



CASA ABIERTA AL TIEMPO

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DETECCION DE MUTACIONES EN PACIENTES CON
RETINOBLASTOMA



COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A :

BIOL. MIGUEL MACIAS VEGA

DIRECTORA :

DRA. LORENA OROZCO

CO-DIRECTORA :

M EN C ARIADNA GONZALEZ

ASESORA :

DRA. ROCIO ORTIZ

México D.F.

Julio 29 -1998.

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

**// DETECCION DE MUTACIONES EN PACIENTES CON
RETINOBLASTOMA **

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A :

BIOL. MIGUEL MACIAS VEGA,

DIRECTORA :

DRA. LORENA OROZCO

CO-DIRECTORA :

M EN C ARIADNA GONZALEZ

ASESORA :

DRA. ROCIO ORTIZ

México D.F.

Julio 29 -1998.

26-VII-02

21/09/02

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, cuenta con apoyo del CONACYT (Registro No. 309-0), por considerársele un posgrado de excelencia.



COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

Mi reconocimiento al CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización de la maestría a través de la beca con número de registro 95359.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lorena Orozco por la enorme confianza y constante apoyo que siempre me ha brindado.

A las Dras. Rocio Ortiz y Ariadna Gonzalez por sus valiosas aportaciones durante el desarrollo de éste proyecto.

A la Universidad Autonoma Metropolitana por la oportunidad que me brindó para alcanzar un excelente nivel académico.

A todos los profesores de la Maestria en Biología Experimental, en especial a la Dra. Concepción Gutierrez.

Al CONACYT por el apoyo que me brindó durante el desarrollo de éste proyecto.

Al Biol. Manuel Moreno por su siempre entusiasta y valiosa participación.

Al Dr. Adrian Vivanco, Q.F.B. Francisco García, y Biol. Silvia Jiménez por su importante participación en el desarrollo experimental de ésta tesis.

A la Téc. Araceli Romero por su importante colaboración en el laboratorio de Biología Molecular.

A mis amigos M. en C. Yolanda Saldaña y Q.F.B. Ricardo Lee por su importante apoyo y por su valiosa amistad.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular en especial a Miguel A., y Ceci, por compartir con migo su experiencia en el manejo de la PC..

INDICE

	Pag.
Resumen	2
Introducción	
<i>Genes supresores</i>	4
<i>Retinoblastoma</i>	5
<i>Origen celular del retinoblastoma</i>	10
<i>Ley de Knudson</i>	11
<i>Pérdida de heterocigocidad</i>	12
<i>Mapeo del gen RB1</i>	15
<i>Genética molecular del gen RB1</i>	16
<i>Estructura de la fosfoproteína nuclear pRB110</i>	20
<i>Función de la pRB110 en el ciclo celular</i>	21
<i>Mutagénesis del gen RB1</i>	24
<i>Neoplasias asociadas al gen RB1</i>	25
<i>Estrategias para el estudio del retinoblastoma</i>	26
Justificación	33
Objetivo general	34
Objetivos particulares	34
Estrategia general	35
Diagrama de flujo	36
Material y métodos	37
<i>Metodología</i>	41
<i>Criterios de inclusión</i>	41
<i>Criterios de exclusión</i>	41
<i>Extracción de DNA de sangre periférica</i>	41
<i>Purificación del DNA</i>	41
<i>Cuantificación del DNA</i>	42
<i>Evaluación de la integridad del DNA</i>	43
<i>Síntesis de oligonucleótidos</i>	43
<i>Amplificación por PCR</i>	47
<i>Análisis del polimorfismo conformacional de cadena sencilla</i>	49
<i>Secuenciación por terminación de cadenas</i>	51
Resultados	
<i>Hallazgos clínicos</i>	54
<i>Neoplasias asociadas con RB</i>	54

<i>Población de estudio</i>	54
<i>Formación de un banco de DNA</i>	58
<i>Detección de mutaciones por PCR y SSCP</i>	58
<i>Patrones electroforeticos normales para los exones 3,4 y 5.</i>	62
<i>Patrones electroforeticos anormales en pacientes con RB</i>	62
<i>Secuenciación de las muestras RB272, RB351 y RB164</i>	80
<i>Discusion de resultados</i>	86
<i>Conclusiones</i>	91
<i>Bibliografia</i>	92

INDICE DE FIGURAS

	<i>Fig.</i>
<i>Fig. 1 RB bilateral</i>	<i>6</i>
<i>Fig. 2 RB unilateral</i>	<i>7</i>
<i>Fig. 3 Penetrancia</i>	<i>8</i>
<i>Fig. 4 Ley de Knudson</i>	<i>14</i>
<i>Fig. 5 Ubicación del gen RB1 en el cromosoma 13</i>	<i>18</i>
<i>Fig. 6 Gen del retinoblastoma</i>	<i>19</i>
<i>Fig. 7 Estructura de la proteína pRB110</i>	<i>22</i>
<i>Fig. 8 Función de la pRB110 en el ciclo celular</i>	<i>32</i>
<i>Fig. 9 Reacción en cadena de la polimerasa</i>	<i>30</i>
<i>Fig. 10 Detección de mutaciones por SSCP</i>	<i>31</i>
<i>Fig. 11 Secuenciación por terminación de cadenas</i>	<i>32</i>
<i>Fig. 12 Síntesis de oligonucleótidos</i>	<i>45</i>
<i>Fig. 13 Integridad del DNA</i>	<i>60</i>
<i>Fig. 14 Amplificación del exón 5</i>	<i>61</i>
<i>Fig. 15 Amplificación del exón 7</i>	<i>61</i>
<i>Fig. 16 Patrón normal de SSCP para el exón 3</i>	<i>64</i>
<i>Fig. 17 Patrón normal de SSCP para el exón 4</i>	<i>65</i>
<i>Fig. 18 Patrón normal de SSCP para el exón 5</i>	<i>66</i>
<i>Fig. 19 Caso RB272</i>	<i>69</i>
<i>Fig. 20 Caso RB351</i>	<i>70</i>
<i>Fig. 21 Casos RB175 RB267</i>	<i>71</i>
<i>Fig. 22 Casos RB289 y RB28</i>	<i>72</i>
<i>Fig. 23 Caso RB333</i>	<i>73</i>
<i>Fig. 24 Caso RB242</i>	<i>74</i>
<i>Fig. 25 Caso RB164</i>	<i>75</i>
<i>Fig. 26 Caso RB115</i>	<i>76</i>
<i>Fig. 27 Densitometría de la muestra RB289</i>	<i>77</i>
<i>Fig. 28 Densitometría de la muestra RB28</i>	<i>78</i>
<i>Fig. 29 Densitometría del control</i>	<i>79</i>
<i>Fig. 30 Secuenciación de la muestra RB351</i>	<i>82</i>
<i>Fig. 31 Secuenciación de la muestra RB272</i>	<i>83</i>
<i>Fig. 32 Secuenciación de la muestra RB164</i>	<i>84</i>

INDICE DE TABLAS

	<i>Pag.</i>
<i>TABLA 1.-CARACTERISTICAS DEL RETINOBLASTOMA</i>	9
<i>TABLA 2.- CONDICIONES PARA PCR</i>	48
<i>TABLA 3.- CONDICIONES PARA SSCP</i>	50
<i>TABLA 4.- DATOS OCULARES EN PACIENTES CON RETINOBLSTOMA</i>	55
<i>TABLA 5.- EDAD DE INICIO DEL PADECIMIENTO</i>	56
<i>TABLA 6.- POBLACION DE ESTUDIO</i>	57
<i>TABLA 7.- BANCO DE DNA</i>	59
<i>TABLA 8- POBLACION AFECTADA CON RB BILATERAL</i>	67
<i>TABLA 9.- POBLACION AFECTADA CON RB UNILATERAL</i>	68
<i>TABLA 10.-RESUMEN DE RESULTADOS</i>	85

RESUMEN.

El retinoblastoma (RB) es una neoplasia maligna de origen embrionario con una incidencia de 1 en 20,000 nacidos vivos; 40% de los casos son hereditarios, y presentan el tumor de manera bilateral el 60% no son hereditarios y el tumor generalmente se presenta de manera unilateral y cerca del 15% de los casos hereditarios también presentan el tumor de manera unilateral lo cual representa un problema cuando se pretende realizar un diagnóstico diferencial entre la forma unilateral hereditaria y la no hereditaria. Esta neoplasia se hereda con un patrón autosómico dominante y una penetrancia del 90 %.

El gen del retinoblastoma se localiza en el brazo largo del cromosoma 13 (13q14.1), contiene 27 exones y codifica para una fosfoproteína nuclear (pRB110) que participa en la regulación del ciclo celular y como supresor de crecimiento tumoral, de tal manera que la inactivación del gen RB1 es la responsable del desarrollo del tumor. Los pacientes con RB hereditario tienen una mayor predisposición a desarrollar otros tipos de cáncer como osteosarcoma, fibrosarcoma y otros por otro lado, en la actualidad el diagnóstico de la enfermedad se establece en etapas avanzadas en las que se requieren tratamientos agresivos como la enucleación del órgano afectado.

Por lo ya mencionado, es fundamental establecer herramientas moleculares que permitan realizar un diagnóstico temprano encaminado a dar un tratamiento oportuno, un asesoramiento genético adecuado y que permita diferenciar el RB unilateral hereditario del no hereditario.

El objetivo general de este trabajo fue detectar las mutaciones responsables del retinoblastoma en un grupo de pacientes del Instituto Nacional de Pediatría (INP). Para ello se creó un banco de DNA de sangre periférica de 60 pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de retinoblastoma y de sus familiares de primer grado. También se estandarizaron y aplicaron las metodologías que permitieron detectar mutaciones en el gen RB1 para lo cual, se sintetizaron los oligonucleótidos necesarios para amplificar los exones 2,3,4,5, 7 y 8 del gen RB1 mediante la reacción

en cadena de la polimerasa (PCR), se realizó el análisis de polimorfismo conformacional de cadena sencilla del DNA (SSCP) y se secuenciaron algunas muestras con patrones de SSCP anormales. De los 60 pacientes se encontraron 5 casos con RB bilateral y 5 casos con RB unilateral que mostraron un patron electroforético anormal por SSCP.

Al realizar la secuenciación de tres de los pacientes con SSCP anormal se caracterizarón las siguientes mutaciones: Paciente RB351 el cambio de los tripletes TTT fen, TCC ser, AAAgln, TAT tir por los tripletes TGA codon de paro, CCC pro, AGTser y CAT^{his} en la posición +56, +57, +18 y +19 del intron 3 respectivamente; en el paciente RB272 se encontró una inserción en el exón 3 de cuatro nucleótidos (GGAA) en la posición correspondiente al aminoácido 101 de la proteína pRB110. y en el paciente RB164 exón 5 se encontró una mutación que cambia los tripletes ATA Ile y TAT Tir por ATG Met y TGG Trp que codifican para los aminoácidos 172 y 173 de la proteína pRB110.

Para establecer si los cambios electroforéticos se heredaron de los padres (casos de no penetrancia) se estudió a los padres de los pacientes RB267, RB289 RB272, RB115, RB164 y RB175 y todos presentaron un patrón electroforético normal, lo cual sugiere que el cambio electroforético encontrado en los pacientes es ocasionado por una mutación de novo, y que los casos con RB unilateral y un patrón electroforético alterado son hereditarios dado que el estudio se realizó en sangre periférica.

Los resultados de este estudio apoyan que el diagnóstico molecular puede emplearse eficientemente para localizar y caracterizar las mutaciones responsables de las enfermedades hereditarias y de diferentes formas de cáncer, así como detectar los casos de no penetrancia y establecer el diagnóstico diferencial entre el RB hereditario y el RB no hereditario.

