

Tesis de Maestría

Estudio molecular del gen Rb1 en pacientes con retinoblastoma

Repetto, Karina Beatriz

2008

Tesis presentada para obtener el grado de Magister de la
Universidad de Buenos Aires en Biología Molecular Médica
de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Repetto, Karina Beatriz. (2008). Estudio molecular del gen Rb1 en pacientes con retinoblastoma. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4735_Repetto

Cita tipo Chicago:

Repetto, Karina Beatriz. "Estudio molecular del gen Rb1 en pacientes con retinoblastoma". Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4735_Repetto

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

***Master en Biología Molecular Medica
Universidad de Buenos Aires***

TESINA

***“Estudio Molecular del Gen Rb1 en Pacientes con
Retinoblastoma”***



87997

KARINA BEATRIZ REPETTO

Directora: Dra Irene Szijan

2008

Agradecimientos

Para llevar a cabo este trabajo he molestado, interrumpido, interrogado, enviado correos electrónicos a numerosas personas, encontrando siempre paciencia, cortesía y entrega personal.

Es por ello, que me gustaría de todo corazón hacer constar mi gran deuda y gratitud:

A la Dra Irene Szijan, por abrirme las puertas de su laboratorio, confiar en mi y guiarme, brindándome la libertad necesaria para crecer.

Al Dr Hector Targovnik, por su gran labor como PROFESOR, transmitiendo sus conocimientos, generando mi fascinación e interés por el mundo de la Biología molecular y genética.

Al Comité de Docencia e Investigación del Hospital José de San Martín, por brindarme la posibilidad de realizar este trabajo.

A Verónica, por contagiarme con su entusiasmo, dedicación, por alentarme, acompañarme, ayudarme, enseñarme y brindarme su amistad.

A Ariel, por su infinita paciencia y su buena predisposición para ayudar y transmitir sus conocimientos, colaborando infinitas veces con mi formación.

A Cecilia, por acompañarme en mi comienzo, confiar en mi y transmitirme sus conocimientos.

A Marcela y Gloria, por alentarme y estimularme con su experiencia.

A mis amigos, por alentarme y no permitir que cediera ante las dificultades.

A mi Mamá y mi hermana, por su amor y apoyo incondicional.

A mi segunda mamá, Cristina, por cuidar a Caro mientras yo escribía, ser mi soporte y alentarme.

A Hernán, mi amor, por acompañarme a lo largo de todo este camino, por su paciencia y confianza en mi.

A mi hija Carolina, por comprender que mamá tenía que terminar su tesis. Por iluminar mi vida y darme nueva energía para enfrentar nuevos retos.

Muchas Gracias!!!!

ÍNDICE



Introducción	4
Objetivos	15
Materiales y Métodos	16
Resultados,	
Etapa I, Estudio de Polimorfismos en el gen RB1	24
Etapa II, Estudio de Mutaciones pequeñas en el gen RB1	35
Discusión	41
Conclusión	48
Resumen	49
Referencias	51

INTRODUCCIÓN



GENÉTICA DEL CÁNCER

La multiplicación de las células esta cuidadosamente regulada y responde a las necesidades específicas del organismo. Los exquisitos controles que regulan la multiplicación celular en raras ocasiones se alteran. La célula en la que esto ocurre, puede adquirir ventajas adaptativas sobre sus vecinas, y comenzar a proliferar. El cambio que ha sufrido esta célula le permite multiplicarse más rápido que sus vecinas, y este es el inicio de un proceso tumoral. Cuando esta célula tiene descendencia proclive a proliferar sin responder a la regulación, el resultado es un clon capaz de expandirse en forma indefinida. Por último este clon de células forma una masa denominada tumor. Podemos decir que el cáncer es un crecimiento neoplásico o maligno que se caracteriza por la pérdida parcial o completa de respuesta a los mecanismos de control externos y una capacidad de proliferación y crecimiento continuo, con la pérdida de la diferenciación celular. El cáncer es causado por mutaciones, pero existen dos diferencias claves entre el cáncer y otras enfermedades genéticas: la primera es que las mutaciones que se observan en el cáncer se producen sobre todo, en células somáticas, mientras que otras enfermedades genéticas sólo son causadas por mutaciones en la línea germinal. Sin embargo, algunos individuos han heredado mutaciones genéticas que los predispone a desarrollar tipos específicos de cáncer. La segunda es que el cáncer no es consecuencia de una mutación aislada, sino más bien, de la acumulación de entre tres a veinte mutaciones, según el tipo de cáncer, en genes que regulan la multiplicación celular normal.

Se observó que dos clases amplias de genes, los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores, desempeñan un papel clave en la inducción del cáncer. Estos genes codifican muchos tipos de proteínas que contribuyen a controlar el crecimiento y la proliferación celular, por lo que las mutaciones en ellos pueden facilitar el desarrollo del cáncer. Los proto-oncogenes normalmente promueven el crecimiento y proliferación celular, las mutaciones en éstos tienden a

ser fenotípicamente dominantes. Los genes supresores de tumores codifican proteínas que inhiben la proliferación celular o promueven la muerte celular. En la mayoría de los casos las mutaciones en estos genes se comportan como recesivas, es decir, que para estimular el desarrollo de un tumor se deben perder o inactivar ambos alelos.¹

El primer gen oncosupresor se identificó en pacientes con retinoblastoma hereditario. Las bases moleculares de las alteraciones en genes supresores de tumores provienen inicialmente de estudios epidemiológicos y genéticos del retinoblastoma (Rb), el tumor ocular maligno más frecuente en la niñez. Las investigaciones realizadas sobre el gen del retinoblastoma (RB1) permitieron revelar que los mecanismos que afectan su función constituyen un fenómeno común en el desarrollo de muchas neoplasias.²

RETINOBLASTOMA: Aspectos Clínicos

El retinoblastoma (Rb) es la neoplasia intraocular más común de la niñez³, con una incidencia estimada de 1:20000 niños nacidos vivos en países desarrollados y aún mayor en países en vías de desarrollo, especialmente en Latinoamérica⁴. Se sabe que el Rb se produce por la proliferación desmesurada de los retinoblastos, células inmaduras de la retina que se encuentran en vías de diferenciación, viéndose afectados específicamente aquellos retinoblastos que se encuentran en la vía de diferenciación hacia fotorreceptores de tipo conos⁵. Por lo tanto, el Rb aparece durante la diferenciación de la retina, en el período intrauterino o neonatal, hasta los 3 años de edad, antes de la completa diferenciación de las células⁶.

El diagnóstico temprano es fundamental para instaurar en forma precoz un tratamiento eficaz, lo cual permite aumentar significativamente la preservación de la visión y la sobrevida⁷. En estadios tempranos, RB intraocular, el tumor se trata mediante protocolo oncológico convencional, en estadios más avanzados el ojo afectado debe ser enucleado para evitar un crecimiento invasivo hacia el nervio óptico o metástasis, Rb extraocular⁸. El pronóstico en este último caso, debido al diagnóstico tardío, es muy pobre con una sobrevida de 5 años⁹.

La aparición del tumor no produce dolor ni molestias en los estadios iniciales y generalmente no produce inflamación. En el caso en que parte de la retina responsable de la visión central clara (fovea) sea reemplazada por tejido tumoral, el afectado evidencia estrabismo⁵. El principal signo diagnóstico es la leucocoria o reflejo pupilar blanco^{1,8}.

En el Rb hereditario (40% casos) la primera mutación ocurre en la línea germinal y puede ser transmitida por el progenitor afectado (Rb hereditario transmitido, 10% casos) o adquirido durante la embriogénesis o en una célula germinal (Rb hereditario de Novo, 30% casos), por lo tanto todas las células del organismo portan esta mutación en el gen Rb1. La segunda mutación es somática en todos los casos (ocurre solamente en retinoblastos), esta presente solamente en el ADN tumoral. En la forma no hereditaria o esporádica (60% casos) ambas mutaciones del gen Rb1 ocurren en un retinoblasto y por lo tanto están solamente presentes en el ADN tumoral⁹.

El Rb trilateral se presenta asociado a Rb unilateral o bilateral, de origen germinal, como un tumor neuroblastico intracraneal, con un porcentaje de 5 a 15 %¹⁰. Es por ello que se ha recomendado que los niños con Rb de origen germinal sean monitoreados con resonancia magnetica nuclear cada 6 meses hasta los 5 años de edad¹¹.

Las personas con una mutación germinal en uno de los alelos RB1 tienen un riesgo relativo de desarrollar retinoblastoma, en el primer año de vida, 36000 veces mayor que la población en general y 2000 veces mayor riesgo de desarrollar otros tumores, durante la segunda década de vida¹². Los pacientes con Rb de origen germinal tienen una mayor predisposición a desarrollar neoplasias malignas secundarias¹³. La incidencia es de 26% $\pm$ 10% en pacientes no irradiados y 58 % $\pm$ 10% en pacientes irradiados, durante los 50 años posteriores al diagnostico de Rb (un rango de 1% por año)¹⁴. Las neoplasias malignas secundarias que pueden presentarse son osteosarcomas, sarcomas de tejido blando y melanomas¹⁵.

■ GEN RB1:

El primer indicio para la localización del gen RB fue proporcionado por el descubrimiento de que aproximadamente el 5 % de los niños con Rb presentaban otras anomalías, incluyendo retraso mental. En varios de estos niños se identificó una deleción intersticial constitutiva de una región del brazo largo del cromosoma 13. La región de solapamiento más pequeña era el 13q14 que posteriormente se demostró que era la localización del locus para la forma dominante autosómica del Rb. Todo ello condujo al clonado del gen y a la identificación del producto génico².

El gen RB1, localizado en el brazo largo del cromosoma 13 (13q14, 1-2)¹⁶⁻¹⁷(Fig.1.1), consta de 27 exones dispersos en aproximadamente 200 Kilobases de ADN genómico. La longitud de cada exón varía entre 31 y 1889 pares de bases, el intrón más largo mide más de 60 kb (intrón 17) y el menor tiene solamente 80pb (intrón 25) (Fig 1.2)¹⁸.



Fig1.1 Localización gen RB1- 13q14, 1-2.⁴⁰

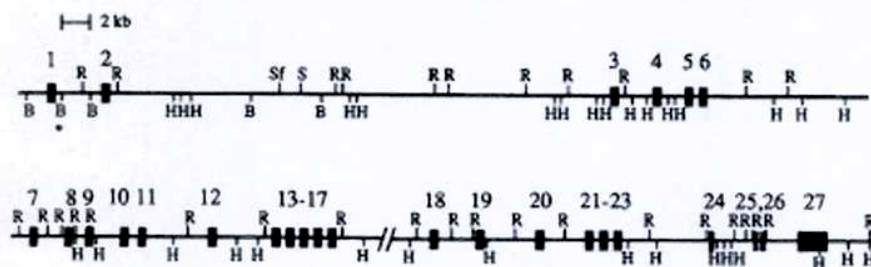


Fig 1.2. Mapa de los exones del gen RB. El tamaño de los exones no están en escala. Sitios de restricción: B, Bam HI; H, HindIII; R, EcoRI; S, Sal I; Sf, Sfi I. Los asteriscos son indicativos de sitios de restricción.¹⁸

El gen Rb1 forma parte de la familia de genes supresores de tumores, los cuales inhiben normalmente el crecimiento celular y regulan negativamente la proliferación. Este gen codifica para una proteína reguladora del ciclo celular llamada pRb (100Kda), la cual se encuentra en forma ubicua en todos los tejidos normales, y forma parte fundamental de la regulación del ciclo celular¹⁹⁻²⁰, en la fase de transición G1/S.

A diferencia de otras neoplasias, donde el gen RB1 se evidencia una vez establecida la patología y está relacionado con la progresión tumoral, en el Rb las mutaciones en el gen RB1 se

relacionan con su iniciación²¹. Es decir, el Rb puede considerarse como una enfermedad monogénica, en la cual el gen responsable de su desarrollo se encuentra caracterizado.

LA PROTEÍNA RETINOBLASTOMA

Analizando la estructura cristalina de la proteína Rb (pRb), la conformación y su secuencia aminoacídica se determinaron los distintos dominios responsables de la funcionalidad proteica (Fig 1.3):

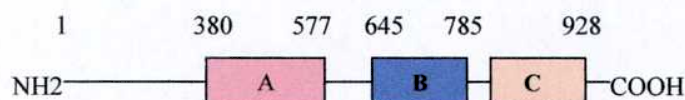


Fig. 1.3 Mapa Lineal de la proteína Rb mostrando la ubicación de los dominios funcionales.

El Dominio B se extiende entre los aminoácidos 645 a 785 y posee un sitio que reconoce y se une al motivo LXCXE (formado por los aminoácidos Lys-X-Cys-X-Glu) encontrados en un gran número de proteínas²². Entre ellas encontramos proteínas celulares: ciclinas tipo D, enzimas desacetilasas de histonas (HDAC) y adenosintrifosfatasa (BRG1)²³ y oncoproteínas virales como E7 de papiloma virus (agente etiológico principal del cáncer cervical), antígeno T grande del virus SV40, antígeno E1A de adenovirus²⁴. Para la interacción de pRB con estas proteínas el dominio B se pliega en una conformación activa y es indispensable que se encuentre en el contexto el dominio A, comprendido por los residuos aminoacídicos 380-577.

El dominio C se extiende entre los aminoácidos 785-928 y contiene el motivo ZRXL (donde Z y X son usualmente residuos básicos) indispensables para el reclutamiento de los complejos ciclinas/cdk (quinasas dependientes de ciclinas), entre ellos cdk2/A, cdk2/E y cdk4/D1, que actúan en la progresión del ciclo celular por medio de la hiperfosforilación e inactivación de pRb²². Se han evidenciado otros sitios en el dominio C para la unión a Tirosina kinasa del protooncogen c-abl y a MDM2²⁵.

La función de inhibidor tumoral que cumple pRb depende de la regulación que ejerce sobre la familia de factores de transcripción E2F, cuya actividad es indispensable para la expresión de

genes que participan en la transición del ciclo celular y la replicación del ADN. Los dominios A y B juntos constituyen un bolsillo por medio del cual E2F se une (Fig 1.4).

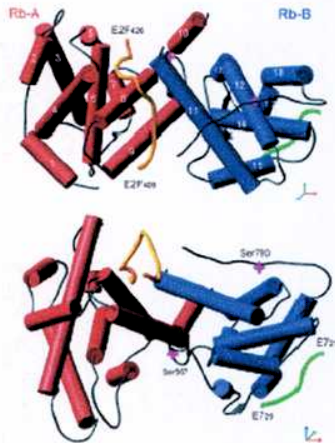


Fig 1.4

Estructura de pRb/E2F mostrada en dos vistas ortogonales bajo la representación de Ribbons. En rojo se muestra la hélice del Dm A y en azul la del Dm B de pRb. En amarillo se puede ver el trazo de la cadena principal de E2F y en verde la región de E7 HPV que interactúa con pRb²².

