbol genealógico completo, en el cual se verifica los criterios clínicos. Si estos están presentes, se analizan conjuntamente con el tipo de neoplasias desarrolladas por cada uno de los enfermos de la familia y finalmente, se determina, mediante los criterios de alto riesgo, si corresponde a un síndrome específico de susceptibilidad hereditaria. Con este procedimiento de tamizaje se pretende lograr una selección más rigurosa de las familias de alto riesgo por tener mayor probabilidad de identificar una alteración molecular informativa. Aspecto correspondiente a la segunda parte de este trabajo.

Segunda parte

1. Análisis clínico: La familia que se seleccionó para el análisis molecular se denominó RBF60 portadora de retinoblastoma hereditario, la cual se identificó en el estudio de tamizaje (primera parte de este trabajo). Corresponde a la familia 60 (Figura 14).

El probando (↑) se identificó porque a los 38 años de edad desarrolló melanoma maligno como una segunda neoplasia. Se propuso investigar la posibilidad de metilación germinal del promotor del gen *RB1* en esta familia, por presentar una genealogía de 6 generaciones y retinoblastoma unilateral en tres generaciones sucesivas, transmitido por medio de portadores sanos y presentar gran número de hombres afectados y portadores sanos.

Para la obtención de las muestras biológicas se obtuvo consentimiento informado de todos los miembros de la familia.

Debido al fallecimiento del padre del probando, se decidió un análisis de marcadores polimórficos (que se indican en material y métodos), con el propósito de facilitar la interpretación de los posibles resultados (103,104).

2. Análisis de metilación del ADN

2.1 Obtención de ADN de linfocitos circulantes y de tumor en bloques de parafina

Se extrajo ADN genómico de linfocitos circulantes en todos los miembros de la familia, excepto en el padre y una hermana afectada (ambos fallecidos) del probando. Para la extracción y purificación de ADN de linfocitos circulantes se uso

el kit de Quiagen. Del probando también se extrajo ADN del melanoma incluido en parafina. Para la extracción y purificación del DNA se usó el kit de Quiagen para tejido incluido en bloques de parafina. Se siguieron las instrucciones del fabricante. El ADN se eluyó en agua.

2.2 Técnica de conversión de DNA mediante bisulfito de sodio

Tratamiento con bisulfito de sodio. Se procesaron 8 muestras de DNA de linfocitos circulantes y una de ADN del melanoma. La reacción de conversión con bisulfito de sodio se realizó durante 16 hrs. a 50°C con 2 µg de DNA, como se ha descrito previamente (81,99,100). Las muestras se purificaron usando el sistema de columnas Wizard DNA Clean-up System (Promega). El DNA se precipitó con etanol, se secó y resuspendió en 30 µl de agua, se almacenó a menos 20°C.

2.3. PCR, oligonucleótidos para la amplificación de la región promotora del gen *RB1*, clonación del promotor; secuenciación del producto clonado

Se analizó la región promotora del gen *RB1* constituida por una isla de 27 CpGs (position 1634-2020 GenBank accession number L11910.1 GI: 292420). La PCR se realizó en un volumen de reacción de 30 µl conteniendo 2 µl de DNA genómico tratado con bisulfito de sodio, 10 mM dNTPs, 15 pM "primers", 2.5 mM MgCl, AmpliTaq DNA polimerasa 2.5 U. Las condiciones de termociclado de 95°C 15 min, 95°C 40 sec, 66°C 40 sec, 72°C 40 sec, 72°C 5 min; 33 ciclos. Se usaron primers MIP (Methylation independent primers) previamente utilizados para esta región con la siguiente secuencia Rb_{fw}: 5'-TTAGGTTTTTTAGTTTAATTTTTAT-3'. Rb_{rev}: 5'- AACTATAAAAAAACCCCAAAAAAAC-3' (81,99,100).