INTRODUCCIÓN

Genes supresores

Los genes supresores regulan el crecimiento celular de manera negativa inhibiendo la proliferación celular. El gen RB1 fue el primero de los genes supresores en haber sido aislado y clonado. Actualmente se conocen 50 posibles genes supresores debido a que se han identificado 50 formas de cáncer hereditario (Knudson, 1996) algunos de estos genes supresores son p53, el gen relacionado con el tumor de Wilms y el gen responsable de la neurofibromatosis (NF1) (Weinberg, 1991).

El cáncer comienza cuando existe una desregulación entre los factores que activan e inhiben el crecimiento y la diferenciación celular. Un componente del crecimiento celular, la iniciación de la síntesis del DNA, es regulada por el gen RB1. Otro componente de este desequilibrio es la falla en el proceso de apoptosis en el cual el gen p53 juega un papel muy importante, además de promover los mecanismos de reparación del DNA, si existe un daño celular que difícilmente pueda ser reparado el gen p53 induce a la célula a entrar en el proceso de apoptosis. La pérdida de la proteína p53 ésta estrechamente relacionada con el cáncer de colon y el cáncer pulmonar.

Excepto para las leucemias y linfomas, los genes supresores de tumores son los genes más frecuentemente involucrados en el cáncer en humanos (Knudson, 1993).

En otras formas de cáncer asociadas a genes supresores al igual que en el retinoblastoma los individuos que son heterocigotos para una mutación en la línea germinal tienen una alta predisposición para desarrollar otras formas de tumores malignos pues la pérdida de heterocigocidad es el distintivo de todos los genes supresores (Vogelstein, 1998).

Retinoblastoma (RB)

Es una neoplasia maligna de origen embrionario que puede presentarse desde el nacimiento o manifestarse durante los primeros 5 años de edad (Wiggs y cols, 1988; Shimizu y cols, 1994). A nivel mundial tiene una incidencia 1 en 20,000 nacidos vivos (Blanquet y cols, 1994), se caracteriza por la presencia de leucocoria, estrabismo y signos inflamatorios oculares (Díaz y Orozco, 1992). En esta forma de cáncer no existe una mayor predisposición hacia ningún sexo y el tumor ocurre con la misma frecuencia tanto en el ojo izquierdo como en el derecho.

Existen dos formas de la enfermedad **hereditario y no hereditario**; el 40% de los casos son hereditarios, generalmente manifiestan la enfermedad antes del primer año de edad y presentan el tumor de manera bilateral; el 60% de los casos no son hereditarios manifiestan la enfermedad después del primer año de edad y el tumor generalmente se presenta de manera unilateral. Por estudios de pedigree se ha demostrado que del 10 al 15% de los casos hereditarios también presentan el tumor de manera unilateral (Cowell, 1991; Diaz y Orozco, 1992) esto representa un problema cuando se pretende realizar un diagnóstico diferencial entre la forma unilateral hereditaria y la no hereditaria (*Figs. 1 y 2*).

La predisposición para desarrollar ésta enfermedad se hereda con un patrón autosómico dominante y una penetrancia del 90% (*Fig. 3*) es decir el 10% de los individuos que portan el gen anormal son asintomáticos (Abramson, 1990; Jorgen y cols, 1990; Scheffer y cols, 1989) sin embargo tienen un riesgo del 50% de heredarla a cada uno de sus hijos (Carnevale y del Castillo, 1993) (*Tabla 1*).

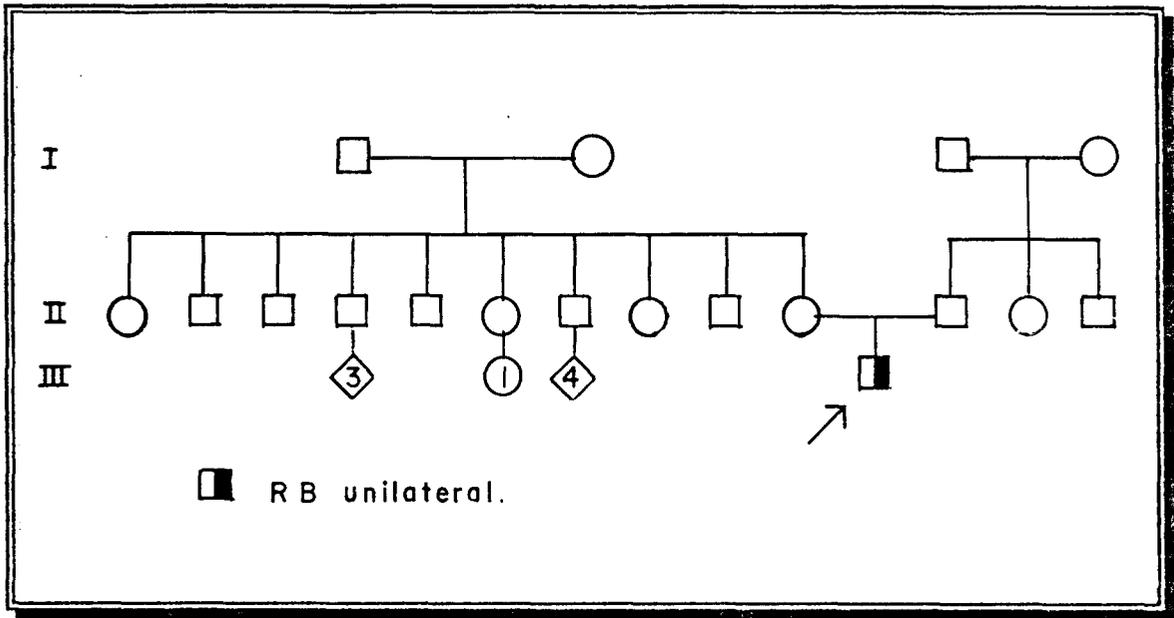


Figura 2.- RB unilateral; árbol genealógico de un caso con RB unilateral sin antecedentes de la enfermedad, clínicamente no se puede distinguir el RB unilateral hereditario del no hereditario.

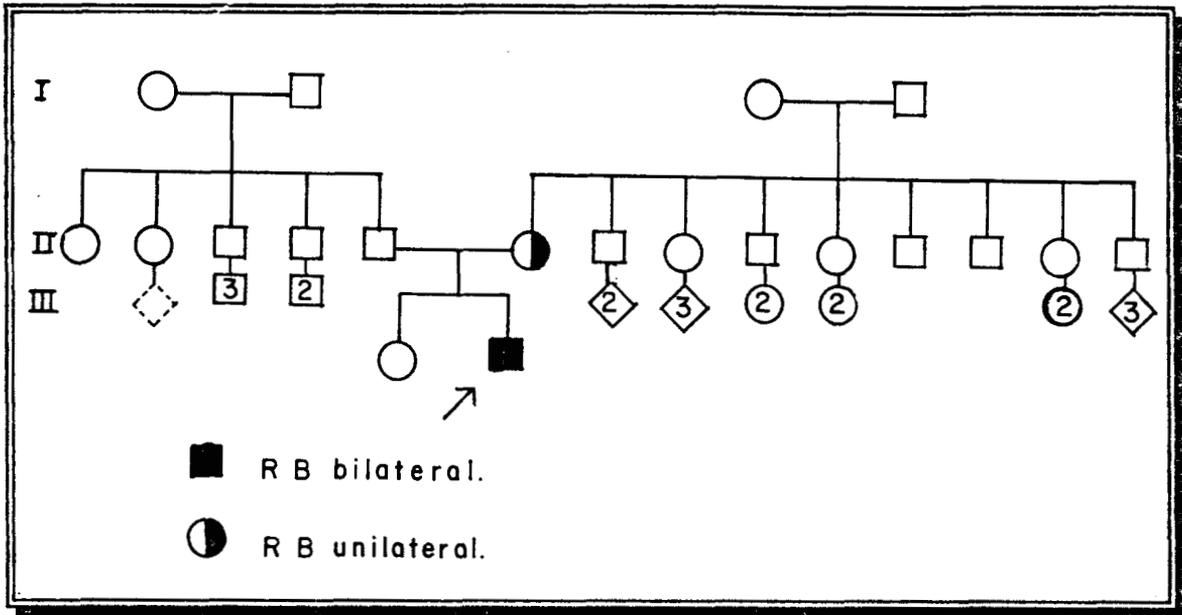


Figura 1.- RB bilateral. Arbol genealógico de un paciente cuya madre está afectada con RB unilateral; originalmente la madre se diagnosticó como un caso no hereditario.

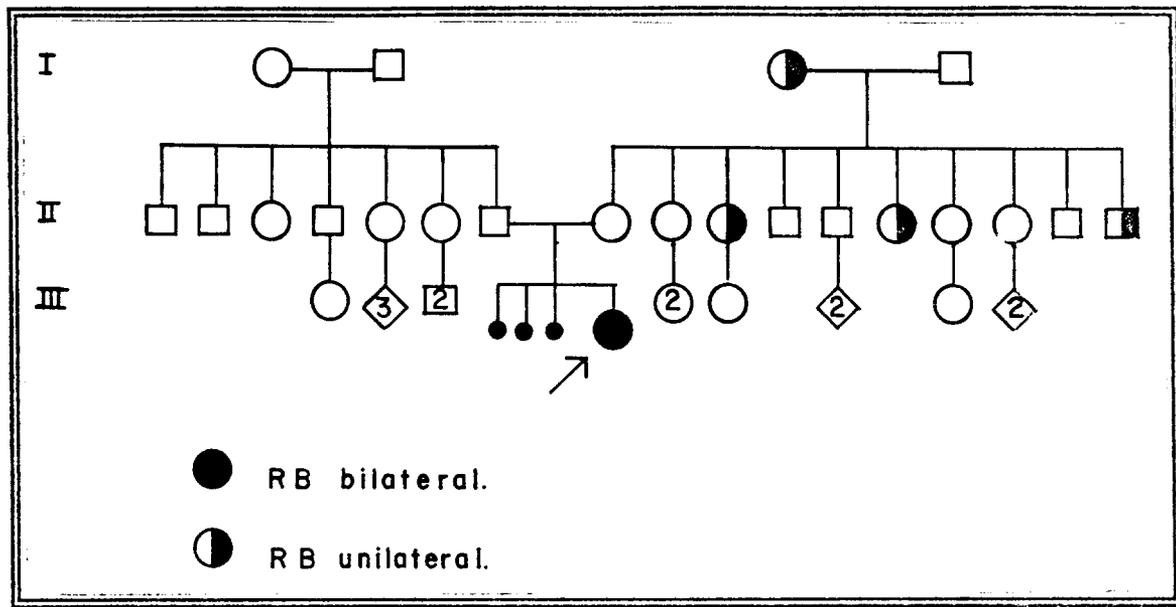


Figura 3.- Penetrancia. Caso de un paciente con RB bilateral cuya madre aparentemente sana heredó a su hija el alelo mutado proveniente desde la 1ª generación.