Para que se forme el complejo ADN/E2F/pRb es indispensable la presencia del dominio C.

La región NH₂ terminal de pRb (aminoácidos 1-378) contiene 6 sitios consenso para fosforilación por medio de cdk, las cuales cumplen un rol fundamental en la regulación normal de pRb. Sin embargo experimentos de mutagénesis dirigida demostraron que esta región es importante pero no esencial para la funcionalidad de la proteína.

La proteína pRb juega un rol importante regulando el ciclo celular, la apoptosis y la diferenciación celular, todas estas actividades son pertinentes a su rol como supresor tumoral²².

LA ACTIVIDAD DE pRB Y SU REGULACIÓN:

La proteína pRb cumple una de sus funciones primordiales de regulación de la proliferación mediante el arresto del ciclo celular a través de su unión a E2F. E2F es un complejo de factores de transcripción que se une a promotores de genes involucrados en la síntesis de ADN y el crecimiento celular, tales como: c-myc, ciclina A y E, dihidrofolatoreductasa, timidin-kinasa, timidilato sintetasa, subunidad α ADN polimerasa²⁶. La inactivación de pRb se produce por una modificación conformacional que sufre por la fosforilación, llevada a cabo por los complejos cdk/ciclinas. La fosforilación de pRb en la etapa G1 se lleva a cabo específicamente por

cdk4/CycD1, la cual resulta en la liberación de E2F permitiendo la transcripción de genes necesarios para la fase S (Fig. 1.5).

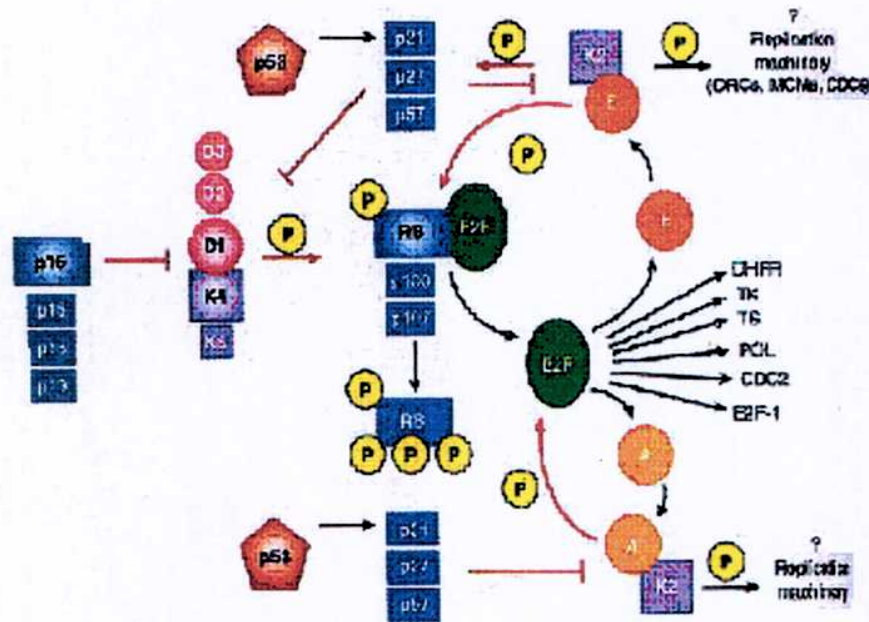


Fig. 1.5 Regulación de la fosforilación de pRb¹.

El mantenimiento de la fosforilación de pRb durante la progresión del ciclo celular está a cargo de cdk2/CycE. Fosfatasas específicas son las encargadas de desfosforilar a pRb durante la fase G2M del ciclo, luego de lo cual podrá unirse nuevamente a E2F y entrar a un nuevo ciclo.

Otro mecanismo empleado por pRb para reprimir la transcripción es la modificación de la conformación de la cromatina, actividad que la cumple reclutando proteínas remodeladoras de la cromatina, como las HDACs (desacetilasas de histonas). Es sabido que el acceso de factores de transcripción a sus sitios de unión al ADN es facilitado por la modificación de la cromatina mediada por las enzimas histona acetil transferasas (HAT), que producen la apertura o relajación de la unión histona-ADN mediante la acetilación de las histonas. Por el contrario, las HDACs inhiben la transcripción ya que desacetilan las histonas modificando nuevamente la estructura cromática. Se ha evidenciado que pRb se une simultáneamente a E2F y a HDAC, permitiendo la formación de complejos que se unirán a promotores génicos del ciclo celular (Fig.1.6).

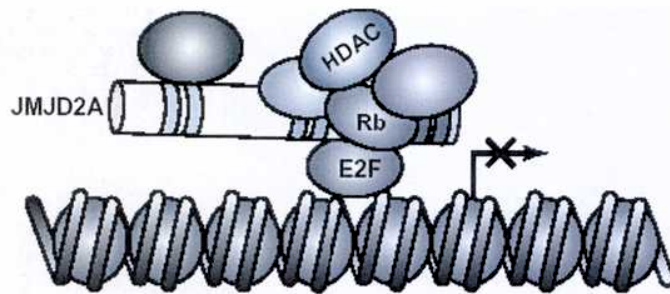


Fig. 1.6 Rb se une simultáneamente a E2F y a HDAC para inhibir la transcripción de determinados genes²⁷.

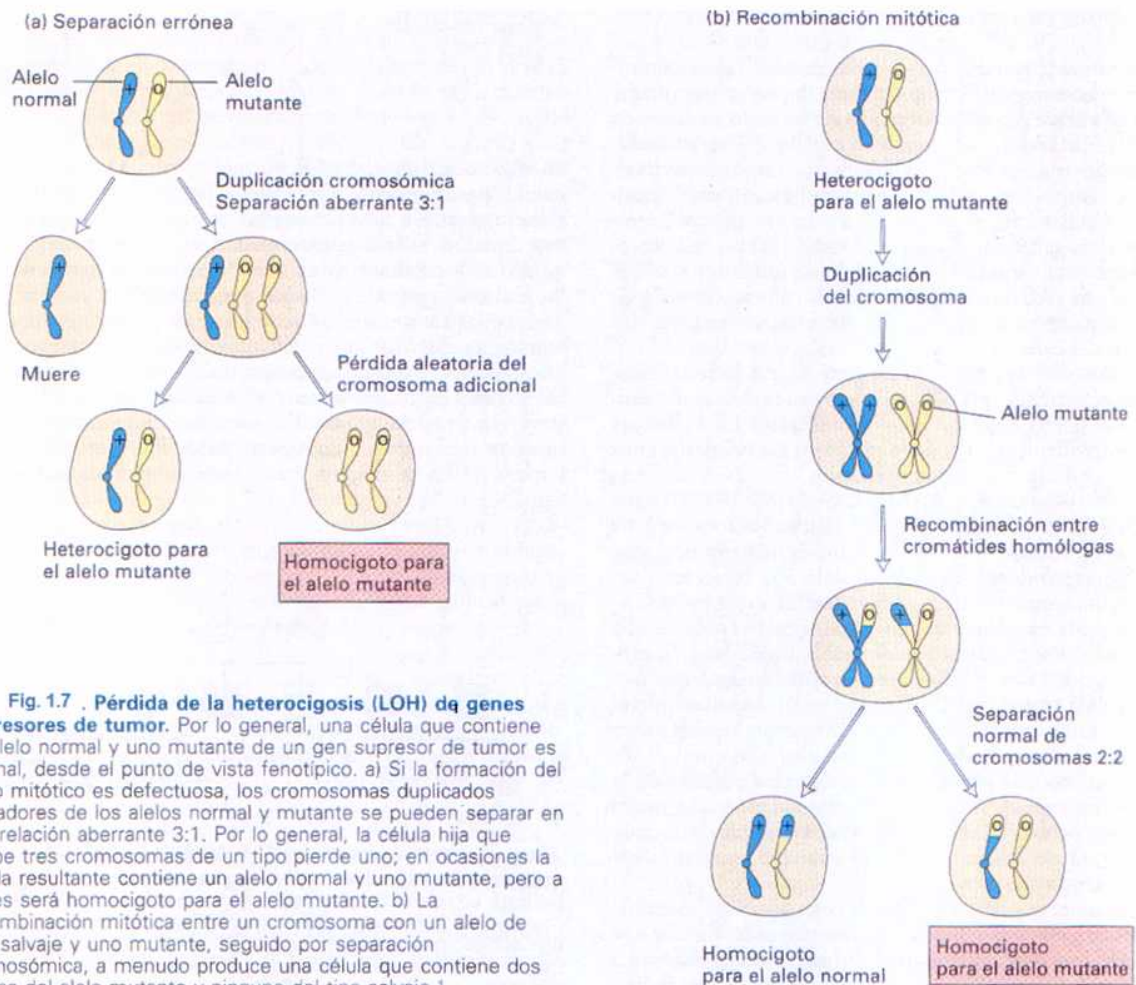
Es así como pRb silencia la expresión de determinados genes al reclutar una HDAC hacia E2F²⁷.

■ MECANISMO DE INACTIVACIÓN DE RB1

Para que se lleve a cabo el desarrollo tumoral es necesario que ambos alelos del gen Rb1 estén afectados por una mutación. Este mecanismo de inactivación de ambos alelos, se manifiesta como pérdida de heterocigicidad (LOH, lost of heterocygosis), fue descrito por Knudson como el mecanismo de los 2 golpes, y el concepto se extiende a todos los genes oncosupresores. La alteración genética de ambos alelos conlleva a la expresión de una pRb alterada o nula⁹.

Mecanismos que pueden producir LOH: Son poco probables las mutaciones puntuales, dado que cualquiera de ellas en un alelo normal se suelen reparar, salvo en las células con defectos en determinados sistemas de reparación de ADN.

Un mecanismo frecuente para LOH comprende la separación errónea de los cromosomas portadores de gen RB heterocigoto durante la mitosis. En este proceso también denominado no disyunción, una célula hija hereda sólo un cromosoma normal (y probablemente muere), mientras que la otra hereda 3. Es frecuente la posterior pérdida de un cromosoma, para restablecer el complemento 2n, si se pierde el cromosoma normal, la célula quedará con las dos copias Rb mutadas. Otro mecanismo es la recombinación mitótica entre una cromátide portadora del alelo Rb normal y otra con el alelo Rb mutado. El producto de esta recombinación son dos cromátides normales en una célula y en la otra dos mutadas (Fig 1.7).¹.



Este mecanismo de inactivación genética puede llegar a explicar las diferencias clínicas que se presentan en los pacientes con Rb hereditario y esporádico. En los casos hereditarios los pacientes desarrollan múltiples focos tumorales en uno o ambos ojos y la patología se presenta en forma mucho más temprana, en el período neonatal o dentro del año de vida. Esto se debe a que el individuo porta una mutación en todos los retinoblastos y solo una mutación inactivante en el alelo normal remanente va a ser suficiente para el desarrollo tumoral. Por esta razón el Rb hereditario está usualmente asociado a Rb multifocal bilateral. En los casos de Rb esporádico se puede observar que comúnmente desarrollan un foco tumoral aislado en un ojo (Rb unifocal unilateral) en estadios más tardíos, entre los 2-3 años de edad, ya que la probabilidad de que se den dos mutaciones inactivantes en el mismo locus es muy baja²⁸.

Un mecanismo alternativo para el desarrollo tumoral fue descrito por Orjuela et al, en donde la proteína E7 del HPV juega un rol importante en el Rb esporádico. La presencia de ADN de subtipos de alto riesgo de HPV en tejido tumoral de niños con Rb, sugiere que la oncogénesis en retinoblastoma puede ocurrir en parte como resultado de la inactivación de pRB mediada por E7. Esto coincide con el hecho de que están considerablemente solapados los factores de riesgo epidemiológicos para la infección con HPV y el desarrollo de Rb²⁴.



PREDISPOSICIÓN Y TRANSMISIÓN DE RETINOBLASTOMA

Se sabe que la predisposición al Rb es causada por una mutación en el locus RB1 (13q14), y se transmite como una enfermedad autosómica dominante con una penetrancia del 90%²⁵. Pocos pacientes son mosaicos, aproximadamente el 10 % de los portadores de mutaciones germinales.

Considerando la herencia mendeliana, esta patología se clasificó como autosómica dominante, sin embargo se sabe que el desarrollo tumoral requiere de dos mutaciones en RB1, por lo que se dice que el mecanismo molecular de inactivación es recesivo.

En la forma hereditaria, sólo el 25 % de los casos presenta historia familiar (Rb hereditario transmitido), el 75 % restante se debe a mutaciones nuevas en la línea germinal o durante la gestación que serán heredadas por el afectado (hereditario de Novo).

En el caso en que la mutación en RB1 se encuentre presente en la línea germinal del individuo, ésta será capaz de ser transmitida a la descendencia con una probabilidad de 0.5. Si la mutación fue adquirida, es importante diferenciar si se produjo en un retinoblasto, en la embriogénesis temprana del individuo o en la gameta que le dio origen. En caso de que la mutación se haya producido en la embriogénesis temprana, estaremos en presencia de un mosaico, y la presencia de la mutación en el tejido germinal del paciente dependerá del momento en que dicha mutación haya ocurrido con respecto a la separación de las líneas de tejidos. En los casos no hereditarios,

ambas mutaciones se encuentran presentes sólo en el tejido tumoral, por lo que la mutación no será transmisible²⁹.

MUTACIONES DEL GEN RB1

Se ha encontrado toda clase funcional de mutaciones a lo largo del gen y no tienen localización preferencial dentro del mismo²⁹. Pueden aparecer como grandes rearrreglos (20% de los casos) o como mutaciones pequeñas (80% de los casos) incluyendo sustituciones, deleciones e inserciones³⁰. Las sustituciones de una base abarcan aproximadamente el 64 % y están comprendidas por mutaciones sin sentido (75%), cambios en los sitios de splicing (15%) y cambios de sentido (10%). Las mutaciones que involucran más de una base se distribuyen entre 26 % de pequeñas deleciones y 10 % de pequeñas inserciones. Se ha descrito también inactivación del gen RB1 por metilación de la isla CpG en la región 5' ²¹.

La diferente penetrancia de la patología parece sustentarse en los distintos tipos de mutaciones que pueden afectar al gen Rb1. Las mutaciones que afectan la función de la pRb pero que mantienen su síntesis y estructura general producen cuadros clínicos más benignos. Estas mutaciones serían principalmente alteraciones en el promotor y de cambio de sentido, o pequeñas inserciones o deleciones que mantienen el marco de lectura y no generan codones stop; denominadas “alelo débiles”. El fenotipo asociado se presentaría como tumores unilaterales unifocales de baja penetrancia³¹⁻³²⁻³³.

OBJETIVOS



Teniendo en cuenta que la proteína de retinoblastoma es un punto fundamental en la regulación del ciclo celular, y que se halla relacionada directamente con el desarrollo oncológico, es de sumo interés estudiar cuáles son las alteraciones moleculares que afectan su función.