Localización: respecto del sitio de inicio de la transcripción (ATG) Rbfw inicio - 316 a -291. Rbrev inicio -53 a -28 (en la Figura 36 se muestra la posición de alineamiento en la región promotora (promotor del gen *RB1*). El producto de amplificación de 300 pb se purificó mediante el kit QIAEX II Gel Extraction Kit, (Quiagen) y se clonó mediante el sistema pGEM-T Easy Vector System (Promega) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Para conocer el patrón de metilación se secuenciaron 8 a 10 clonas individuales de cada una de las 9 muestras mencionadas.

Rb forward: 5'-TTAGGTTTTTTAGTTTAATTTTTTAT-3' (No Cs)
Rb reverse: 5'-AACTATAAAAAACCCCAAAAAAAC-3' (No Gs)

```
CCGACTTTGCAAAACGGATTGGGCGGGATGAGAGGTGGGGGGCGCCCAAGGAGGGAGAG
TGGCGCTCC
CGCCGAGGGTGCCTAGCCAGATATTCCCTGCGGGGCCGAGAGTCTTCCCTATCAGACCC
CGGGATAGG
GATGAGGCCACAGTCACCCACCAGACTCTTTGTATAGCCCCGTTAAGTGCACCCCGGCCT
GGAGGGGGT
GGTTCTGGGTAGAAGCACGTCCGGGCCGCGCCGGATGCCTCCTGGAAGGCGCTGGACCCA
CGCCAGGTT
TCCAGTTTAATTCCTCATGACTTAGCGTCCAGCCGCGCACCGACCAGCGCCCCAGTTC
CCCACAGAC
GCCGGCGGGCCCGGGAGCCTCGCGGACGTGACGCCGCGGGCGGAAGTGACTTTCCCGCG
GTTGGACGC
GGCGCTCAGTTGCCGGCGGGGAGGGCGCGTCCGGTTTTTCTCAGGGGACGTTGAAATTA
TTTTTGTA
CGGGAGTCGGGAGAGGACGGGGCGTGCCCCGACGTGCGCGCGCGTCTCCTCCCCGGCGCT
CCTCCACAG
CTCGCTGGCTCCCGCCGCGAAAGGCGTCATGCCGCCAAAACCCCCGAAAAACGGCCGC
CACCGCCGC
CGTGCCGCCGCGGAACCCCCGGCACCGCCGCCGCCGCCCTCCTGAGGAGGACCCAGAG
CAGGACAGC
GGCCCGGAGGACCTGCCTCTCGTCAGGTGAGCGAGCAGAGCCGCCGTCGCCTCACGCGGGA
AGGGCGCCC
```

G Localización cromosómica del primer Rbfw 48303487
C Localización cromosómica primer Rbrev 48303873

GACGTTTTT Localización del cambio de secuencia 48303725, 26
ATG Sitio de inicio de la transcripción 48303915

Figura 36. Promotor del gen *RB1*. En el esquema se indica la secuencia de los sitios de alineamiento de los respectivos primers utilizados: “primer forwar” Rbfw. **G** localización cromosómica 48303487; “primer reverse” Rbrev. **C** Localización cromosómica 48303873. Localización cromosómica del cambio de secuencia **GACGTTTTT**, 48303725, 26. Sitio de inicio de la transcripción **ATG**, 48303915

3. Análisis de microsatélites polimórficos

Se analizaron los haplotipos de un set de 16 marcadores de microsatélites: D8S1179, D21S11, D7S820, CSFIPO, D3S1358, TH01, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenina, D5818, FGA y D16S539 (cromosoma 16q24.1), incluido uno del cromosoma D: D13S317 (Cromosoma 13q31.1) (103, 104).

XI REFERENCIAS.