TABLA 1.- CARACTERISTICAS DEL RETINOBLASTOMA

HEREDITARIO (40%)	NO HEREDITARIO (60%)
Inicio temprano (< 1 año)	Inicio tardío (> 1 año)
Bilateral (85-90%) Unilateral (10-15%)	Unilateral (100%)
Alteraciones genéticas :	Alteraciones genéticas :
Mutaciones puntuales	Mutaciones puntuales
Grandes deleciones	Grandes deleciones
Translocaciones	Translocaciones
Progenie afectada	Progenie normal
Alto riesgo de otras neoplasias	Sin riesgo de otras neoplasias

Origen celular del retinoblastoma

El retinoblastoma fue descrito por primera vez por el médico holandés Pawius en 1597, y en 1809 James Wardop se refirió al tumor como un *Hongo haemático*. En 1864 Verchow propuso que el tumor se originaba de los elementos gliales de la retina, en 1896 Collins notó una similitud entre el tejido del tumor y la retina embrionaria; en 1900 Verhoeff presentó evidencias histológicas de que el tumor se deriva de los retinoblastos (Linn, 1994); y el grupo de Nork propuso en 1995 que las células fotorreceptoras (conos y bastones) son las células de origen del retinoblastoma en base a las siguientes evidencias:

a).- Los conos son la segunda línea celular de la retina que alcanza su diferenciación en la semana 12 (justo después de las células ganglionares).

b).- De acuerdo con la ley de Knudson, el segundo evento mutacional tiene lugar en células retinoblastoides inmaduras.

c).- Los bastones son de las últimas células de la retina que completan su actividad mitótica, además el tiempo en el cual ésta puede ser controlada por el producto del gen RB1 es muy corto e insuficiente para prevenir la tumorigénesis.

d).- Las células de Müller nunca pierden su capacidad de proliferación y por lo tanto no explican que el retinoblastoma este limitado a presentarse en la infancia.

3.- Los conos para los colores rojo/azul son de las primeras células en completar su desarrollo en la retina normal además, constituyen la mayor parte de las células bien diferenciadas en el tejido tumoral.

Estos datos sigieren que el retinoblastoma se origina de una célula cuyo desarrollo es relativamente tardío como es el caso de los bastones que difícilmente pueden ser protegidos del efecto antineoplasico del embrión donde además la proteína del gen RB1 es el único factor antineoplasico que

puede proteger a las células retinianas con maduración tardía (Nork y cols, 1995).

Ley de Knudson

De acuerdo con un análisis estadístico del retinoblastoma, Knudson demostró que éste es un cáncer causado por dos eventos mutacionales (Fig. 4), como resultado de los cuales ambos alelos del gen responsable del RB se inactivan y conducen al desarrollo del tumor.

En el RB hereditario la inactivación del primer alelo ocurre en las células germinales mientras que la inactivación del segundo alelo se presenta sólo en las células de la retina; en el RB no hereditario ambas mutaciones ocurren en las células de la retina (Knudson, 1971; Knudson 1996).

Dado que las mutaciones en el segundo alelo pueden ocurrir de manera independiente en distintas células, aquellos individuos con RB hereditario generalmente presentan tumores múltiples en un sólo ojo, mientras que en la forma no hereditaria comúnmente se observa un sólo tumor en el ojo afectado (Thoney, 1996; Lohmann, 1997; Lohmann, 1994).

El primer evento mutacional: la mutación que predispone al RB

De acuerdo con Knudson el retinoblastoma hereditario se origina a partir de una mutación a nivel germinal que puede presentarse como una mutación *de novo* o ser heredada de uno de los progenitores.

Cerca del 95% de las mutaciones germinales son mutaciones submicroscópicas y generalmente son mutaciones de tipo puntual.

El segundo evento mutacional: la mutación que dispara el proceso tumorigénico.

Una vez que el primer evento mutacional ha ocurrido, la célula se hace heterocigota por contener dos copias del mismo alelo *rb* uno normal y otro mutado (*rb/rb-*). Cuando el segundo evento ocurre la célula se hace homocigota (*rb-/rb-*) para la predisposición a desarrollar el tumor, esto da lugar al fenómeno denominado pérdida de heterocigocidad, que fisiológicamente se traduce en pérdida de la función del gen *RBI*, mecanismo necesario para el desarrollo del tumor (Naumova y Sapienza, 1994; Weinber, 1991).

Pérdida de heterocigocidad

Actualmente se conocen diferentes mecanismos que a nivel celular causan la pérdida de heterocigocidad (LOH) (Gallie y Joremy, 1990):

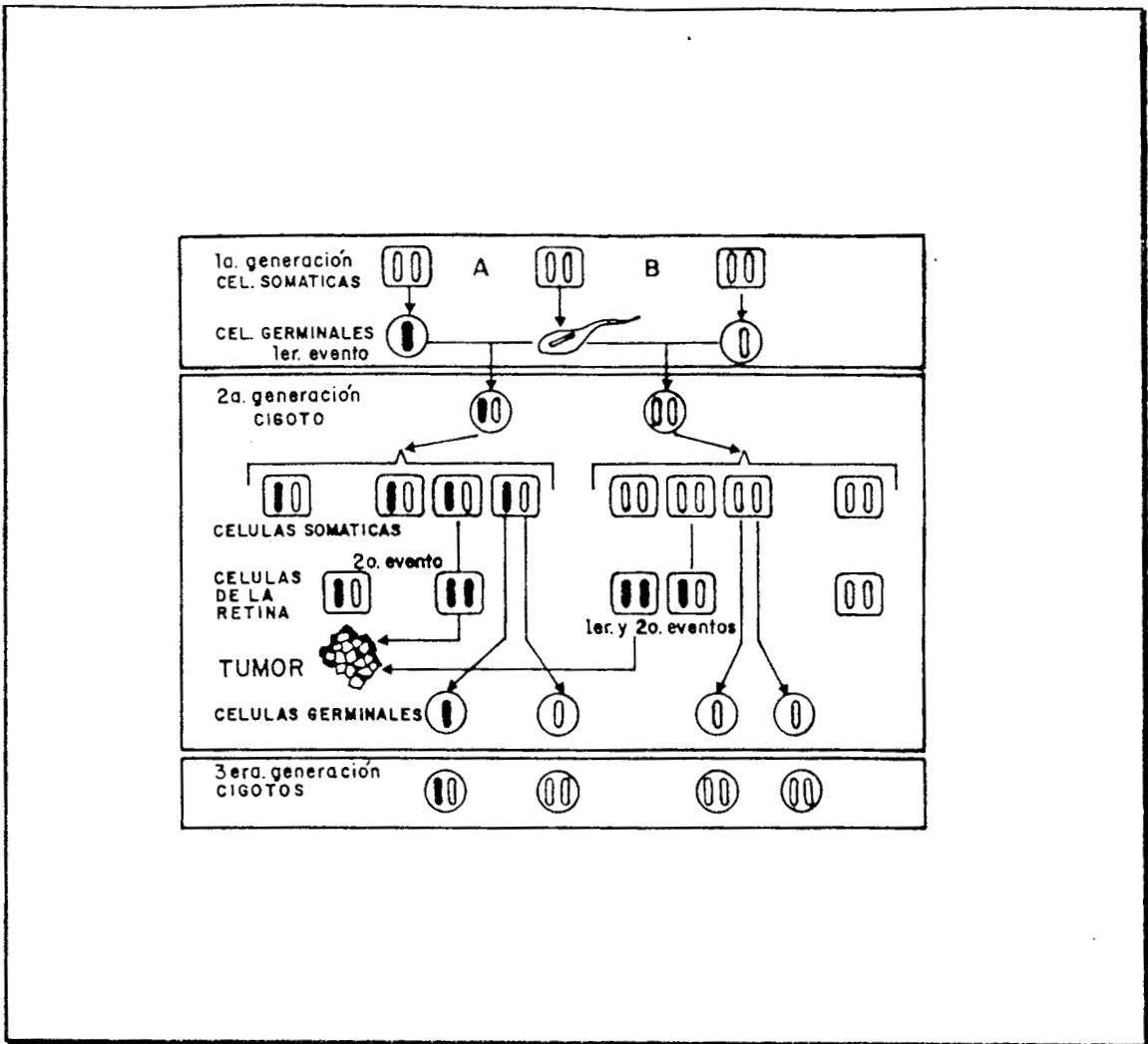
Pérdida de un cromosoma: en este proceso la célula es portadora de un cromosoma 13 normal y su homólogo es portador de una mutación; debido a un error en el ciclo de división celular el cromosoma normal se pierde y la célula adquiere la condición de hemicigocidad al quedar con un sólo alelo del cromosoma 13 el cual es portador de la mutación.

Pérdida de un cromosoma y reduplicación del cromosoma restante: de la misma manera que en el punto anterior el cromosoma normal se pierde y el cromosoma mutado se reduplica de tal manera que la célula adquiere la homocigocidad del alelo mutado.

Recombinación mitótica: este proceso que puede ocurrir entre un cromosoma normal y su homólogo portador del gen mutado después de ser segregados pueden dar lugar a una célula que conserva su heterocigocidad hasta los loci proximales al punto de recombinación, pero adquiere la condición de homocigocidad en los loci distales al punto de recombinación.

Mutaciones de tipo puntual: en condiciones de heterocigocidad basta con que el cromosoma normal sufra alguna mutación en el loci homologo al del cromosoma mutado para causar la perdida de heterocigocidad y la homocigocidad resultante dará lugar a una célula con potencial suficiente para desencadenar el desarrollo del tumor.

Muchos de estos mecanismos han sido confirmados mediante el análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) usando marcadores que flanquean al gen RB1 por ejemplo, en aquellos casos en que la condición de heterocigocidad para diferentes marcadores se ha confirmado en tejidos somáticos normales, se ha visto que en el tejido tumoral se encuentran en estado de homocigocidad indicando la pérdida del alelo normal (Weatherall, 1991).



(Díaz y Orozco; 1992)

Figura 4- Ley de Knudson. El retinoblastoma es causado por la inactivación de ambos alelos del gen RB1; en la forma hereditaria (A) el primer alelo se inactiva en las células germinales y el segundo alelo se inactiva en las células de la retina, en la forma no hereditaria (B) los dos alelos se inactivan únicamente en las células de la retina.

Mapeo del gen RB1

En un estudio citogenético realizado en pacientes con retinoblastoma, aproximadamente el 5% tenían una delección en el brazo largo del cromosoma 13 (13q-) éste fue el primer indicio acerca de la ubicación del gen RB1. Las técnicas de bandeo de cromosomas permitieron demostrar que ésta delección generalmente comprendía la región 13q14.1 - 13q14.3 (Francke, 1976; Yunis y Ramsey, 1978).

Para 1980 el único locus mapeado en el cromosoma 13 era el de la enzima esterasa D (ESD) y el grupo de Sparkes (1980) demostró que uno de cada cinco pacientes con retinoblastoma y síndrome 13q-, tenían una reducción del 50% en la actividad de la esterasa D comparada con la de los controles normales. Este estrecho ligamiento entre el gen de la esterasa D y el gen de predisposición al retinoblastoma se confirmó después mediante el mapeo de las delecciones que involucraban a los dos genes (Lih-Juan y cols, 1988).

Más tarde diferentes grupos de investigación utilizaron sondas específicas para el cromosoma 13 obtenidas por fragmentos de restricción de DNA encontrando que una de éstas sondas hibridaba con una secuencia con marco de lectura abierto capaz de transcribirse y utilizarse para aislar el DNA complementario de 4.7 kb correspondiente al mRNA del gen RB1 que codifica para una fosfoproteína de 928 amino ácidos (Friend, 1986).

Una vez que se caracterizó la secuencia del RNA mensajero diferentes grupos se enfocaron a determinar la organización genómica del locus del retinoblastoma. Para ello el grupo de McGee (1989) formó una genoteca que contenía todo el locus del retinoblastoma clonado en el bacteriofago λ gt11 y finalmente esto permitió determinar con exactitud la posición y la estructura del gen RB1 (*Fig. 5*).