El objetivo del presente estudio fue identificar las anormalidades genéticas del gen supresor tumoral Rb1 en la población en estudio, compuesta por afectados de retinoblastoma esporádico y familiar, con distintas características clínicas, y determinar una posible correlación genotipo/fenotipo.

El estudio comprendió la detección de distintas mutaciones del gen RB1, la identificación del cromosoma afectado y la determinación de su herencia parental, así como el análisis de mecanismos cromosómicos acontecidos en el material tumoral.

■ En la primer etapa del trabajo se empleó un sistema de diagnóstico indirecto por medio de la técnica de segregación de alelos polimórficos intragénicos con el objetivo de:

1. Identificar el cromosoma mutado en el afectado.
2. Rastrearlo dentro de la familia pudiendo excluir a parientes en riesgo.
3. Determinar el mecanismo cromosómico mediante el cuál se perdió el cromosoma sano en el material tumoral.

■ En la segunda etapa se utilizaron técnicas moleculares para efectuar el diagnóstico directo con el objetivo de:

1. Detectar e identificar las mutaciones en el gen RB1, en pacientes con distintas características clínicas.

2. Predecir el efecto funcional que tendría cada una de las mutaciones sobre la proteína sintetizada, analizando la estructura secundaria y terciaria por medio del programa Visual Molecular Dynamics.
3. Rastrear la mutación presente en el paciente, en sus progenitores, con el objetivo de detectar la mutación en portadores asintomáticos y determinar si ésta fue transmitida por alguno de ellos o se trató de una mutación de novo.
4. Relacionar las distintas mutaciones encontradas con las formas clínicas de cada uno de los tumores. Establecer una correlación genotipo-fenotipo.



■ PACIENTES: se analizaron 11 familias Argentinas con Rb unilateral o bilateral, con presentación clínica diferente. Se clasificaron de acuerdo a la edad de presentación del tumor en Rb hereditario y Rb no hereditario.

Los departamentos de genética, oftalmología y oncología de diversos Hospitales pediátricos de Argentina derivaron a los pacientes. El diagnóstico se estableció mediante los criterios oftalmológicos e histopatológicos.

■ MUESTRAS DE ADN: el ADN constitucional se purificó de leucocitos de sangre periférica anticoagulada con EDTA 0.5%, utilizando el método CTAB. El ADN tumoral se purificó de las muestras remitidas en tacos de parafina del tumor por medio de la técnica de proteinasa K. Para verificar la integridad del ADN purificado se efectuó electroforesis en geles de agarosa 1%, con visualización con bromuro de etidio. La concentración y pureza se determinaron por densidad óptica.

● ADN constitucional – Técnica de CTAB

1. Tomar 4 ml de sangre congelada (1 vol) y colocarla en un tubo de 10 ml.
2. Hacer 3 lavados con 1 vol. de EDTA 10mM-Tris 10mM cada uno, homogeneizando suavemente durante 10 minutos. Centrifugar 10 min y descartar el sobrenadante.
3. Resuspender el sedimento en 1 vol de CTAB 2% (CINa 1.4 M, EDTA 20 Mm, Tris 100mM, β mercaptoetanol 0.2%, CTAB 2%) e incubar 1 hora a 60°C (mezclar cada 15 min).
4. Efectuar una extracción con 1 vol de IAC saturado con H₂O (cloroformo:alcohol isoamílico, 24:1),homogeneizando suavemente por 5 min y centrifugar 5 min.
5. Recuperar el sobrenadante (fase acuosa) trasvasándolo a un tubo limpio. Repetir el paso 4.
6. Precipitar la fase acuosa con 2 vol de etanol frío o 1 vol de isopropanol.

7. Si es visible el floculo de ADN se recupera con un tip y se lo coloca en un eppendorff, de lo contrario dejar 1-2 hs a -20°C y centrifugar en frío durante 10 min.
8. Secar en estufa a 37°C aproximadamente 30 min y resuspender en 500 μl de H_2O estéril.

● ADN tumoral – Técnica de proteinaza K

1. Tomar 2-3 cortes del material en parafina.
2. Agregar 1 ml de xileno, mezclar a temperatura ambiente durante 30 min.
3. Centrifugar 3-5 min a velocidad máxima, remover el xileno con pipeta pasteur y repetir los pasos 2 y 3.
4. Agregar 0.5 ml de etanol 100%, mezclar por inversión 5-10 min y centrifugar 5 min a máxima velocidad.
5. Remover el etanol, repetir los pasos 4 y 5. Secar la muestra a 37°C por 30 min.
6. Agregar 100 μl de buffer de digestión (50 mM Tris pH 8.5, 1mM EDTA, 0.5% Tween 20, 200 $\mu\text{g/ml}$ Proteinaza K) e incubar toda la noche a 37°C .
7. Calentar a 95°C por 10 min para inactivar la proteinaza K.
8. Agregar 1 vol de IAC (cloroformo:alcohol isoamílico, 24:1, saturado con H_2O), homogeneizar y centrifugar a velocidad máxima 3 min.
9. Recuperar la fase superior tratando de no tocar la interfase, repetir el paso 8.
10. Se precipita el ADN agregando 0.1 vol de acetato de sodio 3N y 3 vol de etanol 100%. Centrifugar en frío 30 min, descartar el sobrenadante, secar en estufa a 37°C y resuspender en 20 μl de H_2O estéril.

 ANÁLISIS DE SEGREGACIÓN DE ALELOS POLIMÓRFICOS: se efectuó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se estudiaron dos RFLPs, un STR y un VNTR que mapean en la zona 5', central y 3' del gen respectivamente:

- BamHI: sitio de restricción en el intrón 1 (g2300 A>G)³⁴
- Rbi4: repetición de la secuencia TG en el intrón 4 (g 43218)³⁵
- XbaI: sitio de restricción en el intrón 17 (g 99426 T>C)³⁶
- RB1.20: repetición de la secuencia CTTT en el intrón 20³⁷.

Estos polimorfismos están altamente ligados con las mutaciones presentes en el gen de Rb (fracción de recombinación <0.025).

Cada una de las regiones polimórficas en estudio fue amplificada utilizando los primers descritos en la bibliografía, que flanqueaban la zona en estudio (tabla 2.1).

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, según un protocolo básico conteniendo: 100 ng de ADN genómico, 20 nmoles de cada dNTP, 1.5mM de MgCl₂, 1u de Taq polimerasa (Imbioway), 25 pmoles de cada uno de los primers (Invytrogen), condiciones standard buffer (acorde a lo recomendado por el protocolo de la enzima).

Ciclado térmico (ciclador Minicycler TM, MJ Research)

1. Desnaturalización a 94°C, 3min.
 2. Desnaturalización a 94°C, 1 min.
 3. Annealing a 50-60°C, 1min.
 4. Extensión a 72°C, 2 min.
 5. Extensión a 72°C, 5 min.
- 35 ciclos

Tabla 2.1. Secuencia de primers, longitud de los fragmentos de amplificación y condiciones del ciclado:

Polimorfismo	Primer	T° anneal	Agregado	Alelos	Fragmento
Bam HI	F 5'CAGGACAGCGGCCCGGAG3' R 5'CTGCAGACGCTCCGCCGT3'	60°	DMSO 10% Gelatina 0.01%	2	180 pb
Rbi4	F 5'TTGTTTCACATTGAGTAGAA3' R 5'AATAAGCTACCAGATATGAA3'	52°	-----	?	150-200 pb
XbaI	F 5'TTCCAATGAAGAACAAATGG3' R 5'GCAATTGCACAATCCAAGTT3'	50	Gelatina 0.01%	2	945 pb
RB1.20	F 5'AAGTAAGAAAATCAAGCACTT3' R 5'AATAACAAGGTGTGGTGGT3'	60°	-----	12	250-300 pb

● **Los polimorfismos BamHI y XbaI** originados por la sustitución de una única base en cada sitio de restricción, generan dos variantes alélicas, que se ponen de manifiesto mediante la digestión con BamHI y XbaI respectivamente. En el polimorfismo BamHI, luego de la digestión enzimática se identifica el alelo 1 de 180pb (A) y el alelo 2 (B) generado por dos fragmentos uno de 60 y otro de 120 pb. En el polimorfismo XbaI, luego del tratamiento enzimático se puede obtener el alelo 1 de 945pb (A) y el alelo 2 (B) generado por dos fragmentos uno de 315 y el otro de 630pb.

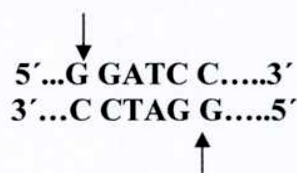
Para la identificación de estos alelos polimórficos se emplea la técnica PCR-RFLP:

- Amplificación de las dos zonas polimórficas para las enzimas de restricción por PCR.
- Verificación de la amplificación por electroforesis en geles de agarosa 2%, con visualización por bromuro de etidio.
- Digestión de los fragmentos de amplificación con la enzima de restricción correspondiente.

Protocolo de digestión del producto de PCR con la enzima BamHI

REACTIVOS	POOL (1x)
Producto de PCR	10 µl
Buffer 3 (10X)	1.3 µl
BSA (10X, 1ng/ml)	1.3 µl
BamHI (Promega 10U/µl)	1 µl

Incubar 2 hs a 37°C



Protocolo de digestión del producto de PCR con la enzima XbaI

REACTIVOS	POOL (1x)
Producto de PCR	10 µl
Buffer 2 (10X)	1.3 µl
BSA (10X, 1µg/ml)	1.3 µl
XbaI (BioLabs 10U/µl)	1 µl

Incubar 2 hs a 37°C



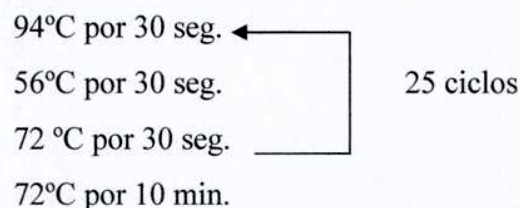
- Resolución de los fragmentos de digestión e identificación de cada alelo por electroforesis en geles de agarosa 2%, con visualización por bromuro de etidio.

Polimorfismo Rbi4 se estudia mediante al técnica PCR - STRs:

- Amplificación del polimorfismo de repetición TG por PCR caliente, utilizando marcación radiactiva con $^{32}\gamma\text{P}$ en uno de los primers. Protocolo de marcación:

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer 10X T4	1x
Primer Foward	20 pmoles
T4PNK (Life Technologies)	5 U
$^{32}\gamma\text{ATP}$ 10 μCi / μl	5 μl
H ₂ O	Csp 4 μl
Incubar 30 min a 37°C	Y 2 min a 94°C

Ciclado a utilizar: 94°C por 4 min.



- Verificación de la amplificación y separación de los alelos polimórficos por electroforesis en un sistema vertical en gel de poliacrilamida 6%, desnaturalizante con urea 7% y visualización por autoradiografía.

Polimorfismo RBL20 se estudia de la siguiente manera:

- Amplificación del polimorfismo de repetición CTTT por PCR.
- Chequeo de la amplificación por electroforesis en geles de agarosa 2%, con visualización por bromuro de etidio.
- Digestión de los productos de PCR con enzima de restricción para disminuir su peso molecular.

Protocolo de digestión del producto de PCR con la enzima BSTNI

REACTIVOS	POOL (1x)
Producto de PCR	10 μl
Buffer (10X)	1.3 μl
BSA (10X, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1.3 μl
BstNII (BioLabs 10U/ μl)	1 μl

Incubar 2 hs a 60°C

➤ Separación de los alelos polimórficos por electroforesis en geles de poliacrilamida 19:1 al 10% con agregado de glicerol 5%. Se utilizó una cuba de electroforesis vertical y las bandas de ADN se visualizaron por tinción de nitrato de plata.

➤ Procedimiento Tinción con AgNO_3

1. Se desmontan los vidrios y se sumerge el gel durante 6 min en 250 ml de solución fijadora (etanol 10%, AcH 0.5%). Descartar esta solución y agregar otros 250 ml durante 6 min.
2. Se descarta la solución fijadora y sin lavar se sumerge el gel en 500 ml de solución tintora de AgNO_3 0.2% durante 20 min.
3. Descartar y realizar 2 lavados con agua destilada. Se agrega 500 ml de solución reveladora (NaOH 1.5 %, formaldehído 0.4%) hasta visualización de las bandas.
4. Descartar la solución y lavar con abundante agua bidestilada.

IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES PEQUEÑAS:

La región promotora del gen, los 27 exones y la zona de poliadenilación se amplificaron por PCR utilizando los primers descritos por Lohmann et al (1994), incluyendo la región intrónica flanqueante.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN FINAL
ADN	100-200 ng
Buffer 10X	1X
MgCl_2	1.5 mM
dNTPs	20 Nmol de c/u
Primer Forward (Life Technologies)	5 pmoles
Primer Reverse (Life Technologies)	5 pmoles
Taq Polimerasa (Life Technologies)	1U
H_2O	Csp 25 μl
Aceite mineral	100 μl

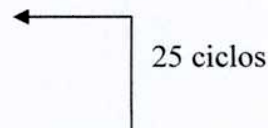
Ciclado a utilizar: Desnaturalización 94°C, 4 min.

Desnaturalización 94°C, 30 seg.

Annealing 52-62°C, 30 seg.

Extensión 72 °C, 30 seg.

Extensión 72°C, 10 min.



Se verificó la amplificación por electroforesis en geles de agarosa 2% con visualización por bromuro de etidio. Luego se efectuó el screening por medio de la técnica heteroduplex y los fragmentos que mostraron movilidad electroforética distinta se analizaron por secuenciación.

- **Técnica de Heteroduplex**

Los fragmentos de PCR se incubaron durante 1 min a 95°C y se permitió la renaturalización lenta hasta 40°C. Las muestras se corren en geles de acril-bisacrilamida (29:1) 9% y 10%, con glicerol 3% y urea 1.16M y se revelan con tinción de nitrato de plata. Este gel ligeramente desnaturalizante parece mejorar la detección de cambios conformacionales producidas por un mismatch de una única base, aumentando la migración diferencial de las bandas heteroduplex.

- **Secuenciación:**

Los productos de PCR se purificaron, para eliminar los dNTPs y primers sin reaccionar, por medio de las columnas de ultrafiltración de Concert™ (Life-Tecnologies) y se efectuó la secuenciación automática. Para ello los productos de PCR purificados fueron enviados para su secuenciación a MacroGen y al Servicio de Secuenciación y Genotipado USFCEyN. Los cromatogramas fueron luego analizados con el programa Chromas 2.3.