1. **Knox SS.** From 'omics' to complex disease: a systems biology approach to gene-environment interactions in cancer. *Cancer Cell Int.* 2010; 10:11.
2. **Stewart BW.** World Cancer reports 2014
3. **Jemal A,** Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19(8):1893-907
4. **Ferlay J,** Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015; 136(5):E359-86.
5. **McCormack VA,** Boffetta P. Today's lifestyles, tomorrow's cancers: trends in lifestyle risk factors for cancer in low- and middle-income countries. *Ann Oncol.* 2011; 22(11):2349-57.
6. **Hemminki K,** Lorenzo Bermejo J, Försti A. The balance between heritable and environmental aetiology of human disease. *Nat Rev Genet.* 2006; 7(12):958-65.
7. **Knudson AG Jr.** Genetics of human cancer. *Annu Rev Genet.* 1986; 20:231-51.
8. **Jones PA,** Baylin SB . The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002; 3(6):415-28.
9. **Hansen MF,** Cavenee WK. Genetics of cancer predisposition. *Cancer Res.* 1987; 47(21):5518-27.
10. **Evans HJ.** Genetic and molecular aspects of human multigenerational carcinogenesis. *IARC Sci Publ.* 1989; (96):315-33.
11. **Perera FP.** Environment and cancer: who are susceptible? *Science.* 1997; 278(5340):1068-73.
12. **Pharoah PD,** Dunning AM, Ponder BA, Easton DF. Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(11):850-60.

13. **Albert S**, Child M. Familial cancer in the general population. *Cancer*. 1977; 40(4):1674-9.
14. **Hemminki K**, Sundquist J, Lorenzo Bermejo J. Familial risks for **cancer** as the basis for evidence-based clinical referral and counseling. *Oncologist*. 2008; 13(3):239-47.
15. **Oliver CP**. Studies on human cancer families. *Ann N Y Acad Sci*. 1958; 71(6):1198-212.
16. **Hopper JL**, Bishop DT, Easton DF. Population-based family studies in genetic epidemiology. *Lancet*. 2005; 366(9494):1397-406.
17. **Richards EJ**. Inherited epigenetic variation--revisiting soft inheritance. *Nat Rev Genet*. 2006; 7(5):395-401.
18. **Weitzel JN**, Blazer KR, MacDonald DJ, Culver JO, Offit K. Genetics, genomics, and cancer risk assessment: State of the Art and Future Directions in the Era of Personalized Medicine. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61(5):327-59
19. **Slavin TP**. Clinical applications of multigene panels: challenges of next-generation counseling and cancer risk management. *Front Oncol* 2015;208.
20. **Evans HJ**, Prosser J. Tumor-suppressor genes: cardinal factors in inherited predisposition to human cancers. *Environ Health Perspect*. 1992; 98:25-37.
21. **Hanahan D**, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1):57-70.
22. **Fearon ER**. Human cancer syndromes: Clues to the origin and nature of cancer. *Science* 1997; 278: 1043-1050.
23. **Nagy R**, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene*. 2004; 23: 6445-6470.
24. **Garber JE**, Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 276-292.
25. **Lynch HT**, Shaw MW, Magnuson CW, Larsen AL, Krush AJ. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch Intern Med*. 1966; 117(2):206-12.
26. **Fishel R**, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its

association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*. 1993; 75(5):1027-38

27. **Papadopoulos N**, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science*. 1994; 263(5153):1625-9.
28. **Hall JM**, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*. 1990; 250(4988):1684-9.
29. **Miki Y**, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994; 266(5182):66-71.
30. **Knudson AG Jr**. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68:820-823.
31. **Friend SH**, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*. 1986; 323(6089):643-6.
32. **Knudson AG**. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1(2):157-62.
33. **Sweet KM**, Bradley TL, Westman JA. Identification and referral of families at high risk for cancer susceptibility. *J Clin Oncol*. 2002; 20(2):528-37.
34. **American Society of Clinical Oncology**. American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol*. 2003; 21(12):2397-406
35. **Tabori U**, Malkin D. Risk stratification in cancer predisposition syndromes: lessons learned from novel molecular developments in Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Res*. 2008; 68(7):2053-7.
36. **Tinley ST**, Lynch HT. Integration of family history and medical management of patients with hereditary cancers. *Cancer*. 1999; 86(11 Suppl):2525-32.