Genética molecular del gen RB1

El gen RB1 tiene una longitud de 200 kb, está formado por 27 exones (Fig. 6) que difieren en tamaño desde 31pb hasta 1889 pb y se transcribe en un RNA mensajero de 4.7 kb el cual se traduce en una fosfoproteína nuclear de 928 aminoácidos y un peso molecular de 110kDa (Dunn y cols, 1988; Mitchell y Cowell, 1988; McGee y cols, 1989; Fung y Murphree, 1987).

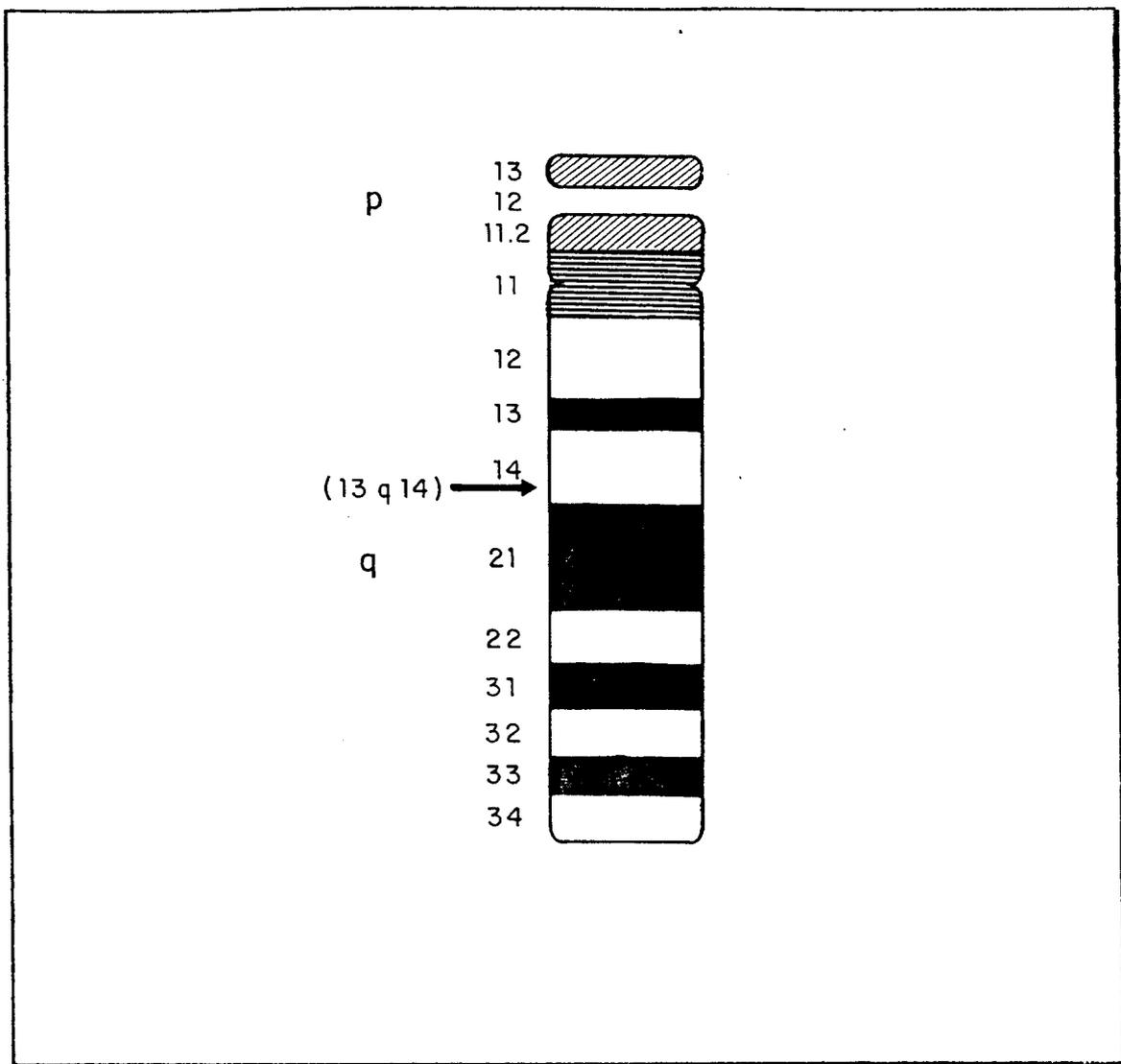
El extremo 5' de éste gen está orientado hacia el centrómero y contiene una secuencia rica en el dinucleótido CpG característica en la región promotora de los genes constitutivos aunque no existe una caja TATA y aunque ésta es una región rica en G+C tampoco existen evidencias de una caja CAAT; existen secuencias *Alu* en los siguientes puntos:

- (i) en el extremo 3' del exón 2
- (ii) en el extremo 5' del exón 9
- (iii) en el extremo 3' del exón 11
- (iv) en los intrones que flanquean al exón 14
- (v) en el extremo 5' del exón 17

La secuencia *Alu* localizada entre el exón 2 y el extremo 3' contiene dos secuencias altamente conservadas en las secuencias *Alu*, la primera es GAGGCNGAGGC que corresponde a la secuencia de unión con el antígeno T del virus SV40, la segunda es una secuencia asimétrica de función desconocida CCAGCCTGG y se localiza a ambos lados del exón 14.

Los exones 14 y 15 están separados por un pequeño intrón constituido casi en su totalidad por una secuencia *Alu* lo cual sugiere que estos exones alguna vez formaban un sólo exón y que se dividió durante la evolución.

Finalmente, el extremo 3' contiene una secuencia señal de poliadenilación AATAAA y el exón 20 codifica para un dominio en la proteína pRB110 que funciona como zipper de leucina (McGee y cols, 1989).



(Díaz y Orozco, 1992)

Figura 5.- Ubicación del gen RB1 en el cromosoma 13. Esquema del cromosoma 13 con la técnica de bandas G. La flecha indica el locus del gen RB1 en la región cromosómica 13q14.1.

GEN DEL RETINOBLASTOMA

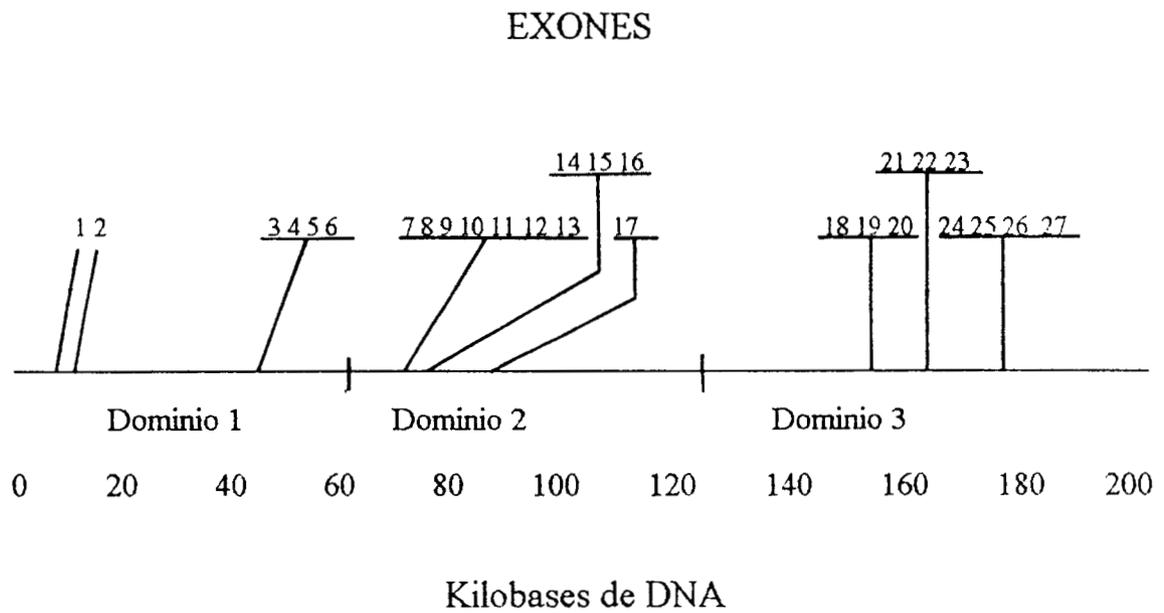


Figura 6.-Tamaño del gen RB1. El gen RB1 comprende 200 kb y contiene 27 exones agrupados en 3 dominios separados por 2 grandes intrones de 30 y 70 kb respectivamente (Yandell y Dryja, 1989).

Estructura de la fosfoproteína nuclear pRB110

La fosfoproteína nuclear pRB110 está constituida por tres dominios dos de ellos denominados A y B respectivamente se encuentran conservados entre diferentes especies y entre diferentes proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular; estos dominios están separados por el dominio C que varía en longitud, que no está conservado y que no participa en la regulación del ciclo celular (*Fig. 7*).

Los dominios A y B de manera independiente no tienen capacidad para inhibir el ciclo celular ya que su actividad represora requiere que ambos dominios sean coexpresados aún en proteínas separadas.

Ensayos de transfección han revelado que un dominio puede orientar al otro hacia la región promotora para formar una unidad represora que pueda interactuar con el factor E2F y ejercer un efecto inhibitor de la transcripción.

Experimentalmente se ha demostrado que la unidad represora A-B es suficiente para que la pRB110 sea capaz de unirse a oncoproteínas de tipo viral como la E1A de adenovirus, antígeno T del virus SV40 y E7 del virus papiloma humano (Kevin y Douglas, 1996).

Cualquier mutación en los exones del gen RB1 que codifican para las subunidades A y B, es capaz de inhibir la función represora de la proteína pRB110.

Función de la pRB110 en el ciclo celular

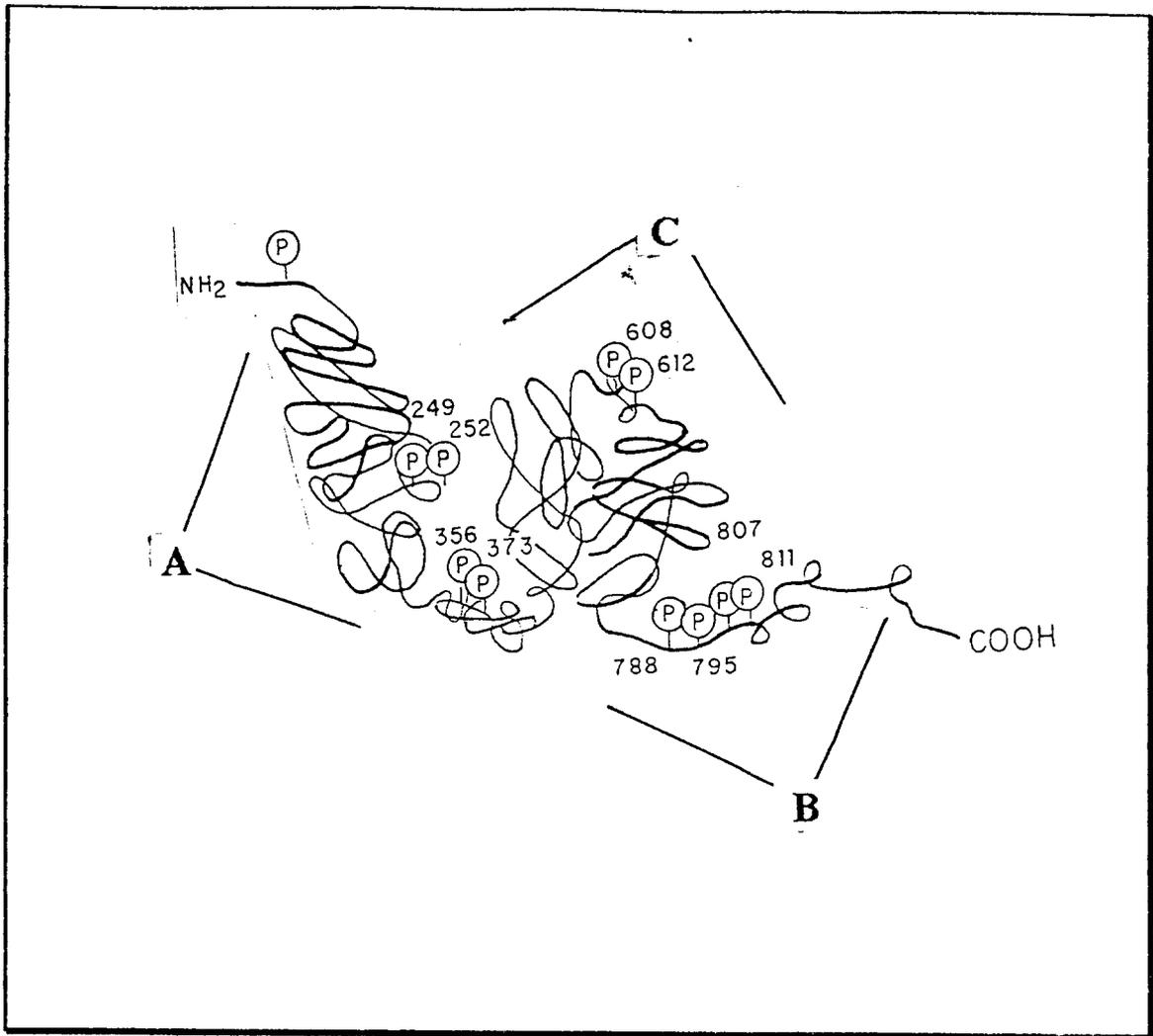
El gen RB1 es un gen supresor de tumorigénesis que regula de manera negativa el ciclo celular.