RESULTADOS



ETAPA 1. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN EL GEN RB1

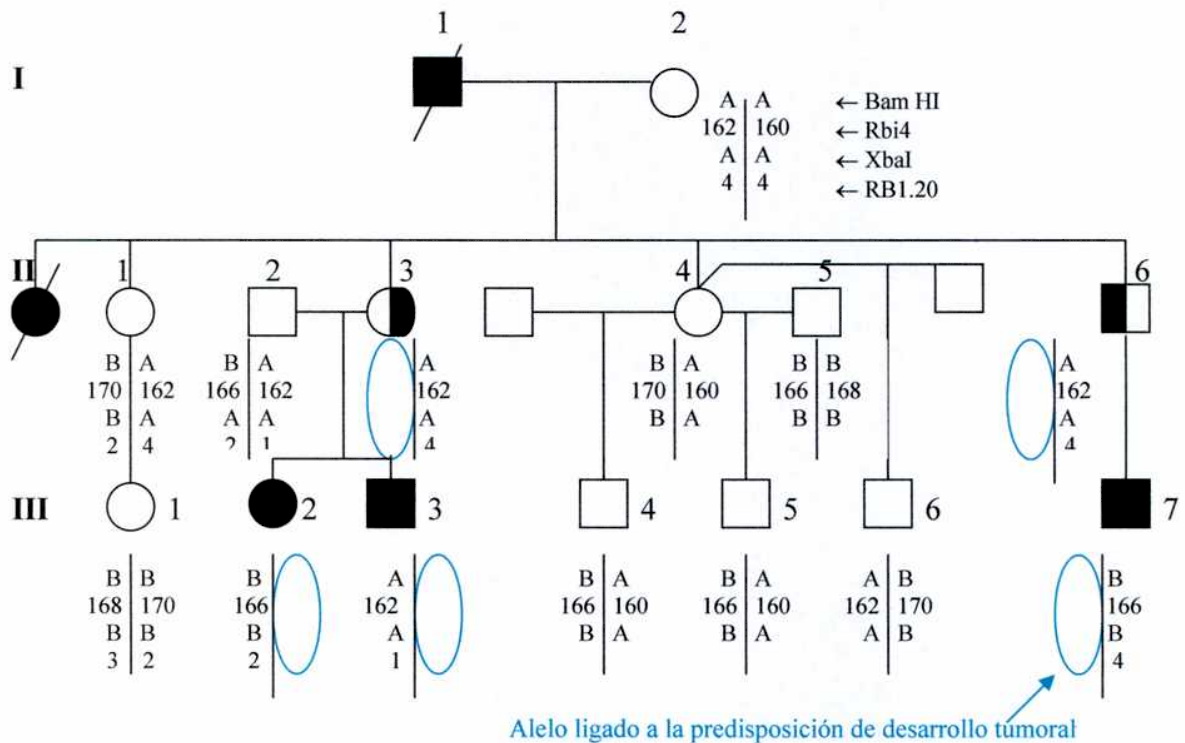
El estudio del gen RB1 mediante polimorfismos intragénicos se realizó con el objetivo principal de ligar uno de los cromosomas homólogos del afectado con la mutación. Una vez identificado, fue posible brindar información para los familiares del afectado (hermanos, hijos) acerca del riesgo de desarrollar la enfermedad. Se determinó el origen parental del cromosoma ligado a la mutación y fue rastreado dentro de la familia, determinando el riesgo o predisposición a la patología en otros parientes.

Cada uno de los polimorfismos fue analizado para el individuo afectado y su familia, así como para las muestras tumorales disponibles. Se realizó la segregación de alelos intrafamiliar y en una etapa posterior se conformaron los haplotipos familiares teniendo en cuenta la segregación conjunta de los alelos para los cuatro loci analizados, considerando que por su cercanía dentro del gen se heredan en bloque en el cromosoma. De esta manera fue posible determinar en cada individuo afectado, cual era la herencia parental de cada alelo.

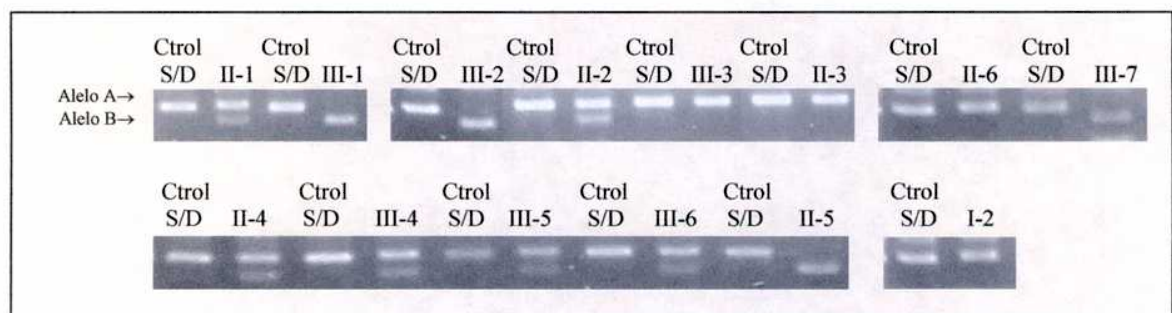
Casos de RB Familiar o Hereditario Transmitido:

 Familia 1 (Pacientes 336, 337 y 385), dos hermanos, III-2 y III-3, y el primo III-7 están afectados con retinoblastoma. III-2 fue diagnosticada a los 30 meses de edad presentando tumor unilateral y requirió enucleación del ojo derecho. El diagnóstico de III-3 se efectuó mas tempranamente, al mes de vida, por lo que solo requirió tratamiento quimioterápico y radioterápico. El tratamiento permitió el arresto tumoral, hasta la fecha permanece estable (3 años de edad). III-7 fue sometido a enucleación de ambos ojos luego de ser diagnosticado con RB bilateral al año de edad. El abuelo I-1 falleció a los 29 años y la tía II-1 falleció a los 6 años de edad, ambos por una enfermedad oftalmológica de origen desconocido. Se compararon los

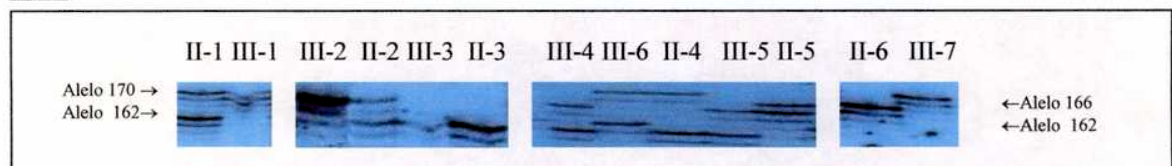
haplotipos compartidos por los afectados dentro de la familia, con el fin de ligar algún alelo en particular con la predisposición de desarrollo tumoral (Fig.2.1)



Bam HI



Rbi4



XbaI

RB1.20

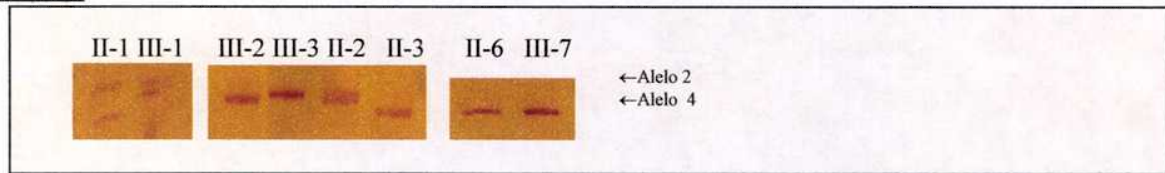


Fig. 2.1 Genealogía y Haplotipos de la Flia 1. En la genealogía se comparan los haplotipos compartidos por los afectados y se liga un haplotipo a la mutación predisponente a la patología. En cada recuadro se muestra el polimorfismo estudiado y las fotos de los geles mostrando los resultados obtenidos, así como los alelos presentes.

Tras efectuar el análisis de los haplotipos se evidenció una gran delección que comprendería por lo menos los 4 loci estudiados (desde el intrón 1 hasta el 20) en 5 miembros de la familia. Dicha mutación, que probablemente abarcaría el gen entero, sería la responsable de la predisposición a desarrollar la patología.

Los polimorfismos intragénicos resultaron, en este caso, una herramienta útil para la detección de grandes delecciones.

Se pudo excluir a dos hermanas de ser portadoras de dicha mutación (II-1 y II-4), por lo tanto se excluyó también a sus hijos. De esta manera se colaboró con el asesoramiento genético de la familia.

La correlación genotipo/fenotipo en esta familia demostró una muy baja penetrancia de RB ya que había dos individuos portadores de la mutación sin retinoblastoma. A su vez, el hecho de encontrar dos individuos con tumor unilateral, nos indica que existe una baja expresividad de Rb.

La baja penetrancia y expresividad de RB tendrían la siguiente explicación según una hipótesis desarrollada por DiCiommo D et al ³⁸: una delección que abarca todo el gen RB1 podría incluir otros genes vecinos, vitales para la célula, los cuales al inactivarse harían no viable a las células. Este hecho podría tener un efecto negativo sobre la cantidad de tumores desarrollados, disminuyendo la expresividad y penetrancia de RB.

✍ Familia 2, (Pacientes 112 y 400), La madre II-2 y su hija III-2 estaban afectadas con retinoblastoma. II-2 fue diagnosticada a los 11 meses de edad presentando tumor unilateral en ojo izquierdo que requirió enucleación. En la vida adulta se registraron las siguientes

neoplasias secundarias: melanoma, osteosarcoma y sarcoma pulmonar. III-2 presentaba Rb trilateral, se diagnosticó a los 4 meses de edad con Rb bilateral y a los 2 años de edad desarrolló un tumor en la glándula pineal. Falleció estando bajo tratamiento quimioterápico a los 4 años de edad. Se compararon los haplotipos compartidos por los afectados dentro de la familia, con el fin de ligar algún alelo en particular con la predisposición de desarrollo tumoral (Fig.2.2)

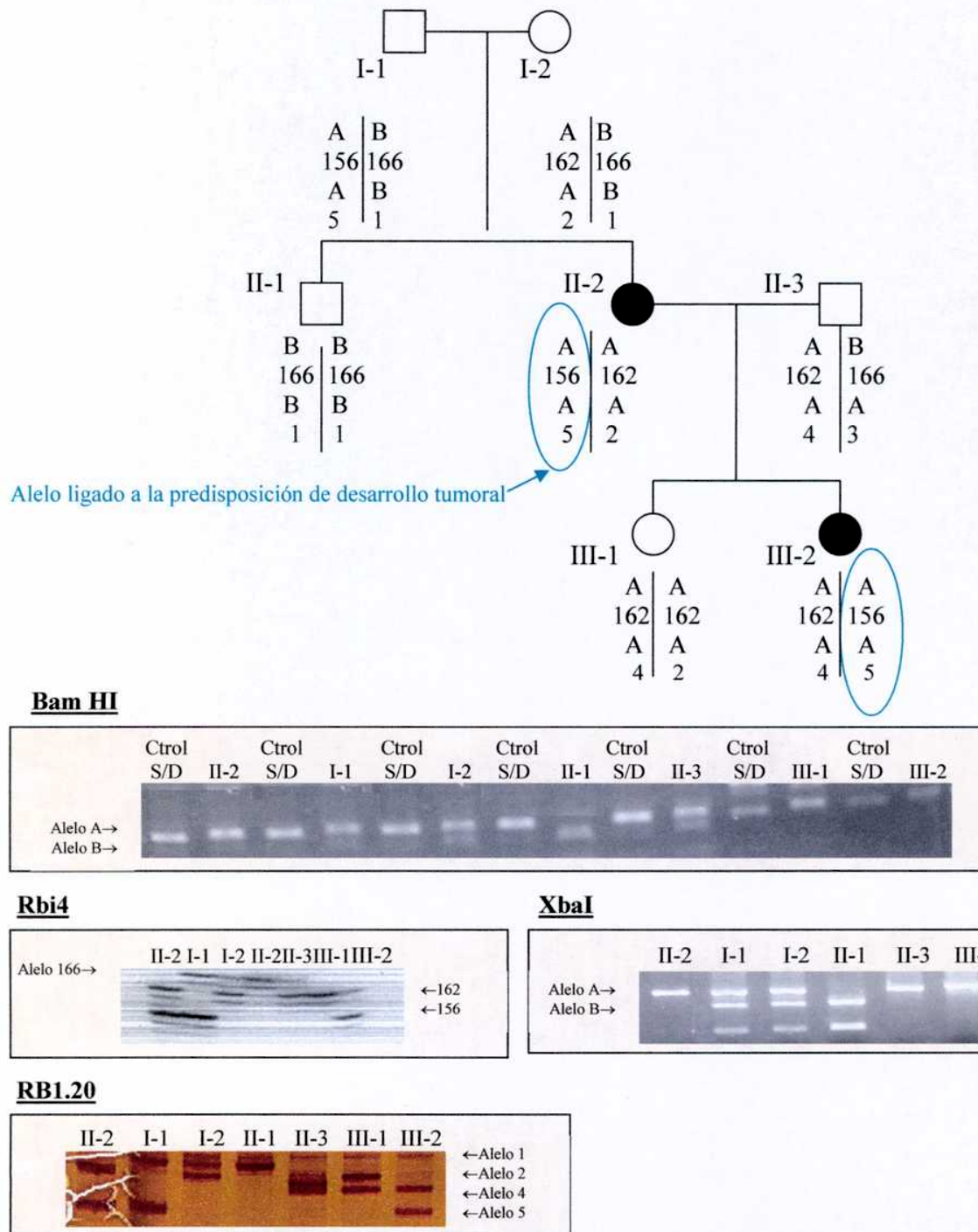


Fig. 2.2 Genealogía y Haplotipos de la Flia 2. En la genealogía se comparan los haplotipos compartidos por los afectados y se liga un haplotipo a la mutación predisponente a la patología. En cada recuadro se muestra el polimorfismo estudiado y las fotos de los geles mostrando los resultados obtenidos, así como los alelos presentes.

Se pudo ligar el alelo polimórfico con la predisposición al desarrollo tumoral en esta familia, lo cual permitió analizar a los parientes de las afectadas y determinar su exclusión (II-1 y III-1).