37. **Hampel H**, Sweet K, Westman JA, Offit K, Eng C. Referral for cancer genetics consultation: a review and compilation of risk assessment criteria. *J Med Genet.* 2004; 41(2):81-91.
38. **Apostolou P**, Fostira F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:747318.
39. **Canto MI**, Harinck F, Hruban RH, Offerhaus GJ, Poley JW, Kamel I, Nio Y, Schulick RS, Bassi C, Kluijft I, Levy MJ, Chak A, Fockens P, Goggins M, Bruno M; International Cancer of Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer. *Gut.* 2013; 62(3):339-47.
40. **Vasen HF**, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology.* 1999; 116(6):1453-6.
41. **Martínez-Sánchez**, Yazmín Lizeth; Escudero-de los Ríos, Pedro Mario; Arias-Flores, Rafael; Barrios-Bautista, Florentino. Epidemiología del cáncer en pacientes adultos del Hospital de Oncología del Centro Médico Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. *Cir Cir* 2013; 81:508-516
42. **Quiñonez-Silva G**, Agregación Genealógica de Cáncer en Familias de Niños con Diagnóstico de Neoplasias Sólidas Malignas. Tesis de Maestría en Ciencias Médicas. Facultad de Medicina UNAM, División de Estudios de Posgrado e Investigación. Subdivisión de Maestrías y Doctorados. 1995
43. **González León M**, Fernández Garate JE. Rascón-Pacheco RA, Valladares Aranda MA, Dávila-Torres J, Borja Aburto BH. The burden of disease of cancer in the Mexican Social Security Institute. *Salud Pública Mex.* 2016; 58:132-141
44. **Wilkie AO**. The molecular basis of genetic dominance. *J Med Genet.* 1994; 31(2):89-98.
45. **Liu T**, Kontham V, Nilsson D, Lindblom A. Whole-genome Linkage Analysis and Sequence Analysis of Candidate Loci in Familial Breast Cancer. *Anticancer Res.* 2015; 35(6):3155-65.

46. **Wittersheim M**, Büttner R, Markiefka B. Genotype/Phenotype correlations in patients with hereditary breast cancer. *Breast Care (Basel)*. 2015; 10(1):22-6.
47. **Byrnes GB**, Southey MC, Hopper JL. Are the so-called low penetrance breast cancer genes, ATM, BRIP1, PALB2 and CHEK2, high risk for women with strong family histories?. *Breast Cancer Res*. 2008; 10(3):208.
48. **Boland CR**, Koi M, Chang DK, Carethers JM. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer*. 2008; 7(1):41-52.
49. **Stoffel EM**, Mangu PB, Gruber SB, Hamilton SR, Kalady MF, Lau MW, Lu KH, Roach N, Limburg PJ; American Society of Clinical Oncology; European Society of Clinical Oncology. Hereditary colorectal cancer syndromes: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline endorsement of the familial risk-colorectal cancer: European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines. *J Clin Oncol*. 2015; 33(2):209-17.
50. **Van Speybroeck L**. From epigenesis to epigenetics: the case of C. H. Waddington. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 981:61-81.
51. **Morange M**. The relations between genetics and epigenetics: a historical point of view. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 981:50-60.
52. **Berger SL**, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*. 2009; 23(7):781-3.
53. **Sharma S**, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010; 31(1):27-36.
54. **Lange UC**, Schneider R. What an epigenome remembers. *Bioessays*. 2010; 32(8):659-68.
55. **Messerschmidt DM**, Knowles BB, Solter D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev*. 2014; 28(8):812-28.
56. **Meng H**, Cao Y, Qin J, Song X, Zhang Q, Shi Y, Cao L. DNA methylation, its mediators and genome integrity. *Int J Biol Sci*. 2015; 11(5):604-17.