El producto de éste gen, la fosfoproteína pRB110 se une de manera específica al factor de transcripción *E2F* y su fosforilación está regulada por proteíncinasas, siendo la más importante la *cdc2*.

Durante la mitosis (**M**) la pRB110 se encuentra en su forma activa (no fosforilada) y tiene la capacidad de formar complejos con otras proteínas celulares y de manera específica con el factor promotor de la transcripción *E2F*; al final de **G0** y principios de **G1** la pRB110 interactúa con cinasas dependientes de ciclinas (*cdks*) transformándose en su forma inactiva (fosforilada). Como resultado de este proceso el factor *E2F* y las proteínas celulares asociadas al complejo quedan libres e inducen en la fase **S** la expresión de genes cuyos productos promueven la división celular, entre ellos algunos proto-oncogenes como *c-myc*, *c-fos* y *c-jun*.

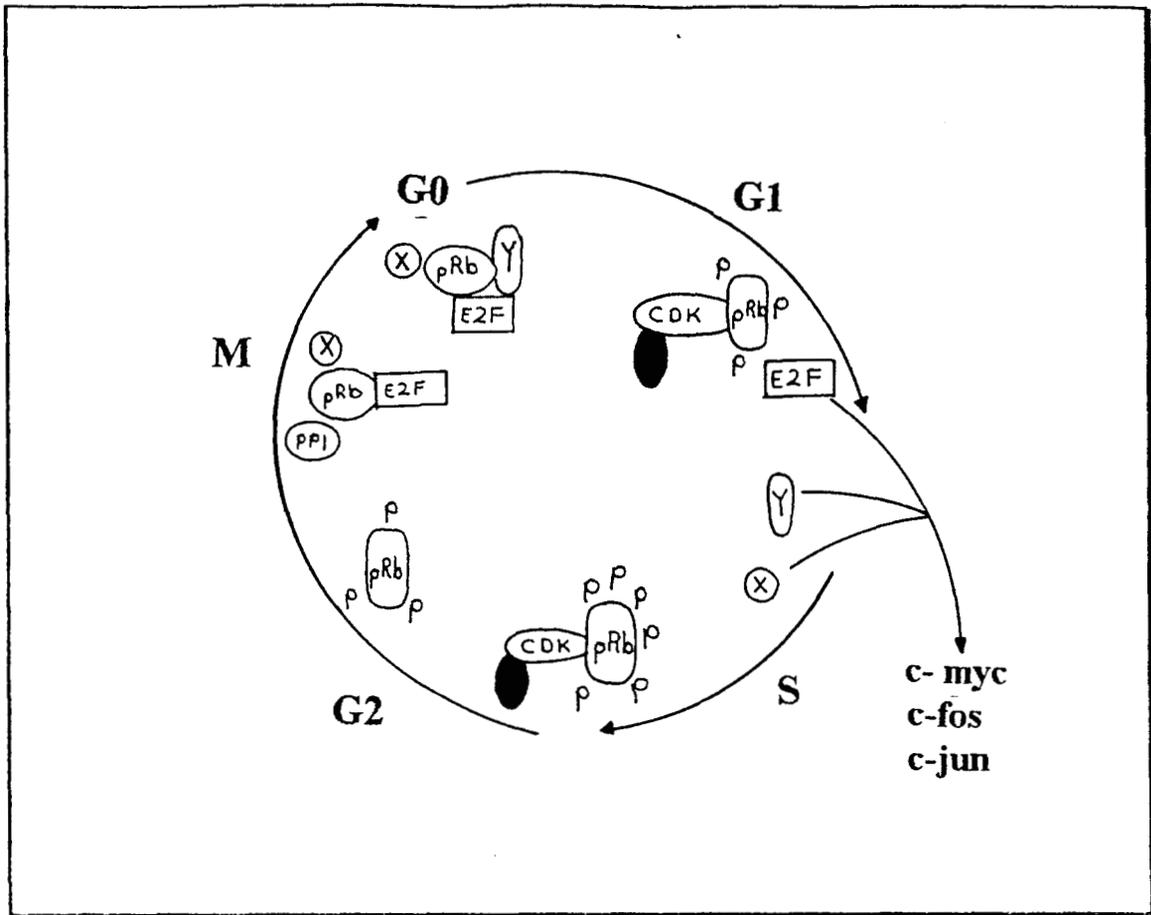
Al final de la fase **S** la interacción pRB110/*cdks* se pierde y la pRB110 regresa a su forma activa recuperando en la fase **M** del siguiente ciclo su capacidad para formar complejos inactivos con el factor *E2F* y otras proteínas celulares restableciendo nuevamente su función inhibidora del ciclo celular (*Fig. 8*)

La ausencia en la función de la pRB110 es una condición necesaria para el desarrollo del tumor por está razón se considera al gen RB1 como un gen supresor de crecimiento tumoral (Ludlow y cols, 1989; Benedict y cols, 1990; Shirodkar y cols, 1992; Horowitz y cols, 1989).



(Hollingsworth y cols, 1993)

Figura 7.- Estructura de la proteína pRB110. La proteína humana pRB110 contiene al menos tres dominios estructurales A,B y C. En el extremo amino, la región entre los aminoácidos 89 a 202 se ha visto que es susceptible a mutaciones inactivantes y que en condiciones normales es necesaria para controlar el ciclo de división mediado por el gen RB1. Los sitios potenciales para la fosforilación por cdc2 están indicados por (p) (Sterner, 1996).



(Hollingsworth y cols, 1993)

Figura 8.-Función de la pRB110 en el ciclo celular. La unión de la pRB110 al factor E2F está regulada por procesos alternados de fosforilación y desfosforilación. La forma hipofosforilada se une a E2F mientras que la forma hiperfosforilada no puede hacerlo. En este esquema, la proteína pRB110 está representada por pRB. Las etapas de fosforilación se indican con una P.

X y Y representan proteínas celulares que se asocian con pRB110, y ciclinas (ovalos sombreados).

Mutagénesis del gen RB1

El constante análisis sobre las mutaciones que ocurren en el gen RB1 ha permitido determinar que no existen regiones en la secuencia del gen RB1 que tengan una mayor predisposición a presentar mutaciones es decir "puntos calientes;" ya que éstas se presentan tanto en secuencias codificantes (exones) como en secuencias no codificantes (intrones, sitios de "splicing" y región promotora).

No obstante las mutaciones más frecuentes son sustituciones de una sola base (>50%), seguidas con menor frecuencia por transiciones, pequeñas deleciones o duplicaciones (>103 pb). Este espectro de mutaciones se han reportado tanto para mutaciones de tipo germinal como somáticas, y todas son funcionalmente nulas.

Datos recientes proponen que los dinucleótidos CpG podrían ser puntos calientes dentro del gen RB1 debido a lo siguiente:

- i) El 30- 40% de todas las mutaciones puntuales conocidas en la línea germinal dan lugar a deaminaciones espontáneas de los sitios CpG metilados.
- ii) El número de repetidos CpG en el DNA humano es muy bajo.
- iii) se ha observado un fuerte bloqueo de las islas CpG en las secuencias codificantes.
- iv) Experimentalmente se ha visto que las Islas CpG en la región promotora del DNA de mamíferos presentan una inherente resistencia a ser metiladas.

Es importante aclarar que el proceso de deaminación espontánea ocurre con alta frecuencia en cadenas unicasenarias especialmente durante el proceso de transcripción en la cadena que no se transcribe, la cual, es reparada menos eficientemente que su cadena complementaria (Caron de Fromentel y Soussi, 1992); además, la hipermetilación de las islas CpG en el gen RB1 podrían ser un evento mutacional significativo causante del retinoblastoma

unilateral no hereditario pues se le ha observado en 9 de 69 (13%) tumores unilaterales y en ninguno de 57 tumores bilaterales.

Neoplasias asociadas al gen RB1

Ambos alelos del gen RB1 se han encontrado mutados en el siguiente grupo de tumores no oculares (Linn, 1994)

- 1.- Osteosarcoma
- 2.- Sarcomas de tejido blando
- 3.- Carcinoma pulmonar
- 4.- Carcinoma de mama
- 5.- Carcinoma de vejiga
- 6.- Carcinoma de riñón
- 7.- Carcinoma de prostata
- 8.- Carcinoma esofágico
- 9.- Cáncer de hígado
- 10.-Carcinoma de cervix

Las mutaciones en el gen RB1 asociadas a tumores no oculares comúnmente son inducidas por factores ambientales (Linn, 1994), en contradicción con las mutaciones espontáneas que ocurren en el retinoblastoma. Hay un marcado incremento en la proporción de inversiones con respecto a la de las sustitución y delección de bases. A diferencia del retinoblastoma ninguna de las sustituciones reportadas ocurren en la isla CpG y no se ha encontrado homología entre los puntos de mutación en el gen RB del retinoblastoma y el gen RB de otras formas de cáncer. Esto es una fuerte evidencia de que las mutaciones en los alelos del gen RB1 en otras formas de cáncer son inducidas por factores del medioambiente y refuerzan la idea de que los mecanismos mutagénicos espontáneos involucrados en el desarrollo del retinoblastoma son diferentes

a los de las mutaciones involucradas en la etiología y desarrollo de otras formas de cáncer no ocular (Linn, 1994).

Los pacientes con retinoblastoma hereditario tienen mayor predisposición para desarrollar tumores secundarios de tipo no ocular. Originalmente se pensó que los tumores secundarios eran el resultado del tratamiento con radioterapia, debido a que la mayoría de ellos aparecen en la zona radiada de pacientes con la mutación germinal; sin embargo un buen número de niños afectados desarrollan tumores secundarios antes del tratamiento del tumor intraocular (Abramson, 1990).