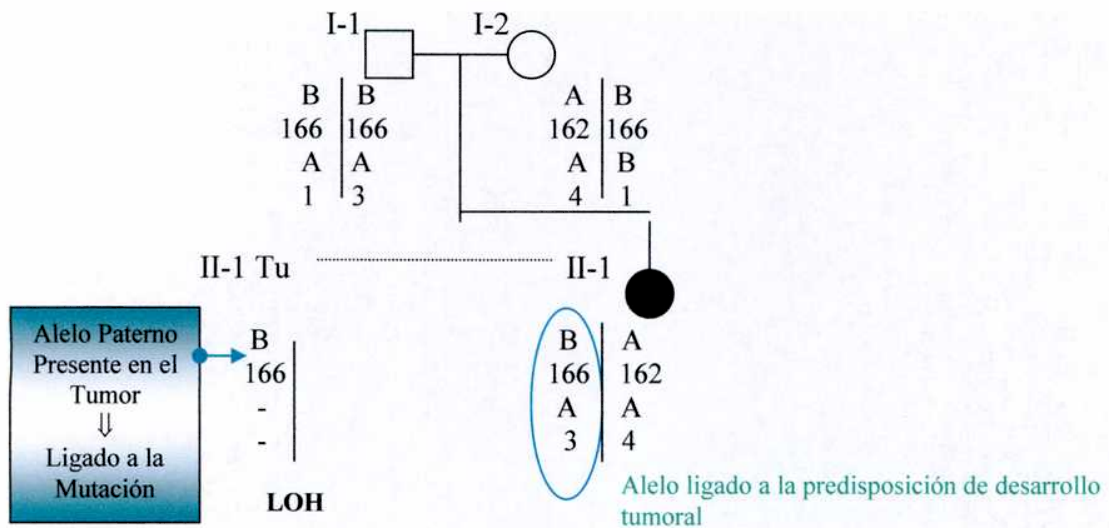
● **Casos de RB Hereditario de Novo:**

En los casos hereditarios de novo (30%), se considera que la primera mutación en el gen RB1 se produce en la línea germinal o en la embriogénesis temprana del individuo y se cuenta con un solo afectado en la familia. En estos casos, el cromosoma que lleva el alelo mutado sólo puede ser identificado por el análisis de segregación de alelos polimórficos cuando se encuentra disponible el material tumoral. Esto se debe a que, al igual que todo gen supresor tumoral, la inactivación del gen RB1 requiere mutaciones en ambos alelos. La primera mutación es heredada, la segunda es adquirida y en el 70% de los tumores involucra la pérdida parcial o total del alelo normal. En estos casos comparando el genotipo constitucional del paciente y el genotipo tumoral, es posible observar que las células tumorales resulten hemicigotas para uno o varios locus polimórfico en estudio.

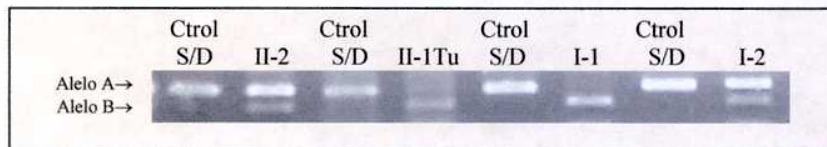
En los casos en los que no se cuenta con material tumoral, el estudio de polimorfismos permite poner en evidencia deleciones constitucionales y realizar estudios familiares para exclusión.

✍ **Familia 3,(Paciente 401),** La paciente II-1 fue diagnosticada a los 4 meses de edad con Rb unilateral requiriendo enucleación del ojo derecho a los 16 meses. No había antecedentes de retinoblastoma en la familia.

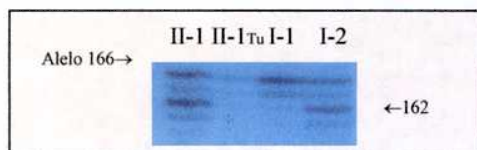
Se observó pérdida de heterocigosidad en el tumor, por lo que pudo determinarse la herencia parental del alelo afectado. El alelo ligado a la predisposición de desarrollo tumoral resultó de herencia paterna (Fig. 2.3).



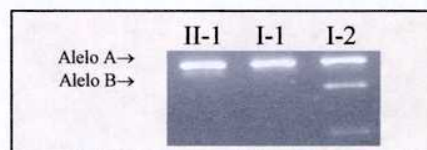
Bam HI



Rbi4



XbaI



RB1.20

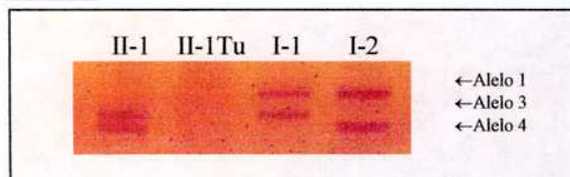
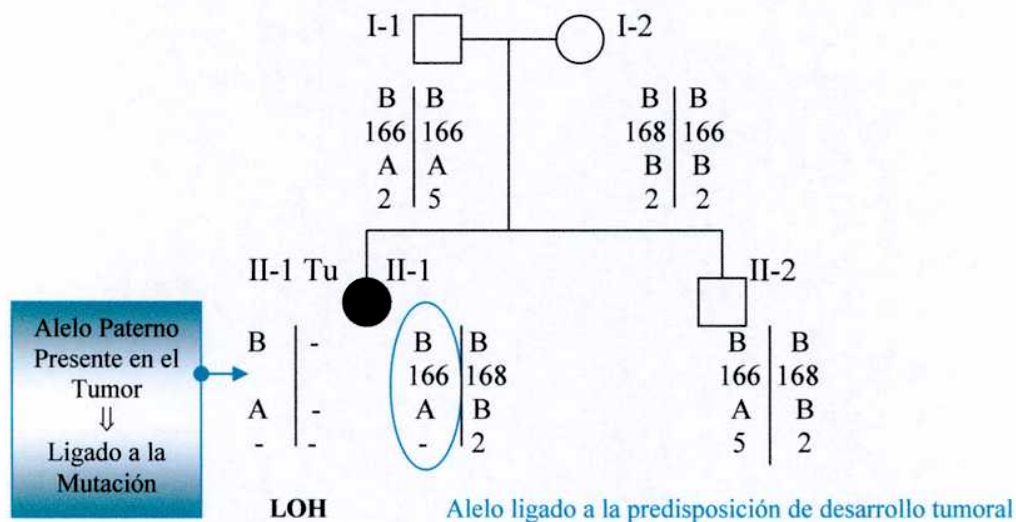


Fig. 2.3 Genealogía y Haplotipos de la Flia 3. Se observa LOH en el tumor, por lo que puede establecerse la herencia parental del alelo mutado. En cada recuadro se muestra el polimorfismo estudiado y las fotos de los geles mostrando los resultados obtenidos, así como los alelos presentes.

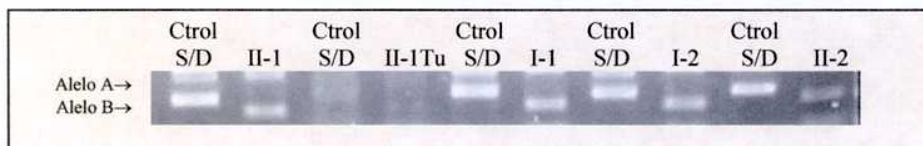
Se observó LOH en todos los polimorfismos analizados, por lo que se deduce que el alelo normal se perdió en el tumor por no disyunción cromosómica, con o sin duplicación del cromosoma mutado presente en el tumor.

➤ Familia 4 (Paciente 404). La paciente II-1 fue diagnosticada al mes de vida con Rb bilateral. No había antecedentes de retinoblastoma en la familia.

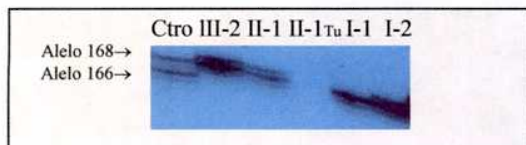
Se observó pérdida de heterocigosidad en el tumor, por lo que pudo determinarse la herencia parental del alelo afectado. El alelo ligado a la predisposición de desarrollo tumoral resultó de herencia paterna (Fig. 2.4).



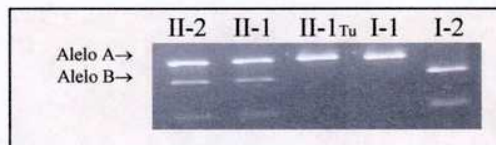
Bam HI



Rbi4



XbaI



RB1.20

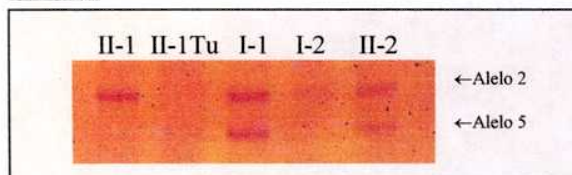


Fig. 2.4 Genealogía y Haplotipos de la Flia 4. Se observa LOH en el tumor, por lo que puede establecerse la herencia parental del alelo mutado. En cada recuadro se muestra el polimorfismo estudiado y las fotos de los geles mostrando los resultados obtenidos, así como los alelos presentes. Tras el estudio de la segregación de alelos polimórficos se puso de manifiesto una gran delección que abarca desde el E18 hasta por lo menos el E27.

El estudio de los polimorfismos Bam HI, Xba I y RB1.20 se había realizado previamente en la paciente y sus padres por V. Dalamon et al ⁹. La familia volvió a ser estudiada mediante

polimorfismos, incluyendo Rb14, debido al nacimiento del hermano de la paciente. Los resultados del segundo estudio confirmaron los precedentes: 1) Se observó pérdida de heterocigosidad en el tumor, por lo que se determinó la herencia paterna del alelo ligado a la predisposición de desarrollo tumoral. Se observó LOH en todos los polimorfismos analizados, por lo que se deduce que el alelo normal se perdió en el tumor por no disyunción cromosómica, con o sin duplicación del cromosoma mutado presente en el tumor. 2) En este caso el estudio de polimorfismos permitió evidenciar una delección constitucional, el análisis de RB1.20 mostró nuevamente un alelo en ADN constitucional y la ausencia de ambos alelos en ADN tumoral. A su vez el análisis de XbaI mostró dos alelos en ADN constitucional y 1 alelo en ADN tumoral. Para confirmar la delección en el extremo terminal a 3' de XbaI V. Dalamon et al ⁹ efectuaron la amplificación por PCR de los exones 14, 15/16, 17, 18, 19, 20, 24 y 27 de ADN tumoral. El análisis de los mismos demostró ausencia de los exones 18, 19, 20, 24 y 27 y presencia de los exones 14, 15/16 y 17, por lo que llegaron a la conclusión de que existe una delección que abarca desde el exón 18 hasta por lo menos el exón 27.

Analizando las variantes polimórficas recibidas por el hermano de la afectada fue posible excluirlo del riesgo de portar el alelo ligado a la mutación por ser heterocigota para el polimorfismo RB1.20.

● **Casos de RB NO Hereditario:**

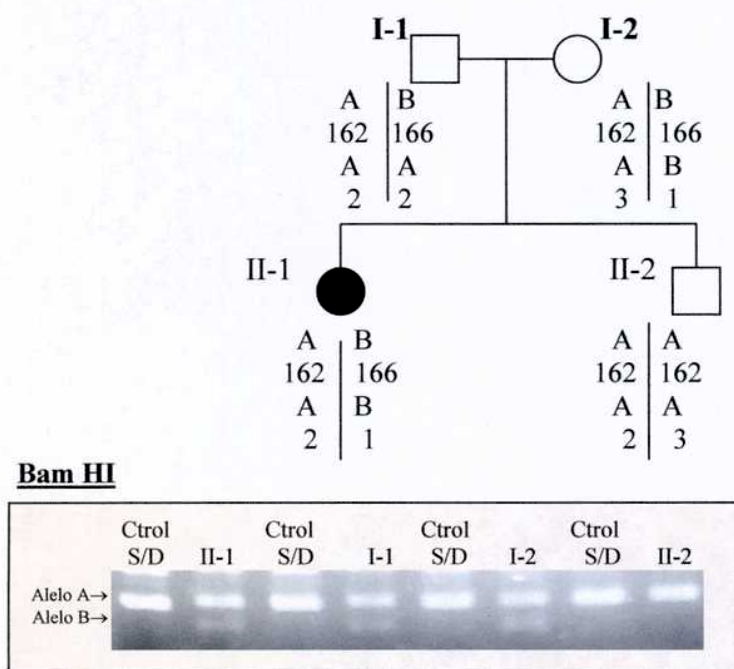
En estos casos la presentación del tumor fue unilateral y de aparición tardía, luego del año de vida. Puede suponerse que los demás miembros de la familia no se encontrarían en riesgo de desarrollar el tumor ya que ambas mutaciones inactivantes del gen RB1 se producirían en forma adquirida en una célula somática, el retinoblasto. Es importante tener en cuenta que la forma de determinar si un caso aislado de retinoblastoma es no hereditario, se basa en las características clínicas, tales como la aparición tardía del tumor, presencia de una masa tumoral única y la falta

de antecedentes en la familia. Sólo la localización de la primera mutación en el gen RB1 en células tumorales y en ningún otro linaje celular confirmaría ese diagnóstico.

Se sabe que el 30% de los casos esporádicos son en realidad casos hereditarios de baja penetrancia subdiagnosticados, es decir que la mutación en un alelo de RB1 se pudo generar en la línea germinal de alguno de los padres o en la embriogénesis temprana del individuo afectado. Es por ello que, a pesar de ser clasificados clínicamente como no hereditarios, se realizó el análisis de segregación de alelos polimórficos en las familias de afectados con Rb unilateral-unifocal de aparición tardía.

➤ Familia 5, (Paciente 405), La paciente II-1 fue diagnosticada a los 2 años de edad con retinoblastoma unilateral, unifocal en ojo izquierdo sin requerir enucleación. Recibió tratamiento quimioterápico y radioterapia, y como consecuencia del mismo presentó desprendimiento de retina y cataratas en ojo izquierdo.

En el análisis directo de segregación de polimorfismos la paciente es heterocigotas para todas las regiones polimórficas estudiadas, con un alelo de cada uno de los padres. Por lo tanto, no hay alteraciones (grandes deleciones) en esos lugares (Fig 2.5).



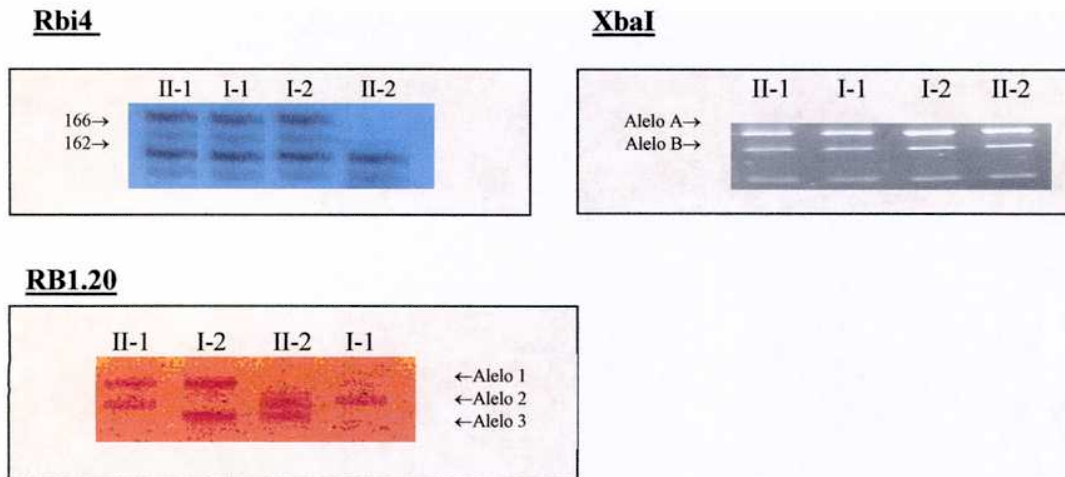


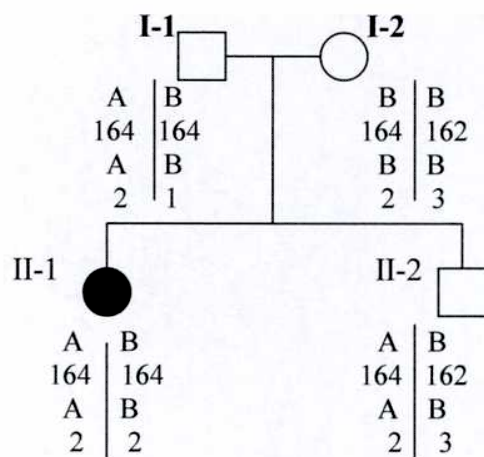
Fig. 2.5 Genealogía y Haplotipos de la Flia 5. En cada recuadro se muestra el polimorfismo estudiado y las fotos de los geles mostrando los resultados obtenidos, así como los alelos presentes.