57. **Seisenberger S**, Peat JR, Hore TA, Santos F, Dean W, Reik W. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013; 368(1609):20110330.
58. **Kobayashi H**, Sakurai T, Miura F, Imai M, Mochiduki K, Yanagisawa E, Sakashita A, Wakai T, Suzuki Y, Ito T, Matsui Y, Kono T. High-resolution DNA methylome analysis of primordial germ cells identifies gender-specific reprogramming in mice. *Genome Res.* 2013; 23(4):616-27.
59. **Okamoto Y**, Yoshida N, Suzuki T, Shimozawa N, Asami M, Matsuda T, Kojima N, Perry AC, Takada T. DNA methylation dynamics in mouse preimplantation embryos revealed by mass spectrometry. *Sci Rep.* 2016; 6:19134.
60. **Johnson TB**, Coghill RD. The Discovery of 5-methyl-cytosine in Tuberculinic Acid, The Nucleic Acid of the Tubercle Bacillus. *J Am Chem Soc.* 1925; 47:2838-44.
61. **Hotchkiss RD**. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem.* 1948; 175(1):315-32.
62. **Riggs AD**. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet.* 1975; 14(1):9-25.
63. **Holliday R**, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science.* 1975; 187(4173):226-32.
64. **Zapienza C**, Peterson AC, Rossant J, Balling R. Degree of methylation of transgenes is dependent on gamete of origin. *Nature* 1987;238:251-254
65. **Surani MA**. Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. *Cell* 1989; 93:309-312.
66. **Reik W**, Collick A, Norris M, Barton S, Surani MA. Genomic imprinting in transgenic mice. *Nature* 1987;328:248-251
67. **Saxonov S**, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jan 31;103(5):1412-7.
68. **Weber M**, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, Schübeler D. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of

promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet.* 2007; 39(4):457-66.

69. **Bestor TH.** Cloning of a mammalian DNA methyltransferase. *Gene.* 1988; 74(1):9-12.
70. **Bronner C,** Krifa M, Mousli M. Increasing role of UHRF1 in the reading and inheritance of the epigenetic code as well as in tumorigenesis. *Biochem Pharmacol.* 2013; 86(12):1643-9.
71. **Kurihara Y,** Kawamura Y, Uchijima Y, Amamo T, Kobayashi H, Asano T, Kurihara H. Maintenance of genomic methylation patterns during preimplantation development requires the somatic form of DNA methyltransferase 1. *Dev Biol.* 2008; 313(1):335-46.
72. **Kato Y,** Kaneda M, Hata K, Kumaki K, Hisano M, Kohara Y, Okano M, Li E, Nozaki M, Sasaki H. Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum Mol Genet.* 2007; 16(19):2272-80.
73. **Tahiliani M,** Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science.* 2009; 324(5929):930-5.
74. **Lee HJ,** Hore TA, Reik W. Reprogramming the methylome: erasing memory and creating diversity. *Cell Stem Cell.* 2014; 14(6):710-9.
75. **Seisenberger S,** Andrews S, Krueger F, Arand J, Walter J, Santos F, Popp C, Thienpont B, Dean W, Reik W. The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol Cell.* 2012; 48(6):849-62.
76. **Carone B.R,** Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, Bock Ch, Li Ch, Gu H, Zamore PD, Meissner A, et al. Paternally Induced Transgenerational Environmental Reprogramming of Metabolic Gene Expression in Mammals. *Cell* 2010; 143:1084-1096.
77. **Reis AH,** Vargas FR, Lemos B. More epigenetic hits than meets the eye: microRNAs and genes associated with the tumorigenesis of retinoblastoma. *Front Genet.* 2012 Dec 7; 3:284.