Los individuos con retinoblastoma hereditario tienen un riesgo 200 veces más elevado de desarrollar tumores de tipo mesenquimatoso en etapas tempranas de su vida adulta, siendo los más frecuentes los osteosarcomas, fibrosarcomas y mielomas (Roarty y cols, 1988; Draper y cols, 1986; Toguchida y cols, 1988).

Estrategias para el estudio del RB

De todas las mutaciones en el gen RB1 solamente del 3 al 5% pueden ser reconocidas por técnicas de citogenética incluyendo cariotipos de alta resolución donde se han encontrado deleciones intersticiales o translocaciones del brazo largo del cromosoma 13. Cerca del 95% de las mutaciones de origen germinal son submicroscópicas y de éstas sólo cerca del 15 al 20% son detectables por hibridación con Southern blot y comúnmente se trata de deleciones y rearrreglos estructurales mayores (Blanquet, 1991), el resto de las mutaciones son de tipo puntual.

El análisis con técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de protección con ribonucleasa (RNasa) han permitido detectar de manera exitosa mutaciones de tipo puntual.

Actualmente se han desarrollado métodos que permiten analizar fragmentos previamente amplificados dada la versatilidad que ofrecen técnicas como la PCR que facilita el análisis del DNA de una manera más rápida y específica cuando se le utiliza en conjunto con técnicas como la electroforesis con gradiente desnaturizante (DGGE), electroforesis de fragmentos de DNA heterodúplex, restricción química de secuencias mal complementadas, el análisis del polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) y la secuenciación del DNA por terminación de cadenas.

Estas técnicas permiten detectar de manera precisa y rápida mutaciones que abarcan desde una hasta mil pares de bases en un periodo de tiempo relativamente corto.

A continuación se describen las técnicas utilizadas en éste estudio.

Análisis por PCR

Con ésta técnica se puede amplificar selectivamente una región del DNA en varios millones de veces en pocas horas. Permite la detección y el análisis de secuencias específicas de un gen a partir de la muestra de un paciente sin necesidad de su clonación, Southern blot o Northern blot (Orozco, 1993).

La PCR está basada en la amplificación enzimática de un fragmento de DNA flanqueado por dos secuencias cortas de DNA (oligonucleótidos) que hibridan con la cadena homóloga y sirven de iniciadores para la síntesis de la cadena complementaria por una DNA polimerasa (*Fig. 9*).

Con el uso de equipos especializados para PCR en pocas horas se pueden generar millones de copias idénticas a esta secuencia. Esta técnica requiere sólo cerca del 1% del DNA requerido para Southern blot. Los productos amplificados son fácilmente analizables en estas condiciones, lo que facilita la detección de mutaciones.

Detección de mutaciones por análisis del polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP)

Orita y cols. (1989) aplicaron el método de SSCP para detectar conformaciones anormales en la secuencia del DNA humano y pudieron observar la diferencia en la movilidad de cadenas sencillas de DNA empleando una secuencia escogida arbitrariamente.

Por éste procedimiento los DNA's de cadena sencilla de la misma longitud pueden separarse con una electroforesis en gel de poliacrilamida debido a la diferencia en sus conformaciones predominantemente semiestables.

La diferencia en la movilidad de los DNA's de cadena sencilla sobre un gel de electroforesis se debe a los cambios conformacionales y por lo tanto son denominados como polimorfismos conformacionales de cadena sencilla.

Considerando que todos los individuos sanos son portadores de secuencias idénticas del mismo gen, experimentalmente todos deben presentar el mismo patrón electroforetico pues todos ellos tienen la posibilidad de presentar las mismas conformaciones, esto permite identificar portadores de alguna mutación ya que presentan un patrón electroforetico distinto al de los individuos sanos (*Fig. 10*).

El análisis por SSCP puede ser empleado para la búsqueda de mutaciones involucradas en enfermedades hereditarias y en los diferentes tipos de cáncer. La comparación de fragmentos de DNA de muestras de tejido canceroso con aquellas de tejido normal por medio de SSCP puede revelar alelos amplificados de determinados genes y pérdida de heterocigocidad en los loci de un cromosoma cualquiera que éste sea.

Una importante ventaja del análisis por SSCP es que puede ser empleado para detectar mutaciones puntuales en varias posiciones de un fragmento de DNA (Damjan y Dean, 1993; Iwahana y cols, 1989).

Secuenciación por terminación de cadenas

Originalmente F. Sanger y cols (1977) desarrollaron un método de secuenciación utilizando DNA de *Escherichia coli* y DNA polimerasa I para sintetizar una copia complementaria de un molde de DNA de cadena sencilla. Este método aprovecha la capacidad de la DNA polimerasa I de *E. coli* para sintetizar una cadena de DNA conservando el principio de complementariedad de bases de Chargaff al incorporar de manera sucesiva 2'-desoxinucleótidos en la cadena que se está sintetizando, deteniéndose el proceso cuando se incorpora a ella un 2',3'-didesoxinucleótido (Fig. 11).

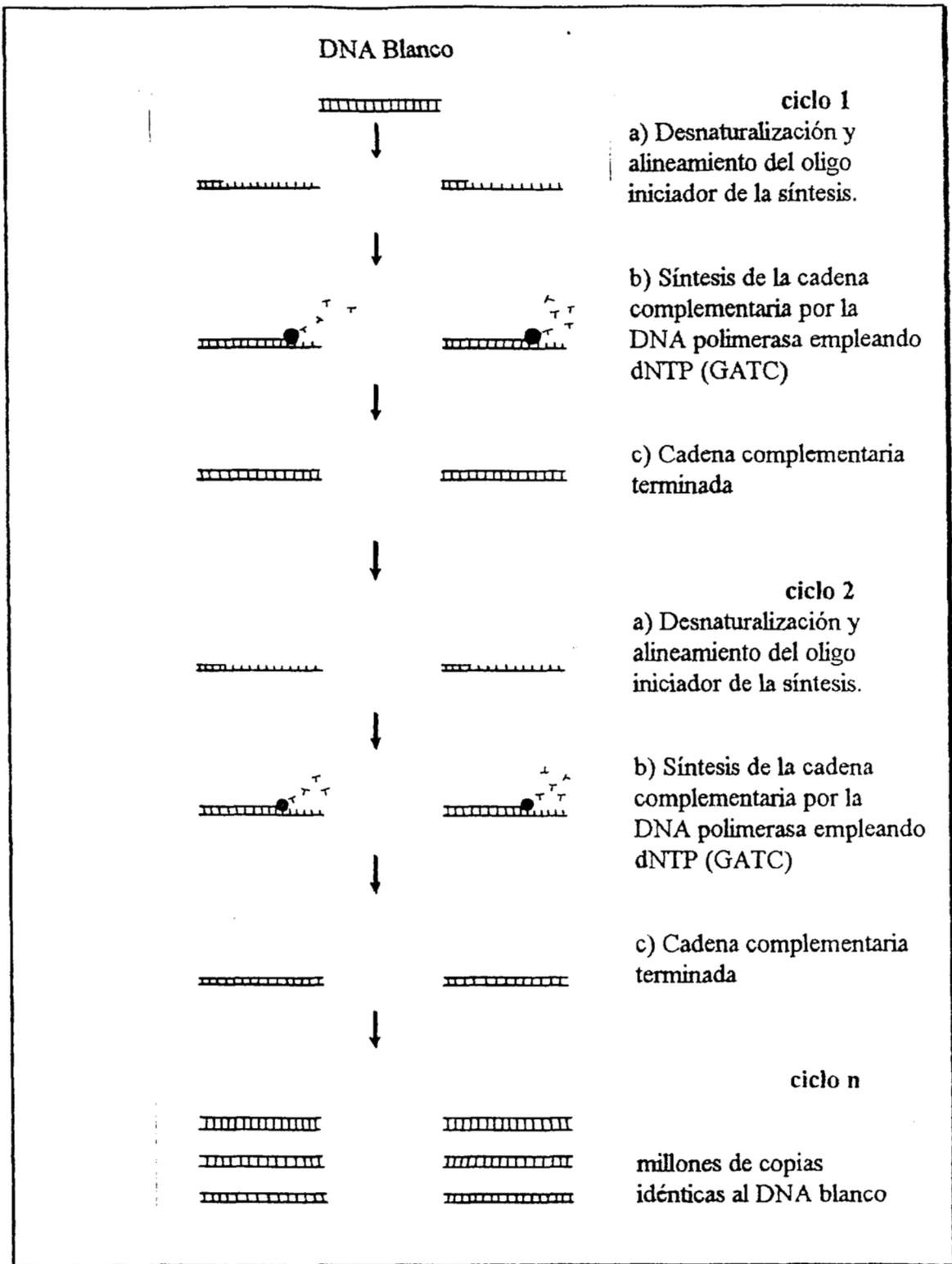


Figura 9.- Reacción en cadena de la polimerasa. La técnica de PCR permite obtener millones de copias de un pequeño fragmento de DNA en forma exponencial en un período de tiempo relativamente corto.

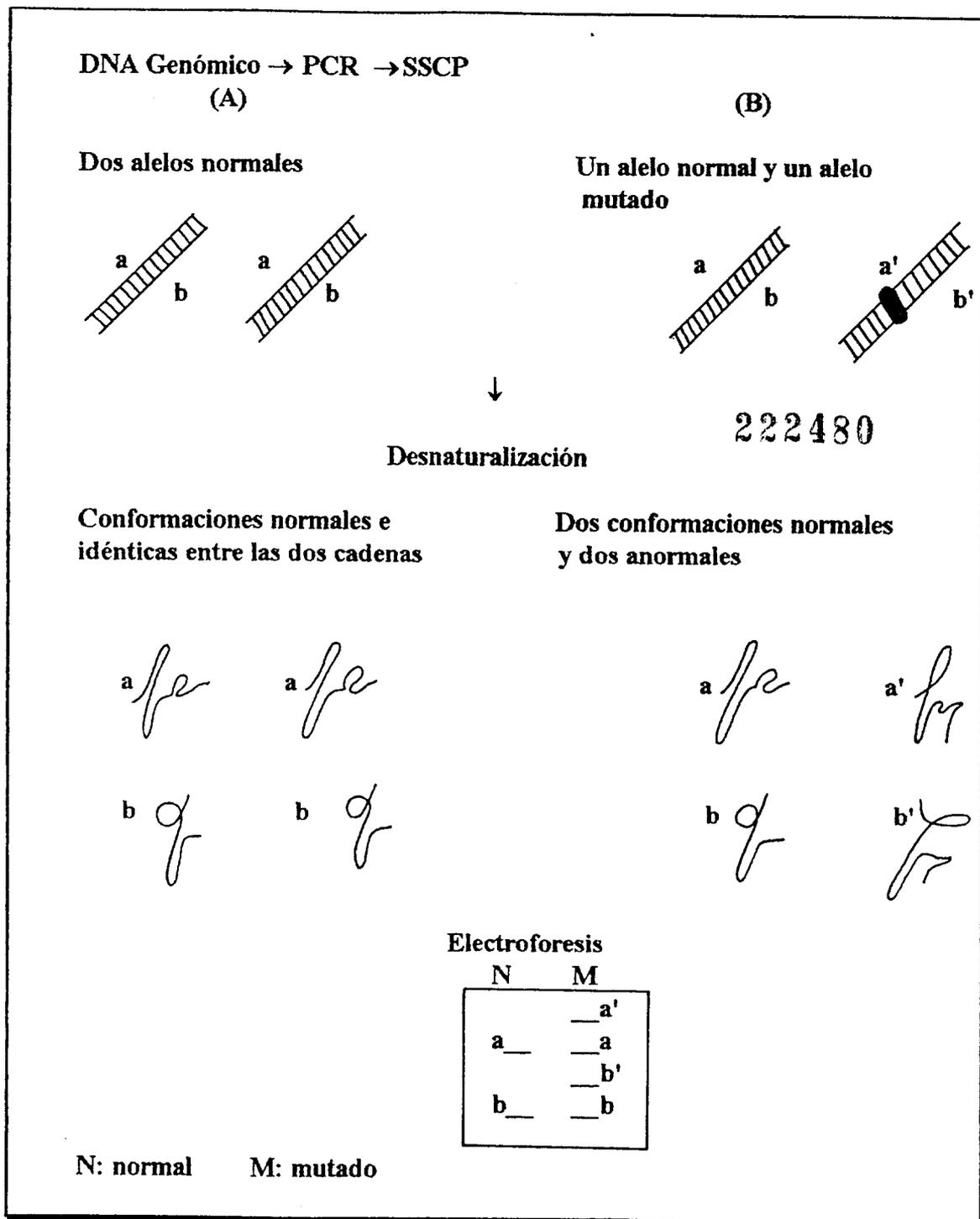


Figura 10.- Detección de mutaciones por SSCP. Los fragmentos de DNA pueden adoptar diferentes conformaciones y migrar en forma diferente en geles de poliacrilamida. En la figura se observan dos alelos (A) con sus dos cadenas normales (a y b), y otro par de alelos (B) donde uno de ellos tiene sus dos cadenas normales (a y b) y el otro tiene mutadas ambas cadenas (a' y b'), las cadenas mutantes adquieren una conformación diferente y migran en forma distinta en una electroforesis.