Se establecieron los haplotipos en base a los alelos polimórficos, sin embargo, el análisis de haplotipos es informativo en los casos familiares con dos o más afectados de RB. En casos aislados como este no es informativo, la paciente y su hermano comparten el mismo alelo paterno, por lo que no puede ser excluido del riesgo de portar el alelo ligado a la mutación.

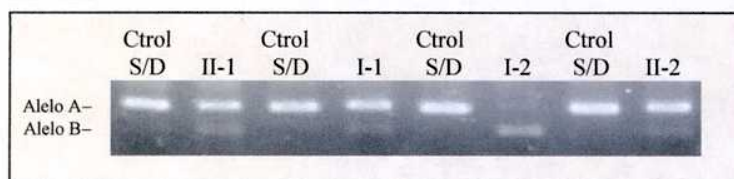
➤ Familia 6, (Paciente 409), La paciente II-1 fue diagnosticada a los 2 años y seis meses de edad con retinoblastoma unilateral, unifocal en ojo izquierdo requiriendo enucleación.

En la familia hay antecedentes de otras neoplasias: madre presentó cáncer de mama, abuela materna cáncer de colon y tío abuelo materno cáncer de estomago.

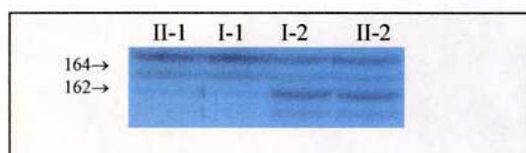
La paciente es heterocigotas para las regiones polimórficas de los intrones 1 y 17, con un alelo de cada uno de los padres. Por lo tanto, no hay alteraciones (grandes deleciones) en esos lugares (Fig. 2.6).



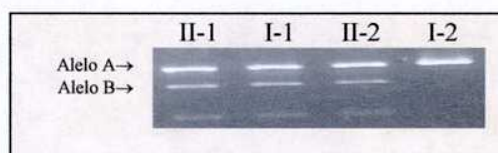
Bam HI



Rbi4



XbaI



RB1.20

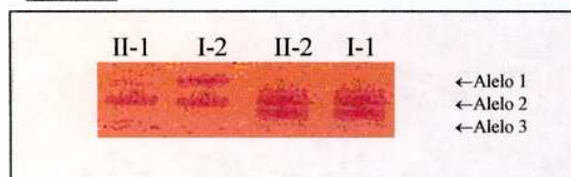


Fig. 2.6 Genealogía y Haplotipos de la Flia 6. En cada recuadro se muestra el polimorfismo estudiado y las fotos de los geles mostrando los resultados obtenidos, así como los alelos presentes.

Para las otras regiones polimórficas (intron, 4 e intron 20) no se puede distinguir la homocigosidad de la hemizogocidad, consecuentemente no es informativo.

Se establecieron los haplotipos en base a los alelos polimórficos y el análisis de haplotipos fué informativo en los casos familiares con dos o más afectados de RB. En casos aislados como este no fué informativo, la paciente y su hermano comparten el mismo alelo paterno, por lo que no puede ser excluido del riesgo de portar el alelo ligado a la mutación.



ETAPA 2, ESTUDIO DE MUTACIONES PEQUEÑAS EN EL GEN RB1

Esta etapa del estudio se centralizó en la búsqueda e identificación de pequeñas mutaciones en el gen RB1. En los casos en los que se pudo identificar la mutación predisponente para la patología, ésta fue rastreada en la familia del afectado, permitiendo excluir a hermanos e hijos del riesgo de desarrollar la patología, así como de transmitirla a su descendencia, con un 100% de certeza. Teniendo en cuenta la longitud del gen y la cantidad de fragmentos a analizar, se estableció un patrón de análisis en etapas:

1. Exones con codones de secuencia CGA en donde es muy común la desaminación de la 5-metilcitosina generando una transición C por T. Exones 8, 11, 14, 15, 17, 18, 19, 23, 25, 27.
2. Exones con repetición de pur-pir o que codifiquen para sitios de fosforilación. Exones 2, 3 y 4.
3. Exones correspondientes a zonas funcionales de la proteína. Exón 13 que codifica para el dominio A, exones 20 y 21 que codifican para el dominio B.
4. Se incluyeron todos los exones restantes hasta completar la longitud total del gen RB1.



Mutaciones Identificadas

Paciente 297, fue diagnosticado con Rb bilateral a los 8 meses de edad. No había antecedentes de la enfermedad en la familia. El análisis de Heteroduplex para el exón 4 mostró una movilidad electroforética alterada (Fig 3.1) por lo que se realizó la secuenciación del fragmento, evidenciándose la delección de una base, g.41966 del A (p.5141fsX152), con el consecuente corrimiento del marco de lectura y aparición de un codón stop prematuro (Fig 3.2). Esto llevaría a una finalización prematura de la traducción y una proteína más corta. Debido a que la región COOH-terminal de la proteína Rb es la responsable de formar el bolsillo de unión para factores de transcripción (principalmente E2F), la mutación identificada podría considerarse como responsable de la pérdida de funcionalidad de la proteína Rb.

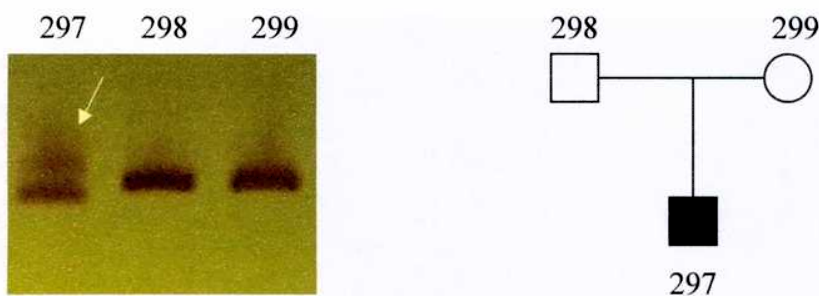


Fig. 3.1 Heteroduplex de E4
De los integrantes de la flia.

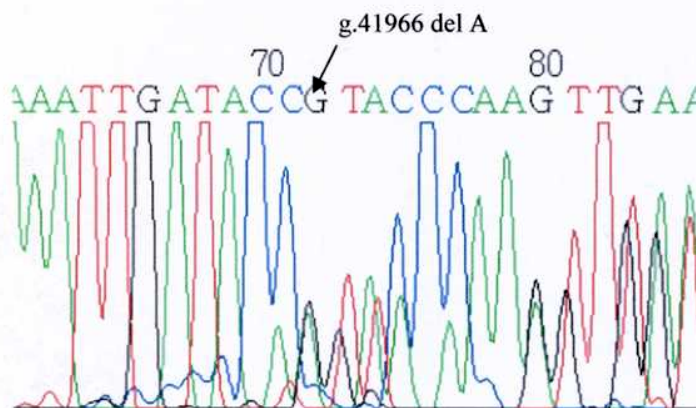


Fig. 3.2 Cromatograma del E4 del paciente 297 mostrando la mutación
g.41966 del A.

La identificación de la mutación en el ADN de sangre periférica del paciente confirmó el diagnóstico de retinoblastoma hereditario realizado sobre bases clínicas.

Se secuenció el exón 4 del gen RB1 de ambos padres, ambos clínicamente sanos, resultado normales. Esto hace pensar que la mutación fue de novo, y se generó en la línea germinal de alguno de los progenitores o durante la embriogénesis temprana del afectado.

➤ Paciente 316, fue diagnosticada con Rb bilateral al mes y medio de vida, requiriendo enucleación del ojo derecho y tratamiento con láser en ojo izquierdo. El padre de la paciente fue diagnosticado a los 3 años con Rb unilateral, unifocal. El análisis de Heteroduplex para el exón 4 de la paciente y su padre mostró una movilidad electroforética alterada (Fig 3.3) por lo que se realizó la secuenciación de los fragmentos, evidenciándose la delección de una base, g.42001 del G (p.L152fsX174), con el consecuente corrimiento del marco de lectura y aparición de un codón stop prematuro (Fig 3.4).

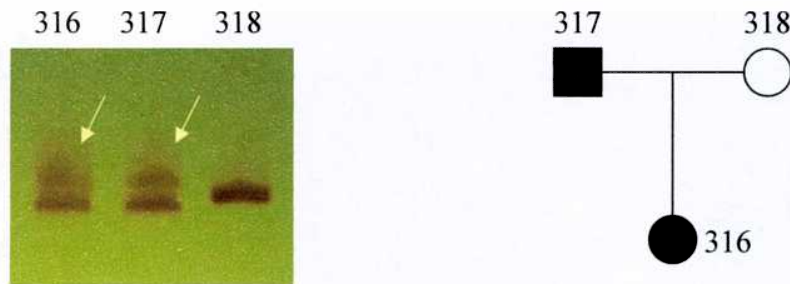


Fig. 3.3 Heteroduplex de E4 de los integrantes de la flia.

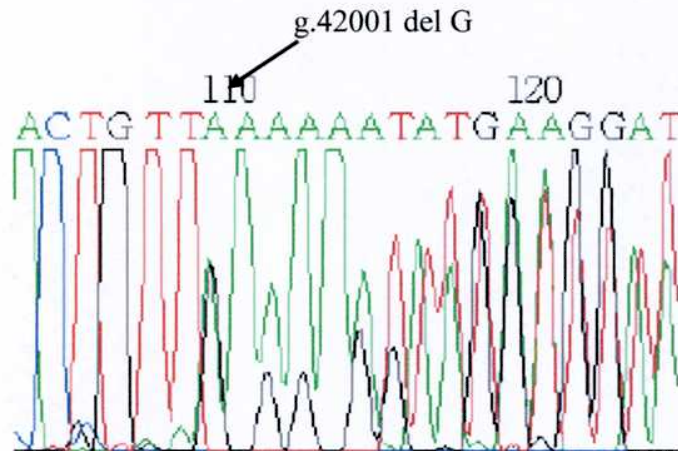


Fig. 3.4 Cromatograma del E4 de la pac 316 mostrando la mutación g.42001 del G.

Se identificó la causa molecular de la herencia transmitida del retinoblastoma en la familia. Esta modificación p.L152fsX174 en el exón 4 de los 27 del gen RB1, presumiblemente produciría una proteína truncada, que finalizaría su secuencia aminoacídica prematuramente, perdiendo por lo tanto las regiones funcionales de la proteína RB.

➤ Paciente 286, fue diagnosticada con Rb bilateral a los 5 meses de vida, requiriendo enucleación del ojo izquierdo y tratamiento con rayos en ojo derecho, pudiendo contenerse el foco. La madre de la paciente había sido diagnosticada a los 2 años de edad con Rb bilateral. El análisis de Heteroduplex para el exón 11 de la paciente y su madre mostró una movilidad electroforética alterada (Fig 3.5), se realizó la secuenciación del fragmento, evidenciándose la transición C por T, g.65386C>T (R358X), generando la alteración en la traducción del codón

CGA que codifica para arginina por un codón TGA, uno de los codones stop (Arg>Stop) (Fig 3.6).

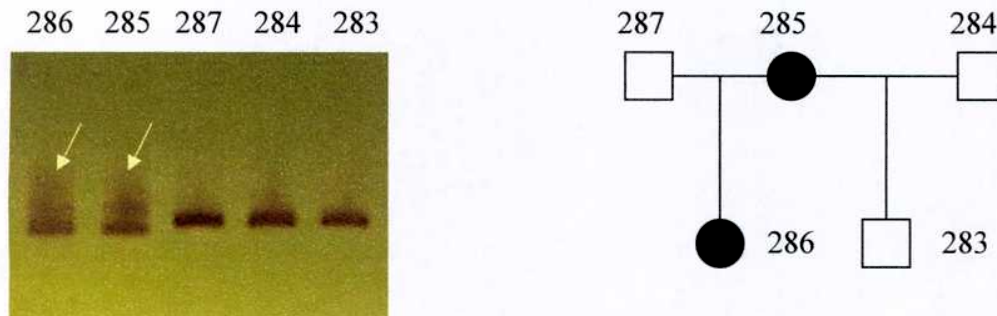


Fig. 3.5 Heteroduplex de E11 de los integrantes de la flia.

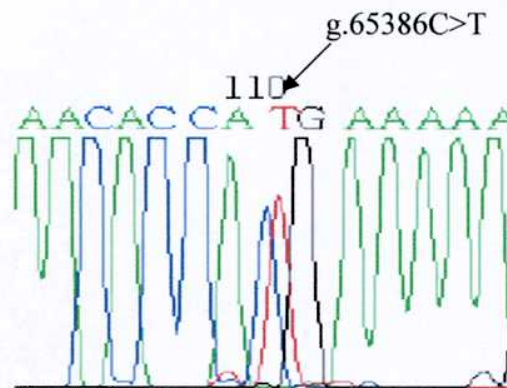


Fig. 3.6 Cromatograma del E11 de la pac 286 mostrando la mutación g.65386C>T.

Esta modificación R358X en el exón 11 llevaría a una finalización prematura de la traducción generando una proteína más corta, que ha perdido la región funcional. Es por ello que se la considera la mutación responsable para la predisposición a la patología.

Se secuenció el exón 11 del gen RB1 del medio hermano de la paciente, clínicamente sano, y no mostró ninguna alteración en la secuencia, por lo que se lo pudo excluir del riesgo de desarrollar la patología con un 100% de certeza.