78. **Greger V**, Passarge E, Höpping W, Messmer E, Horsthemke B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet.* 1989; 83(2):155-8.
79. **Sakai T**, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet.* 1991; 48(5):880-8.
80. **Ohtani-Fujita N**, Dryja TP, Rapaport JM, Fujita T, Matsumura S, Ozasa K, Watanabe Y, Hayashi K, Maeda K, Kinoshita S, Matsumura T, Ohnishi Y, Hotta Y, Takahashi R, Kato MV, Ishizaki K, Sasaki MS, Horsthemke B, Minoda K, Sakai T. Hypermethylation in the retinoblastoma gene is associated with unilateral, sporadic retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1997; 98(1):43-9.
81. **Stirzaker C**, Millar DS, Paul Ch L, Warnecke PM, Harrison J, Vincent PC, Frommer M, Clark SJ. Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors. *Cancer Res.* 1997; 57:2229-2237.
82. **Ohtani-Fujita N**, Fujita T, Aoike A, Osifchin NE, Robbins PD, Sakai T. CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene.* 1993; 8(4):1063-7.
83. **Leach RJ**, Magewu AN, Buckley JD, Benedict WF, Rother C, Murphree AL, Griegel S, Rajewsky MF, Jones PA. Preferential retention of paternal alleles in human retinoblastoma: evidence for genomic imprinting. *Cell Growth Differ.* 1990; 1(9):401-6.
84. **Munier F**, Spence MA, Pescia G, Balmer A, Gailloud C, Thonney F, van Melle G, Rutz HP. Paternal selection favoring mutant alleles of the retinoblastoma susceptibility gene. *Hum Genet.* 1992; 89(5):508-12.
85. **Anwar SL**, Krech T, Hasemeier B, Schipper E, Schweitzer N, Vogel A, Kreipe H, Lehmann U. Deregulation of RB1 expression by loss of imprinting in human hepatocellular carcinoma. *J Pathol.* 2014; 233(4):392-401.
86. **Tasiou V**, Hiber M, Steenpass L. A Mouse Model for Imprinting of the Human Retinoblastoma Gene. *PLoS One.* 2015 Aug; 10(8):e0134672.
87. **Kanber D**, Buiting K, Roos C, Gromoll J, Kaya S, Horsthemke B, Lohmann D. The origin of the RB1 imprint. *PLoS One.* 2013; 8(11):e81502

88. **Buiting K**, Kanber D, Horsthemke B, Lohmann D. Imprinting of RB1 (the new kid on the block). *Brief Funct Genomics*. 2010; 9(4):347-53.
89. **Steenpass L**, Kanber D, Hiber M, Buiting K, Horsthemke B, Lohmann D. Human PPP1R26P1 functions as cis-repressive element in mouse Rb1. *PLoS One*. 2013; 8(9):e74159.
90. **Shearwin KE**, Callen BP, Egan JB. Transcriptional interference--a crash course. *Trends Genet*. 2005; 21(6):339-45.
91. **Weishelbaum RR**, Beckett M, Diamond A. Some retinoblastomas, osteosarcomas and soft tissue sarcomas may share a common etiology. *Proc. Natl, Nat, Acad Sci. USA* 1988; 85:2106-2109
92. **Amberger JS**, Bocchini CA, Schiettecatte F, Scott AF, Hamosh A. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan;43(Database issue):D789-98.
93. **Broadus E**, Topham A, Sing AD: Incidence of retinoblastoma in the USA. 1975-2004. *Br. J. Ophthalmol*, 2009, 93:21-23.
94. **Lohmann DR**, Gallie BL: Retinoblastoma: revisiting the model prototype of inherited cancer. *Am. J. Med. Genet. Part C(Semin. Med. Genet)*, 2004, 129C:23-28
95. **Yu CL**, Tucker MA, Abramson DH, Furukawa K, Seddon JM, Stovall M, Fraumeni JF Jr, Kleinerman RA. Cause-specific mortality in long-term survivors of retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst*. 2009; 101(8):581-91.
96. **den Dunnen JT**, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat*. 2000; 15:7-12
97. **Sakai T**, Ohtani N, McGee TL, Robbins PD, Dryja TP. Oncogenic germline mutations in Sp1 and ATF sites in the human retinoblastoma gene. *Nature*. 1991;353:83-6.
98. **Ohtani-Fujita N**, Fujita T, Takahashi R, Robbins PD, Dryja TP, Sakai T. Asilencer element in the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene*. 1994;9(6):1703-11