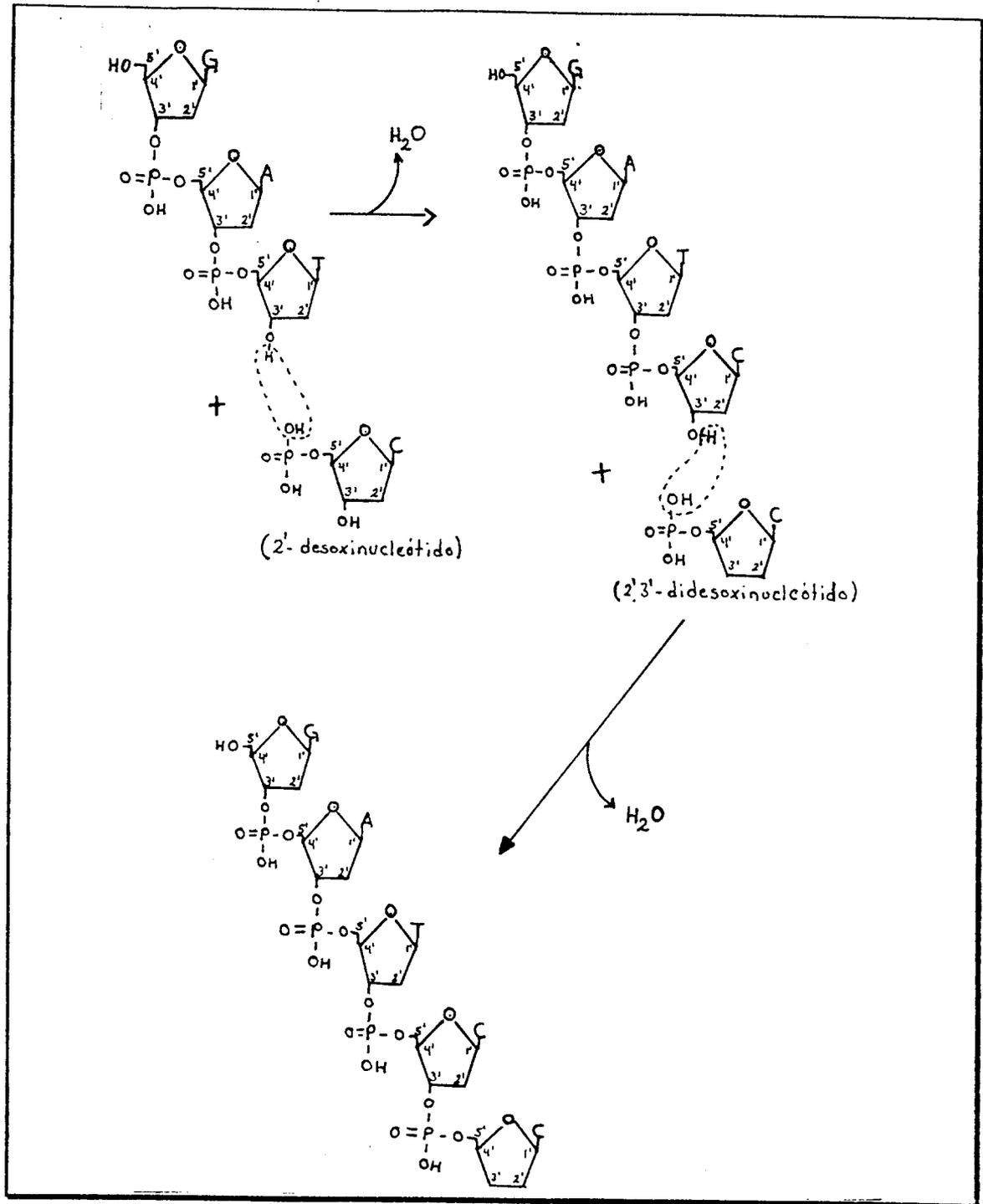


Figura.11.- Secuenciación por terminación de cadenas. Cuando un 2',3'-didesoxinucleótido se incorpora al extremo 3' de la cadena en crecimiento, este proceso se detiene selectivamente en la base correspondiente Guanina, Timina, Adenina o Citosina debido a que la cadena en crecimiento carece ahora de un grupo 3' hidroxilo necesario para la incorporación del siguiente 2'-desoxinucleótido.

JUSTIFICACION

El Instituto Nacional de Pediatría (INP) recibe aproximadamente 50 casos de retinoblastoma al año, un gran número de ellos han requerido de la enucleación de por lo menos un ojo por falta de un diagnóstico temprano (Diaz y Orozco, 1992).

En México, el tumor se diagnóstica en las etapas iniciales sólo cuando se realiza una búsqueda intencionada en pacientes con antecedentes familiares de la enfermedad o cuando el tumor ya ha afectado un ojo.

El diagnóstico y el tratamiento en los primeros estadios del tumor evita la diseminación a través del nervio óptico y de los tejidos de la órbita (Vaughan y Taylor, 1987).

Las herramientas de Biología Molecular permiten realizar un diagnóstico diferencial entre la forma hereditaria y la no hereditaria.

Por lo mencionado en los puntos anteriores, es imprescindible aplicar las herramientas de Biología Molecular para con ello contribuir a la prevención, a un tratamiento oportuno y a un asesoramiento genético adecuado para los pacientes afectados.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las mutaciones en el gen RB1 responsables del retinoblastoma en pacientes del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Describir las características clínicas del RB en nuestra población.
- 2.- Detectar los casos de no penetrancia y determinar la frecuencia de ésta en las familias afectadas.
- 3.- Caracterizar las mutaciones responsables del retinoblastoma.
- 4.- Contribuir al diagnóstico diferencial entre el RB hereditario y no hereditario.

ESTRATEGIA GENERAL

Para cumplir con los objetivos de este trabajo se captó una población de 60 pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de RB, a todos se les realizó historia clínica incluyendo árbol genealógico.

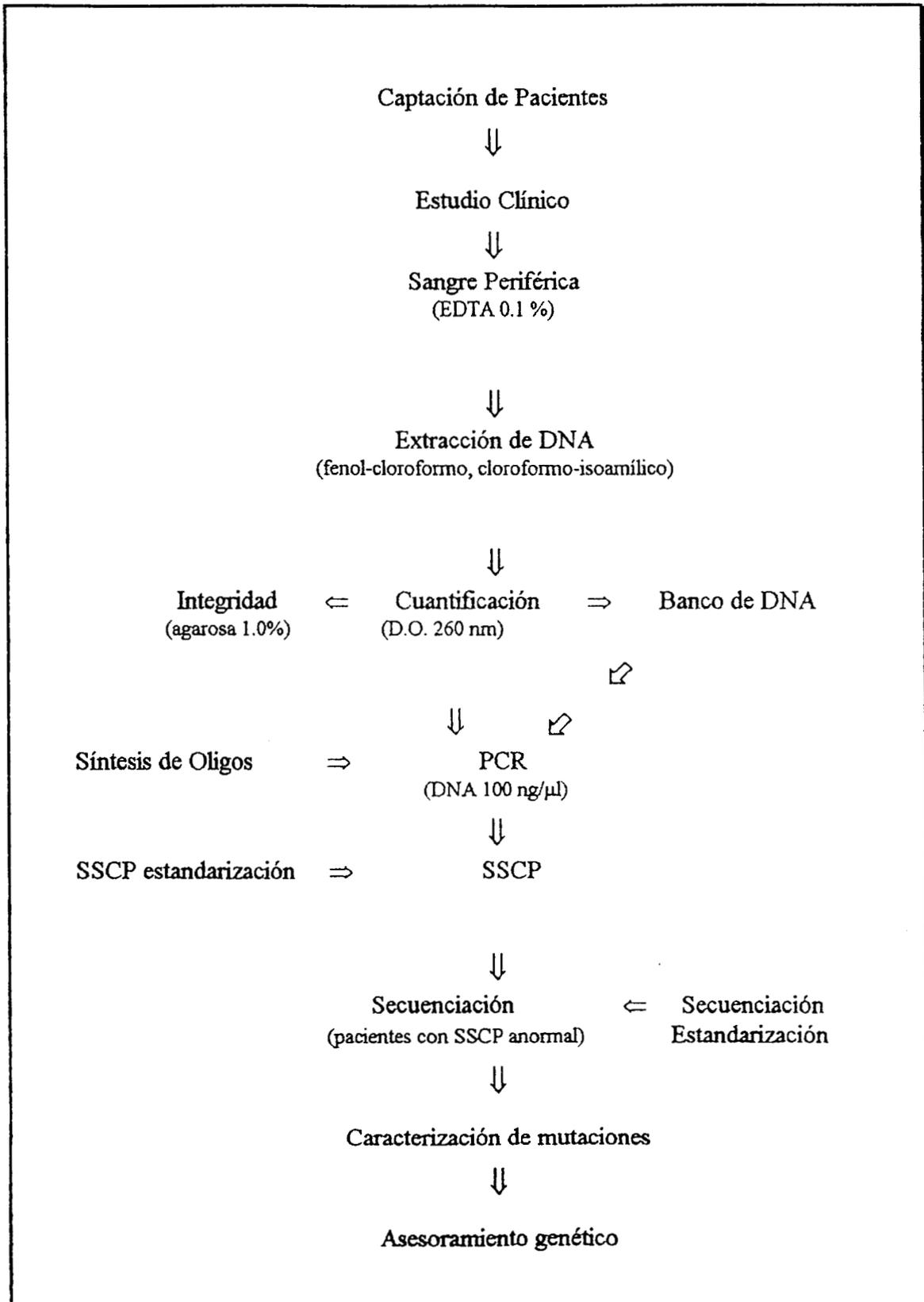
Se tomó una muestra de sangre periférica de los pacientes seleccionados y de sus familiares de primer grado, se extrajo y se cuantificó el DNA de los linfocitos de cada paciente y con él se conformó un banco de DNA.

De acuerdo con Blanquet y cols (1993), se sintetizaron las secuencias de oligonucleótidos necesarios para amplificar los exones 2,3,4,5,7 y 8 del gen RB1 por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se realizó una búsqueda no dirigida de mutaciones en los pacientes con retinoblastoma mediante el análisis de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) y se caracterizaron algunas mutaciones por secuenciación del DNA.