➤ Paciente 375, fue diagnosticada con Rb bilateral a los 5 meses de vida, requiriendo enucleación del ojo izquierdo. El análisis de Heteroduplex para el exón 18 mostró una movilidad electroforética alterada (Fig 3.7), se realizó la secuenciación del fragmento, evidenciándose la

transición C por T, g.150037C>T (R579X), generando la alteración en la traducción del codón CGA>TGA (Arg>Stop)(Fig 3.8)

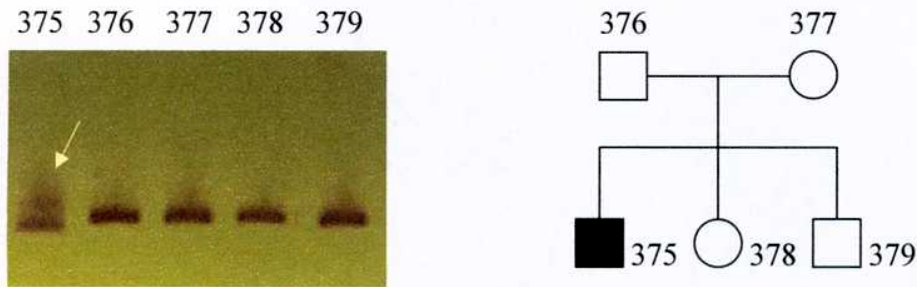


Fig. 3.7 Heteroduplex de E18 de los integrantes de la flia.

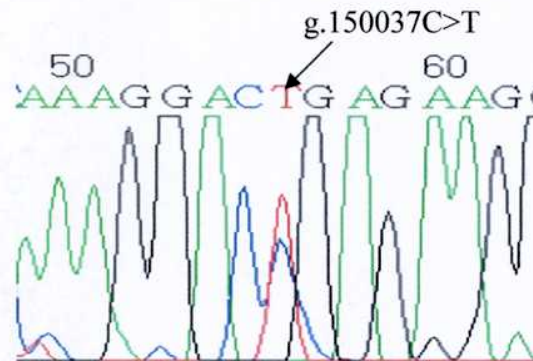


Fig. 3.8 Cromatograma del E18 del pac 375 mostrando la mutación g.150037C>T.

La mutación g.150037C>T en el exón 18, se localiza en la región media del gen RB1, que codifica para la zona del bolsillo AB grande de la proteína Rb. Esta mutación probablemente generaría una finalización prematura de la traducción, generando una proteína truncada en el aminoácido 579 y carente de las regiones funcionales. Es por ello que se considera dicha mutación como la responsable de la predisposición a desarrollar la patología.

Se secuenció el exón 18 del gen RB1 de ambos padres y hermanos, todos clínicamente sanos, resultando normales. Esto hace pensar que la mutación fue de novo, y se generó en la línea germinal de alguno de los progenitores o durante la embriogénesis temprana del afectado.

➤ Paciente 274, fue diagnosticado con Rb unilateral unifocal a los 9 meses de vida tras evidenciar leucocoria en el ojo izquierdo, requiriendo enucleación del ojo. El análisis de

Heteroduplex para el exón 24 mostró una movilidad electroforética alterada (Fig 3.9), se realizó la secuenciación del fragmento, evidenciándose la transición C por G en el intrón 23, g.170369C>G, generando un cambio en la base vecina a la secuencia consenso del sitio 3' del empalme en el preRNA_m (Fig 3.10).



Fig. 3.9 Heteroduplex de E24 de los integrantes de la flia.

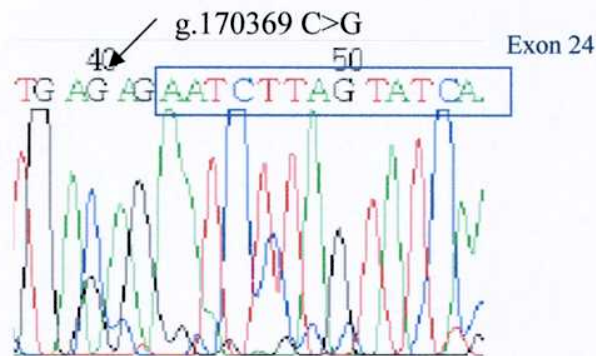


Fig. 3.10 Cromatograma del I23-E24 del pac 274 mostrando la posible mutación g.170369C>T.

La mutación g.170369 C>G en el intrón 23 podría generar una alteración en la proteína RB. A pesar de que las únicas bases casi invariables son GU (5') y AG (3') del intrón, las bases flanqueantes indicadas se encuentran con mucha mayor frecuencia que la esperada en una distribución aleatoria. Un cambio en esas bases podría producir alteraciones en el empalme de exones. Se muestra un ejemplo de la frecuencia de bases cercanas al sitio de empalme, extraído de una publicación (Fig. 3.11).

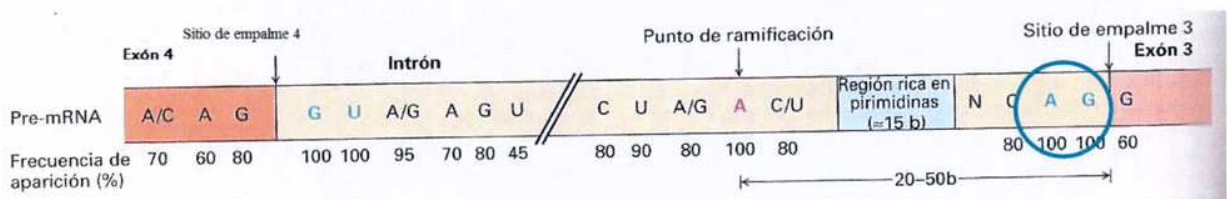


Fig. 3.11 Frecuencia de bases cercanas a la secuencia consenso del sitio 3' del empalme en el preRNA_m.¹



El empleo de técnicas de biología molecular en el estudio de enfermedades de origen genético, como el retinoblastoma, permite el diagnóstico precoz y un asesoramiento genético de mayor certeza para el afectado y su familia.

■ En la etapa I, la utilización de los 4 polimorfismos localizados en la región 5', central y 3' del gen RB1 brindó información apreciable acerca de las bases moleculares de la patología. Los polimorfismos elegidos resultaron ser una excelente herramienta para estudiar el gen RB1 en familias afectadas con retinoblastoma, de distinta presentación clínica. La combinación de la información obtenida por la metodología de segregación de alelos polimórficos, la conformación de haplotipos familiares y los datos clínicos de los pacientes, permitió:

- ***Establecer cual de los cromosomas estaba ligado a la predisposición de desarrollo tumoral en el paciente.***

Realizando los estudios clásicos de segregación de alelos y en base a los conceptos de ligamientos, se ligó la variante alélica con la mutación en el afectado. La identificación del cromosoma mutado en el afectado con componente hereditario (ya sea de novo o transmitido) resulta de extrema importancia para realizar el correcto asesoramiento genético de la familia. Es importante recordar que los descendientes de afectados de Rb son sometidos a revisiones oftalmológicas mensuales, bajo anestesia, sobre todo durante el primer año de vida, con el objeto de detectar en forma precoz la aparición de un foco tumoral. Al conocer cual es el cromosoma mutado, se lo puede rastrear en la descendencia, lo cual genera una mejor calidad del seguimiento clínico y disminuye la incertidumbre familiar.

- ***Excluir a parientes del afectado en edad de riesgo y definir el status de portador en individuos relacionados.***

Al haber determinado la variante alélica polimórfica ligada a la mutación en la familia, la misma pudo ser rastreada en otros individuos con relación consanguínea con el afectado. Fue posible excluir a 5 hermanos de los afectados de haber recibido el alelo ligado a la mutación con un alto grado de certeza. En una familia con un afectado de retinoblastoma la incertidumbre de aparición de nuevos casos en la familia es altísima, por lo que la implementación de este tipo de estudios moleculares es invaluable.

Determinar los mecanismos cromosómicos involucrados en la pérdida del alelo normal en el material tumoral.

En los dos casos en los que se contaba con el material tumoral (Paciente 401 y 404) se evidenció pérdida de heterocigosidad, por lo que se dedujo que el alelo normal se perdió en el tumor por no disyunción cromosómica, con o sin duplicación del cromosoma mutado presente en el tumor.

Identificar mutaciones constitucionales: evidenciar grandes deleciones.

En la familia 1 y 4 el estudio mediante polimorfismos intragénicos se volvió directo, evidenciando las mutaciones presentes en el ADN de leucocitos de sangre periférica de los afectados como grandes deleciones. Los grandes rearrreglos son mutaciones muy poco frecuentes en el gen RB1, comprendiendo no más del 20%³⁰.

La correlación genotipo/fenotipo en la familia 1 demostró una muy baja penetrancia de Rb. Una deleción que abarca todo el gen RB1 podría tener un efecto negativo sobre la cantidad de tumores desarrollados, disminuyendo la expresividad de Rb. Se ha hipotetizado que las grandes deleciones, especialmente aquellas que abarcan el extremo 3' de RB1, pueden extenderse a otros genes adyacentes que son importantes para la supervivencia celular³⁸. De esta manera, si la segunda mutación inactivante de RB1 (M2) es LOH, puede producir la pérdida de un gen esencial, causando la muerte celular en vez de la transformación tumoral de la célula. Por lo tanto se generarían menos tumores resultando en

una mayor frecuencia de Rb unilateral. El tumor se generaría sólo si M2 es una mutación distinta en RB1, dejando una copia intacta del gen esencial.

■ En la segunda etapa mediante la utilización de técnicas de biología molecular se realizó la búsqueda y el análisis de mutaciones presentes en el gen RB1. Se analizaron 10 individuos con retinoblastoma de distinta presentación clínica, en 5 de ellos se logró identificar alguna alteración en el gen RB1. El resto de los individuos siguen en estudio. Las mutaciones identificadas comprenden 2 deleciones de una base, 2 mutaciones sin sentido y una mutación que podría influir, con más probabilidad, en el empalme correcto de exones que ser un polimorfismo intrónico.

La técnica de PCR-Heteroduplex-Secuenciación, resultó efectiva en el rastreo de mutaciones sin lugar preferencial de ocurrencia (hot-spot) en toda la longitud del gen. Permitió detectar e identificar mutaciones germinales en pacientes con retinoblastoma y obtener la siguiente información:

● ***Sobre las mutaciones identificadas:***

Las 4 mutaciones exónicas identificadas y una intrónica, localizadas en los exones, 4, 11, 18 y el intrón 23, podrían ser las que predisponen para el desarrollo de la patología, ya que producirían alteraciones en la proteína generando una pérdida funcional.

Todas las mutaciones identificadas fueron rastreadas en los parientes de los afectados, obteniéndose los siguientes resultados:

En los dos casos de retinoblastoma familiar, se encontró la misma mutación en los padres de los afectados (el padre de la paciente 316 y la madre de la paciente 286).

En los dos casos de Rb bilateral, hereditario de novo, las mutaciones no fueron detectadas en sus padres, sustentando la teoría de que se produjeron en la línea germinal de algunos de ellos o en la gestación temprana del paciente.

Se pudo excluir a dos hermanos de un afectado de presentar la mutación en el gen RB1, y por lo tanto de su carácter de portadores.

Uno de los pacientes estudiados (317) había sido diagnosticado en la niñez con Rb unilateral, unifocal, no hereditario, de aparición tardía (3 años de edad). Su hija al mes y medio de vida fue diagnosticada con Rb bilateral por lo que se decidió estudiar a la familia. La presencia de la mutación en el ADN constitucional del individuo permitió establecer sin margen de error, el diagnóstico de Rb hereditario, con la consiguiente modificación del consejo genético para la familia.

La mutación g.170369 C>G, en el intrón 23 del gen estaba localizada en posición adyacente al sitio aceptor del empalme de exones, sugiriendo una alteración en este mecanismo que llevaría a una proteína no funcional. Sin embargo existe un 20% de probabilidad de que sea un polimorfismo lo cual no puede ser descartado sin la realización de experimentos de expresión.

Al comparar la presencia de mutaciones identificadas en esta población en estudio, con las publicadas en bases de datos internacionales, se encontró que: la mutación g.41966 del A en el exón 4 (pac 297) no había sido reportada previamente, así como tampoco la mutación g.42001 del G en el exón 4 (pac 316 y 317). Ambas mutaciones son nuevas. La mutación g.65386 C>T en el exón 11 fue reportada 21 veces y la g.150037 C>T en el exón 18 fue reportada 30 veces (Lohmann database).

El 62% de las mutaciones registradas en el gen RB1 son por sustitución de una base. El 70 % de estas son mutaciones sin sentido (nonsense mutations): C por T, generando la alteración en la traducción del codón CGA>TGA, o sea Arg>Stop.³⁹ El análisis de estos codones CGA confirman la presencia de 5-metilcitosina. La predisposición de esta base de sufrir la deaminación es la causa de que en estos sitios se de esta transición recurrente.

Esto refuerza la importancia de organizar la búsqueda de mutaciones de acuerdo a las secuencias contenidas en cada uno de los exones a analizar. En este estudio se realizó la

búsqueda de mutaciones por etapas, según el grado de probabilidad de mutación acorde a la secuencia del exón, lo cual resultó ser una forma efectiva para la optimización de tiempo y recursos.

● ***Sobre el efecto que causarían las mutaciones identificadas:***

Las mutaciones encontradas en el exón 4, exón 11 y exón 18 generarían proteínas truncadas en las posiciones codificadas por esos exones, que perdieron los dominios fundamentales para su actividad por lo que no serían funcionales (la localización de cada mutación se muestra en la fig 4.1, indicando la porción de la proteína codificada por cada uno de los exones). Por lo tanto, puede inferirse que las mutaciones descritas serían las responsables de la predisposición al desarrollo de Rb.

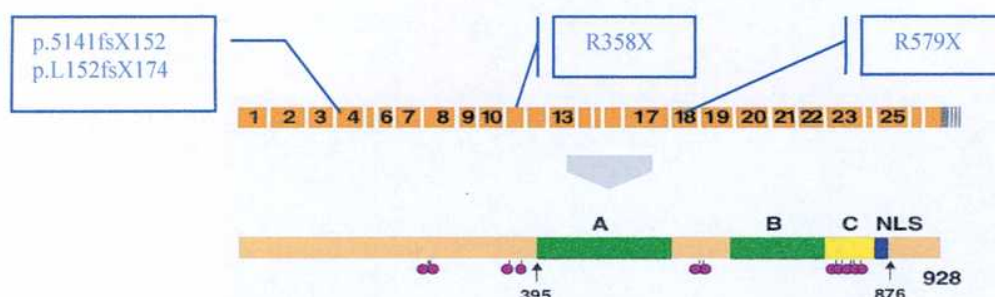


Fig. 4.1 Localización de cada mutación encontrada en el gen RB1.

● ***Relación genotipo-fenotipo:***

La mutación truncante en el exón 11 encontrada en la paciente 286 (R358X) fue también identificada en su madre afectada, 285, ambas con la misma presentación clínica, Rb bilateral. En ambos casos es consistente el tipo de mutación hallada con el efecto clínico producido y su alta penetrancia. La edad de aparición difiere, 286 fue diagnosticada a los 5 meses y 285 a los 2 años de edad. Esto estaría probablemente relacionado con un diagnóstico tardío efectuado en la madre por no tener antecedentes. De los 21 casos reportados en la base de datos de Lohmann, 13 son Rb bilateral germinal, 3 Rb unilateral germinal, 1 Rb bilateral somático y 4 Rb unilateral somático.