99. **De La Rosa-Velázquez IA**, Rincón Arana H, Benítez-Bribiesca L, Recillas-Targa F. Epigenetic Regulation of the Human Retinoblastoma tumor Suppressor Gene Promoter by CTCF. *Cancer Res* 2007; 67:2577-85.
100. **Dávalos Salas M**, Furlan-Magaril M, González Buendía E, Valdes-Quezada Ch, Ayala-Ortega E, Recillas-Targa F. Gain of DNA Methylation is enhanced in the absence of CTCF at the human retinoblastoma gene promoter. *BMC, Cancer* 2011, 11:232
101. **Savoysky E**, Mizuno T, Sowa Y, Watanabe H, Sawada J, Nomura H, et al. The retinoblastoma binding factor 1 (RBF-1) site in RB gene promoter binds preferentially E4TF1, a member of the Ets transcription factors family. *Oncogene*. 1994;9(7):1839–46
102. **Cowell JK**, Bia B, Akoulitchev A. A novel mutation in the promotor region in a family with a mild form of retinoblastoma indicates the location of a new regulatory domain for the RB1 gene. *Oncogene*. 1996;12(2):431–6.
103. Ensembl 2015. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Marker/Details?m=SHGC-4544. Accessed July 2015
104. Homo sapiens:GRCh38.p2 (GCF_000001405.28)Chr 13 (NC_000013.11):48.30M - 48.30M. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/?q=rs387906520>. Accessed November 2015.
105. **Kato MV**, Ishizaki K, Shimizu T, Ejima Y, Tanooka H, Takayama J, et al. Parental origin of germline and somatic mutations in the retinoblastoma gene. *Hum Genet* 1994, 94:31-38.
106. **Naumova A**, Sapienza C. The genetics of retinoblastoma, revisited. *Am J Hum Genet*. 1994; 54(2):264-73.
107. **Klutz M**, Brockman D, Lohmann DR. A parent-of-origin effect in two families with retinoblastoma is associated with a distinct splice mutation in the RB1 gene. *Am. J. Hum. Genet* 2002; 71:174-179.
108. RB1 homepage - rb1-Isdb - Leiden Open Variation Database. http://rb1-Isdb.d-lohmann.de/home.php?select_db=RB1.

109. **Cowell JK**, Bia B, Akoulitchev A. A novel mutation in the promotor region in a family with a mild form of retinoblastoma indicates the location of a new regulatory domain for the RB1 gene. *Oncogene*. 1996; 12(2):431–6
110. **Barbour VM**, Tufarelli C, Sharpe JA, Smith ZE, Ayyub H, Heinlein CA, et al. Alpha-thalassemia resulting from a negative chromosomal position effect. *Blood*. 2000; 96(3):800–7.
111. **Agromayor M**, Wloga E, Naglieri B, Abrashkin J, Verma K, Yamasaki L. Visualizing dynamic E2F-mediated repression in vivo. *Mol Cell Biol*. 2006; 26(12):4448–61.
112. **Ligtenberg MJ**, Kuiper RP, Chan TL, Goosens M, Hebeda KM, Voorendt M. et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons TACSTD1. *Nat Genet*. 2009; 41(1):112–7.
113. **Raval A**, Tanger SM, Byr JC, Angeman EB, Perko JD, Chen S-S, Hackanson B, et al. Down regulation of death associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2007; 129(5):879–90.
114. **Tuffarelli C**, Stanley JAS, Garrick D, Sharpe JA, Ayyub H, Wood WG, et al. Transcription of antisense RNA leading to genetic silencing and methylation as a novel cause of human gene disease. *Nat Genet*. 2003; 34(2):157–65.
115. **Hesson LB**, Hitchins MP, Ward RL. Epimutations and cancer predisposition: importance and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev*. 2010; 20(3):290-8
116. **Hitchins MP**. Inheritance of epigenetic aberrations (constitutional epimutations) in cancer susceptibility. *Adv Genet*. 2010; 70:201-43.
117. **Gustman S**, Klein-Hitpass L, Stephan H, Weber S, Bornfeld N, Kaulisch M, et al. Loss at chromosome arm 16q in retinoblastoma: confirmation of the association with diffuse vitreous seeding and refinement of the recurrently deleted region. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011; 50(5):327–37.
118. **Sloane MA**, Ward RL, Hesson LB. Defining the criteria for identifying constitutional epimutations. *Clin Epigenetics*. 2016;8:39.