La mutación truncante en el exón 18 (R579) encontrada en el paciente 375 generó un tumor bilateral diagnosticado a los 5 meses de edad. De los 30 casos reportados en la

base de datos de Lohmann, 21 son Rb bilateral germinal, 2 Rb unilateral germinal y 7 Rb unilateral somático.

En estos casos es concordante el efecto truncante de la mutación germinal con la aparición de más de un foco tumoral.

La mutación g.42001 del G encontrada en el exón 4, demostró distinta presentación clínica dentro de la familia. La paciente 316 presentó Rb bilateral diagnosticado al mes de vida y su padre 317 había sido diagnosticado a los 3 años de edad con Rb unilateral, unifocal, no hereditario.

Es evidente que no es fácil establecer una relación entre la mutación identificada en el gen RB1 y el fenotipo desarrollado por el paciente. No fue posible establecer una correlación directa entre el tipo o localización de mutación presente y la forma o evolución del tumor.

Existen distintas hipótesis que explicarían la falta de relación genotipo-fenotipo:

1. La diferente edad a la cual se realiza el diagnóstico puede estar sesgada por la historia familiar o que la edad tardía de aparición se relacione con un desarrollo temprano de la enfermedad pero con una lenta progresión.
2. Que el paciente resulte un mosaico para la mutación identificada, por lo tanto la falta de proteína sería solo parcial, convirtiendo el efecto de la mutación en menos nocivo. Es decir que la menor expresividad fenotípica estaría reflejando la menor cantidad de células con la primera mutación que predispone a la patología³¹.
3. Pude ser que la segunda mutación (M2) sea distinta de la primera (M1), generando un alelo débil. Por ejemplo la hipermetilación de la región 5' reguladora del gen RB1 produciría una disminución de la expresión del gen que estaría estructuralmente normal pero aberrantemente metilado. Por el contrario, en los pacientes con alta penetrancia (múltiples focos tumorales y presentación

temprana) M2 podría incluir una recombinación mitótica o no disyunción, lo cual no dejaría proteína funcional.

4. Probablemente como ocurre en toda neoplasia otros factores además de la mutación genética estén involucrados para inducir la aparición temprana o tardía del tumor, como factores inmunológicos, factores ambientales y otros genes moduladores que interactúen en la iniciación y progresión del tumor.

En conclusión, la manifestación clínica de Rb no sólo depende de la naturaleza de la primer mutación, sino también de su desarrollo en el tiempo, el tipo de M2 que inactive el alelo restante y de otros mecanismos desconocidos involucrados en la forma de presentación y desarrollo de la enfermedad.

CONCLUSIÓN



En el presente trabajo se emplearon técnicas de biología molecular centrando la atención en el conocimiento básico y aplicado de las causas relacionadas con la aparición y desarrollo del retinoblastoma.

La metodología de segregación de alelos polimórficos resultó una herramienta útil mediante la cual fue posible identificar el alelo ligado a la predisposición de desarrollo tumoral, inferir la herencia parental del alelo mutado, realizar la exclusión de parientes del afectado en edad de riesgo e identificar mutaciones constitucionales como las grandes deleciones. Por otro lado permitió estudiar los mecanismos cromosómicos involucrados en la pérdida del alelo normal en el material tumoral.

El estudio de mutaciones pequeñas mediante el empleo de técnicas directas permitió la identificación de diversas mutaciones en el gen RB1, responsables de producir la patología y un polimorfismo intragénico. Este análisis en los pacientes permitió contribuir para establecer el patrón mutacional para nuestra población, conocimiento fundamental para predecir y localizar alteraciones en otros afectados.

Las técnicas de biología molecular para el análisis del gen RB1, conformaron un método diagnóstico preciso, sensible y aplicable al estudio de familias afectadas, tendiendo a la detección precoz y al estudio de portadores.

Estas técnicas cobran mayor importancia cuando se tiene en cuenta que la detección precoz y el diagnóstico molecular de las mutaciones de RB1 hechas a tiempo, permiten la instauración temprana de un tratamiento proporcionando al paciente menores riesgos, mejor pronóstico y calidad de vida. También es importante la exclusión del riesgo de portadores de niños que no portan la mutación, para evitar los exámenes oftalmológicos bajo anestesia, que deben realizarse como control en los familiares de los pacientes con retinoblastoma.

RESUMEN



El primer gen oncosupresor se identificó en pacientes con retinoblastoma hereditario. Las bases moleculares de las alteraciones en genes supresores de tumores provienen inicialmente de estudios epidemiológicos y genéticos del retinoblastoma (Rb), el tumor ocular maligno más frecuente en la niñez (1:20000). Las investigaciones realizadas sobre el gen del retinoblastoma (RB1) permitieron revelar que los mecanismos que afectan su función constituyen un fenómeno común en el desarrollo de muchas neoplasias.²

El diagnóstico temprano es fundamental para instaurar en forma precoz un tratamiento eficaz, lo cual permite aumentar significativamente la preservación de la visión y la sobrevida⁷.

En el Rb hereditario (40% casos) la primera mutación ocurre en la línea germinal y puede ser transmitida por el progenitor afectado (Rb hereditario transmitido, 10% casos) o adquirido durante la embriogénesis o en una célula germinal (Rb hereditario de Novo, 30% casos), por lo tanto todas las células del organismo portan esta mutación en el gen Rb1. La segunda mutación es somática en todos los casos (ocurre solamente en retinoblastos), esta presente solamente en el ADN tumoral. En la forma no hereditaria o esporádica (60% casos) ambas mutaciones del gen RB1 ocurren en un retinoblasto y por lo tanto están solamente presentes en el ADN tumoral⁹.

El Rb trilateral se presenta asociado a Rb unilateral o bilateral, de origen germinal, como un tumor neuroblastico intracraneal, con un porcentaje de 5 a 15 %¹⁰.

El objetivo del presente estudio fue identificar las anormalidades genéticas del gen supresor tumoral RB1 en la población en estudio, compuesta por afectados de retinoblastoma esporádico y familiar, con distintas características clínicas, y determinar una posible correlación genotipo/fenotipo.

En la primer etapa del trabajo se estudiaron 6 familias, empleando un sistema de diagnóstico indirecto por medio de la técnica de segregación de alelos polimórficos intragénicos y fue posible identificar el alelo ligado a la predisposición de desarrollo tumoral, inferir la

herencia parental del alelo mutado, realizar la exclusión de parientes del afectado en edad de riesgo e identificar mutaciones constitucionales como las grandes deleciones. Por otro lado permitió estudiar los mecanismos cromosómicos involucrados en la pérdida del alelo normal en el material tumoral.

En la segunda etapa mediante la utilización de la técnica de PCR-heteroduplex-secuenciación se analizaron 10 individuos con retinoblastoma de distinta presentación clínica, en 5 de ellos se logró identificar alguna alteración en el gen RB1. El resto de los individuos siguen en estudio. Las mutaciones identificadas comprendieron 2 deleciones de una base, 2 mutaciones sin sentido y una mutación que podría influir, con más probabilidad, en el empalme correcto de exones que ser un polimorfismo intrónico.

Este análisis en los pacientes permitió contribuir para establecer el patrón mutacional para nuestra población, conocimiento fundamental para predecir y localizar alteraciones en otros afectados.

Las técnicas de biología molecular para el análisis del gen RB1, conformaron un método diagnóstico preciso, sensible y aplicable al estudio de familias afectadas, tendiendo a la detección precoz y al estudio de portadores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaira, Baltimore, Darnell. "Biología Celular y Molecular". Capítulo 24, pag 1054-1084. 4ª edición, 2002.
2. Muller R, Young I. "Emery's, Genética Médica" Capítulo 13, pag 187-208. 10ª edición, 2001.
3. Donaldson S, Egbert P, Wen Wha L, "Retinoblastoma" Principles and Practice of Pediatric Oncology: 683-696, 1993
4. Perez C, Travezán R, Salem E, et al, "Delayed Diagnosis and Treatment in Retinoblastoma" Proc Am Soc Clin Oncol 13: 417, 1994.
5. Murphree AL, "Molecular genetics of Retinoblastoma" Ophthalmol. Clin. North Am. 8: 155-166, 1995.
6. Maat-Kieviet JA, Oepkes D, Hatwig NG, et al, "A large Retinoblastoma detected in a Fetus at 21 weeks of Gestation" Prenat Diagn. 13: 377-384, 1993.
7. Shields JA, Shields CL, "Treatment of Retinoblastoma with cryotherapy" Trans Pa Acad. Ophthalmol. Otolaryngol. 42: 977-980, 1990.
8. Murphree AL, Villablanca JG, Deegan WF, et al, "Chemotherapy plus local treatment in the management of intraocular retinoblastoma" Arch Ophthalmol. 114:1348-56, 1996.
9. Dalamon V, Surace E, Giliberto F, et al, "Detection of Germline Mutations in Argentine Retinoblastoma Patients: Low and Full Retinoblastoma Caused by the same Germline Truncating Mutation". Journal of Biochemistry & Molecular Biology 37: 246-253, 2004.
10. Paulino AC, "Trilateral retinoblastoma: is the location of the intracranial tumor important?" Cancer 86: 135-141, 1999.
11. Kivelä T, "Trilateral retinoblastoma: a meta-analysis of hereditary retinoblastoma associated with primary ectopic intracranial retinoblastoma". J Clin Oncol 17: 1829-37, 1999.
12. Gallie BL, "Retinoblastoma Gene Mutation in Human Cancer", NEJM vol 330: 786-789, 1994.
13. Gallie BL, Dunn JM, Chan HS, et al, "The genetics of retinoblastoma. Relevance to the patient". Pediatr Clin North Am 38: 299-315, 1991
14. Wong FL, Boice JD, Abramson DH, et al, "cancer incidence after retinoblastoma. Radiation dose and sarcoma risk", JAMA 278: 1262-1267, 1997.
15. Fletcher O, Easton D, Anderson K, et al, "Lifetime risks of common cancer among retinoblastoma survivors". J Natl Cancer Inst 96: 357-63, 2004.
16. Friend SH, Bernards R, Rogelj S. "A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma" Nature 323: 643-646, 1986.
17. Fung YKT, Murphree AL, Tang A et al. "Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene" Science 236: 1657-1661, 1987.
18. Hong F. D, et al, "Structure of the Human Retinoblastoma Gene". Proc Natl. Acad. Sci. USA, 86: 5502-5506, 1989.
19. Chen PL et al. "Cell" 58: 1193-1198, 1989.
20. De Caprio JA et al. "Cell" 58: 1085-1095, 1989.
21. Lohmann D, "RB1 gene mutation in Retinoblastoma. Mutation update". Hum Mut 14: 283-288, 1999.
22. Xiao Bing, Spencer J, Clements A, et al, "Crystal Structure of the Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein bound to E2F and the molecular basis of its regulation" PNAS vol 100, 5:2363-2368, 2003.
23. Weijun Pan, Sarah Cox, Ronald H, et al, "A cyclin D17cdk4 binding site within the C domain of the retinoblastoma protein". Cancer Research 61: 2885-2891, 2001.

24. Orjuela M, Ponce Castaneda V, Ridaura C, et al "Presence of Human Papiloma Virus in tumor tissue from children with Retinoblastoma: an alternative mechanism for tumor development". *Clin Canc Reserch* 6: 4010-1016, 2000.
25. Bremner R, Chan Du D, Connolly-Wilson, et al, "Deletion of RB exons 24 and 25 causes low-penetrance Retinoblastoma". *Am.J.Hum.Genet.* 61: 556-570, 1997.
26. Ross J. F, Liu X, Dynlacht B.D, "Mechanism of transcriptional repression of E2F by the retinoblastoma tumor suppressor protein" *Mol.Cell* 3:195-205, 1999.
27. Gray S.G, Iglesias A, Lizcano F, et al, "Function characterization of JMJD2A, a histone deacetylase and retinoblastoma-binding protein". *The Am Soc for Bioch and Mol Biol*, 5: 1-61, 2005.
28. Kato M. "Parental Origin of germ-line and somatic mutation in the retinoblastoma gene" *Hum. Genet.* 94: 31-38, 1994.
29. Richter S, Vandezande K, Chen N, et al, "Sensitive and efficient Detection of RB1 Gene Mutation Enhances Care for Families with Retinoblastoma". *Am J Hum. Genet.* 72: 253-269, 2003.
30. Dalamon V, Surace E, Borelina D, et al, "Detection of Mutations in Argentine Retinoblastoma Patients by Segregation of Polymorphisms, Exon Analysis and Cytogenetic Test". *Ophthalmic Research* 33: 336-339, 2001.
31. Herzog S. "Marked differences in unilateral isolated retinoblastoma from young and older children studied by comparative genomic hybridization" *Hum Gen Feb*, 108(2):98-104, 2001.
32. Harbour J. "Molecular basis of low-penetrance retinoblastoma" *Arch Ophthalmol.* 119: 1699-1704, 2001.
33. Alonso J. "Spectrum of germline Rb1 gene mutation in Spanish retinoblastoma patients: phenotypic and molecular epidemiological implications" *Human mutation* 17: 412-422, 2001.
34. Bookstein R, Lee W. "Molecular genetics of the retinoblastoma suppressor gene" *Crit. Rev. Oncogen.* 2: 211-227, 1990.
35. Toguchida J, McGee TL, Paterson JC, et al. "Complete genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene" *Genomics* 17: 535-543, 1993.
36. Mc Gee TL, Cowley GS, Yandell DW, Dryja TP. "Detection of the XbaI RFLP within the retinoblastoma susceptibility gene" *Gene.* Aug. 80:119-128, 1989.
37. Brandt B, Greger V, Yandell D, et al. " A simple and nonradiative meted for detecting the Rb1.20 DNA polymorphism in the retinoblastoma gene" *Am J Hum Genet.* 51(6):1450-1451, 1992.
38. DiCiommo D, Gallie BL, Bremner R. "Retinoblastoma: the disease, gene and protein provide critical leads to understand cancer" *Semin Cancer Biol* 10:255-269, 2000.
39. Lohmann D.R. "RB1 Gene Mutations in Retinoblastoma" *Human Mutation* 14:283-288, 1999.
40. Frédéric Chibon, Aline Mairal, Paul Fréneaux et.al. "The RB1 Gene Is Target of Chromosome 13 Deletions in Malignant Fibrous Histiocytoma". *Cancer Research* 60: 6339-45, 2000.

Los resultados de esta tesis fueron parcialmente publicados en el siguiente artículo:

“RB1 Germ-Line deletions in Argentine Retinoblastoma Patients”

C. Fernandez, K. Repetto, V. Dalamon, F. Bergonzi, V. Ferreiro and I. Szijan.

Mol Diag Ther 2007; 11 (1): 55-61.



(KARINA REPETTO)



(IRENE SZIJAN)