119. **Frisan T**, Levitsky V, Masucci M. Generation of lymphoblastoid cell lines (LCLs). *Methods Mol Biol.* 2001;174:125-7.
120. **Eloy P**, Dehainault C, Sefta M, Aerts I, Doz F, Cassoux N, Lumbroso le Rouic L, Stoppa-Lyonnet D, Radvanyi F, Millot GA, Gauthier-Villars M, Houdayer C. A Parent-of-Origin Effect Impacts the Phenotype in Low Penetrance Retinoblastoma Families Segregating the c.1981C>T/p.Arg661Trp Mutation of RB1. *PLoS Genet.* 2016;12(2).
121. **Emery AEH**. *Methodology in medical genetics*. Churchill Livingstone, Edinburg-London-New York, 1^a ed. 1976, cap 4 pp. 43-49

XII. ANEXOS

1. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN QUE SE TITULA

METILACIÓN GERMINAL DEL PROMOTOR DEL GEN *RB1* COMO MECANISMO DE SUSCEPTIBILIDAD EN FAMILIAS CON AGREGACIÓN NEOPLÁSICA

FAMILIA No. _____

NOMBRE: _____

CEDÚLA: _____

MÉXICO D.F. A _____ DE _____ DEL 200 _____

Por este conducto acepto participar en el presente proyecto de investigación, el cual se me ha informado que está registrado con el número 10 HO 99 ante el Comité de Investigación del Hospital de Oncología CMN SXXI., y que el propósito de este estudio es analizar los mecanismos genéticos que confieren susceptibilidad, por la cual, algunas familias se enferman de cáncer. Para que se pueda realizar la investigación, estoy de acuerdo en colaborar y proporcionar la siguiente información y muestras biológicas:

1. La información que se requiere para elaborar el estudio genealógico de mi familia.
2. Muestras de sangre periférica y del tumor si es que necesito cirugía, de las cuales se extraerá el ADN para hacer los estudios correspondientes en el laboratorio de investigación.

Tengo los siguientes derechos:

Se me ha comunicado que la información obtenida por los profesionales autorizados oficialmente para este estudio, es estrictamente confidencial. Que puedo preguntar más detalles sobre la investigación que se está realizando. Y también que continuaré recibiendo mi tratamiento, atención médica, en el caso de no participar o si decido salir del estudio.

NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE _____

NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR _____

TESTIGO _____

INVESTIGADORES RESPONSABLES:

DRA. GUADALUPE QUIÑONEZ SILVA

DR. LUIS BENITEZ BRIBIESCA

DRA. PATRICIA OSTROSKI S.

DR. DIEGO ARENAS ARANDA

DR. FELIX RECILLAS TARGA

2. CUESTIONARIO PARA LA DETECCION DE CASOS-PROBANDO

FECHA _____

No. _____

Nombre _____ Sexo _____ Edad _____

No. de Afiliación _____ Teléfono _____

Domicilio _____

Diagnóstico _____

¿Conoce usted que enfermedades han padecido o tienen actualmente sus siguientes familiares?

Sus hijos no _____ sí _____ ¿Qué enfermedad(es)? _____

Su esposa (o) no _____ sí _____ ¿Qué enfermedad(es)? _____

Sus padres no _____ sí _____ ¿Qué enfermedad (es)? _____

Sus hermanos no _____ sí _____ ¿Qué enfermedad (es)? _____

Sus suegros no _____ sí _____ ¿Qué enfermedad (es)? _____

Sus cuñados (as) no _____ sí _____ ¿Qué enfermedad (es)? _____

Sus sobrinos no _____ sí _____ ¿Qué enfermedad (es)? _____

Otros familiares no _____ sí _____ ¿Qué enfermedad (es)? _____

¿Alguien en su familia o la de su esposa (o) ha padecido alguna de las siguientes enfermedades?

Cáncer no _____ sí _____ ¿quién (es) y en qué parte del cuerpo? _____

Leucemia no _____ sí _____ ¿quién (es)? _____

Tumor (es) no _____ sí _____ ¿quién (es) y en qué parte del cuerpo, benigno o maligno? _____