El asesoramiento genético se otorgó a cada familia tomando en cuenta que todos aquellos pacientes en los que se detectó una mutación a nivel de células somáticas no tumorales presentan la forma hereditaria del RB.

DIAGRAMA DE FLUJO



MATERIAL Y METODOS

REACTIVOS

Reactivos para extracción de DNA de sangre periférica

- RCLB solución de lisis de células rojas

TRIS pH 7.5	10 mM
MgCl ₂	5 mM
NaCl	10 mM

- WCLB solución de lisis de células blancas

TRIS pH 7.6	10.0 mM
EDTA pH 8	10.0 mM
NaCL	50.0 mM
SDS	0.2 %
Proteinasa K	200 µg/ml

- Fenol Saturado:

H ₂ O estéril	200 ml
Fenol a 68 °C	300 ml
TRIS HCl pH 8 1M	4 ml
NaOH 10 M	293 µl

- Cloroformo

- Cloroformo- alcohol Isoamílico (24/1)

- Etanol absoluto

- NaCl 1M

Reactivos para PCR y SSCP

- Marcador de pesos Ladder 100 pb

- Marcador de pesos λHind III

- Buffer Stoffel 10 X:

Tris-HCl	100 mM
KCl, pH 8.3	100 mM

- Mg Cl₂ 25 mM

- Taq. Polimerasa /Stoffel 10 U/µl

U = unidades: una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima que incorpora 10 nmoles de dinucleótidos a 74 °C.

- Dinucleótidos: A, T, G y C, para PCR 10 mM c/u.

- Oligonucleótidos específicos del fragmento a amplificar 100 ng/µl.

.- [α - 32 P]dCTP Actividad : 3000 μ Ci/mmol; Utilizado : 250 μ Ci

.- H₂O bidestilada estéril

.- Bromuro de etidio 5 μ g/ml

.- Buffer acarreador PCR:

Xilen-Cianol 0.05 %

Azul de bromofenol 0.05 %

.- Buffer TBE 10 X

Tris-base 108 g

Acido borico 55 g

EDTA 0.5 M pH 8.0 44 ml

.- Colorante Stop (SSCP):

Formamida 95.0 %

Azul de bromofenol 0.05 %

Xilen-Cianol 0.05 %

.- Agarosa grado electroforesis

.- Poliacrilamida para geles de SSCP con glicerol 10%

Glicerol 25.0 ml

TBE 10 X 25.0 ml

H₂O 162.0 ml

Acrilamida 38.0 ml

Acrilamida 200.0 g

Agua estéril 300.0 ml

Bisacrilamida 6.7 g

.- Persulfato de amonio 10 %

.- TEMED reactivo

.- Gel para SSCP

*Poliacrilamida con glicerol 10 % 60 ml

*TEMED reactivo concentrado 39 μ l

*Persulfato de amonio 10 % 327 μ l

*Se mezclan y la solución obtenida se coloca rápidamente en la cámara de electroforesis para SSCP sin que le queden burbujas de aire, se le deja polimerizar y se carga con las muestras que se quieren analizar, el corrimiento se realiza con buffer TBE .8 X

Reactivos para purificación del DNA a Secuenciar

.- QIAquick-spin Column (Nalgene Kit)

- .- Buffer PB
- .- Buffer de lavado PE
- .- H₂O estéril

Reactivos para secuenciación

Sequenase Version 2.0T7 DNA sequencing Kit USB:

.-Oligonucleótido para PCR: es específico del exón que se va a secuenciar.

.-Didesoxinucleótidos de terminación:

ddG: 80 μ M dGTP, 80 μ M dATP, 80 μ M dCTP, 80 μ M dTTP, 8 μ M ddGTP, 50 mM NaCL.

ddA: 80 μ M dGTP, 80 μ M dATP, 80 μ M dCTP, 80 μ M dTTP, 8 μ M ddATP, 50 mM NaCL.

ddT: 80 μ M dGTP, 80 μ M dATP, 80 μ M dCTP, 80 μ M dTTP, 8 μ M ddTTP, 50 mM NaCL.

ddC: 80 μ M dGTP, 80 μ M dATP, 80 μ M dCTP, 80 μ M dTTP, 8 μ M ddCTP, 50 mM NaCL.

.- Mezcla de bases (5 X):

dGTP 7.5 μ M

dCTP 7.5 μ M

dTTP 7.5 μ M

dATP 7.5 μ M

.- Ditioneitol (DTT) 0.1 M

.- [α -³⁵S]dATP Actividad : 1000Ci/mmol; Utilizado : 250 μ Ci

.- Colorante Azul de bromofenol-Xilen-Cianol:

Formamida 95 %

EDTA 20 mM

Azul de bromofenol 0.05 %

Xilen-Cianol 0.05 %

.- DNA polimerasa 13 U/ μ l en:

.- Gel para secuenciación:

Acrilamida 4.56 g

Bisacrilamida 0.24 g

Urea 25.20 g

Buffer para gel tolerante al glicerol 20 X 3.0 ml

formamida	8.40 ml
H ₂ O	cbp 60.0 ml
Persulfato de amonio 10 %	600.0 µl
TEMED reactivo	60.0 µl

Se mezclan, la acrilamida, Urea, Gly. Tol. Gel Buffer 20 X, H₂O y después se agregan el persulfato de amonio y el TEMED. El corrimiento se efectua con Gly. Tol. Gel Buffer 1 X.

EQUIPO

- .-Oligosintetizador Gene Assembler Plus (Pharmacia LKB Biotechnology).
- .-Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer Biotechnology).
- .-Campana de protección para radioisotopos (Labconco).
- .-Densitómetro Cliniscan 2 (Helena labs.).
- .-Espectrofotómetro Spectronic 1001 Plus (Milton Roy Field).
- .-Concentrador Centrivap (Labconco).
- .-Campana de extracción para gases (Labconco).
- .-Transiluminador (Fotodyne).
- .-Congelador -70 °C (Revco).
- .-Congelador -20 (American).
- .-Secador para geles Drygels (Hoffer Scientific Instruments).
- .-Termoblock (2050) (Labline).
- .-Cámara de electroforesis para SSCP y Secuenciación Polar Beard
- .-Sistema de electroforesis submarina (Sigma Chemical Co.).
- .-Centrífuga clínica
- .-Fuente de poder 500 V (Hoffer Scientific Instruments).
- .-Fuente de poder 2000 V (Sigma Chemical Co.).
- .-Microcentrifuga (Fotodyne).
- .-Contador Gaiger
- .-Goggles para protección de ultravioletas
- .-Micropipetas: 0.5-10 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl.
- .-Pantallas de lucita para protección de radioisotopos
- .-Cámaras de lucita para protección de radioisótopos
- .-Balanza analítica (Sartorius).
- .-Equipo de revelado automático
- .-Horno de microondas
- .-Cassettes para autorradiografías (Kodak O-matic)
- .-Placas para autorradiografías
- .-Camara fotográfica (Fotodyne).
- .-Cristaleria de laboratorio
- .-Puntas para pipetas y tubos eppendorf de plástico 0.6 ml y 1.5 ml
- .-Guantes de latex desechables

METODOLOGIA

Criterios de inclusión:

Se incluyeron en el estudio 60 casos índice, 28 con RB unilateral y 32 con RB bilateral cuyo diagnóstico clínico de RB fue confirmado por estudios histopatológicos.

Criterios de exclusión:

222480

Se excluyeron aquellos pacientes que hubiesen recibido tratamiento con quimio o radioterapia en los tres meses anteriores al estudio.

El DNA se obtuvo a partir de sangre periférica de acuerdo con el siguiente procedimiento (Ausubel y Brent, 1988)

Extracción de DNA de sangre periférica

Se tomaron 7 ml de sangre periférica del paciente usando EDTA como anticoagulante. La muestra se centrifugó por 20 minutos a 3000 rpm, el plasma y los eritrocitos se desecharon, la capa de linfocitos se separó y se colocó en 3 ml de solución para lisis de eritrocitos (RCBL), se agitó suavemente y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 3 ml de RCBL, se agitó suavemente y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm se repitió este paso hasta eliminar toda la hemoglobina, finalmente el botón de linfocitos se resuspendió en 333 μ l de RCBL con 1.5 ml de solución para lisis de linfocitos (WCBL) y se incubó toda la noche a 42 °C para obtener un hidrolizado de linfocitos.

Purificación del DNA

El DNA se purificó de la siguiente manera:

Al hidrolizado obtenido en el paso anterior se agregaron 2 ml de fenol saturado, la mezcla se agitó suavemente por 10 minutos y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm, después la fase superior se paso a un tubo limpio sin

tocar la interfase y se repitió una vez más el paso anterior. La fase superior se pasó a un tubo limpio y se agregaron 1 ml de fenol saturado y 1 ml de cloroformo, se agitó suavemente y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm, la fase superior se transfirió a un tubo limpio sin tocar la interfase y se repitió el paso anterior por segunda vez y se agregaron 2 ml de cloroformo/isoamílico (24:1), se agitó suavemente y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm. La fase superior se colocó en un tubo limpio y se le agregaron 90 μ l de NaCl 1 M y 3 ml de etanol absoluto a -20 °C.

Se agitó suavemente hasta que el DNA precipitara y se le extrajo de la solución con una pipeta Pasteur sellada. Se secó por unos minutos a temperatura ambiente, se enjuagó en etanol a -20 °C, se dejó secar a temperatura ambiente una vez más y se resuspendió en 200 μ l de agua destilada estéril.

Cuantificación del DNA

Para cuantificarlo se diluyó 1 μ l de la muestra de DNA en 250 μ l de agua estéril y se registró la densidad óptica a una longitud de onda (λ) de 260 nm, el dato así obtenido se aplicó en la siguiente fórmula (Maniatis y Sambrook, 1989):

$$(D.O) (F) (dil) = [DNA] \mu g/\mu l$$

Donde :

D.O.₂₆₀ = densidad óptica a una λ de 260 nm

F = constante equivalente a 0.05 (50 ng de DNA = 1 D.O.₂₆₀)

dil = volumen de dilución equivalente a 250 μ l

Evaluación de la integridad del DNA

Después de la extracción del DNA se comprobó su integridad por medio de una electroforesis para lo cual se mezcló 1µl de muestra con 2µl de colorante azul de bromofenol-xilencianol (0.05% : 0.05%) y 5µl de agua estéril y se corrió en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio por 20 minutos a 100 volts. En todos los casos se consideró como DNA íntegro aquel que se encontraba formando una banda gruesa y nitida localizada por arriba de la posición del fragmento de mayor tamaño del marcador de pesos moleculares.

A la vez que se cuantificó y confirmó la integridad del DNA, se sintetizaron los oligonucleótidos iniciadores para la amplificación de los exones 2,3,4,5,7 y 8 del gen RB1 de acuerdo con las secuencias diseñadas por Blanquet y cols (1995) siguiendo el procedimiento propuesto por Pharmacia LKB (1991).

Síntesis de Oligonucleótidos

La síntesis de oligonucleótidos es un acoplamiento cíclico de monómeros (A,T,G,C), para obtener un multímero de una longitud y una secuencia previamente determinada. Cada síntesis comprende una serie de ciclos, en cada uno de los cuales se agrega un nucleótido a la cadena en crecimiento (Pharmacia LKB). La reacción consta de cuatro pasos principales, y se desarrolla sobre un polímero inerte (soporte sólido) en el cual se ensambla el oligonucleótido mediante una adhesión sucesiva de nucleótidos libres; el primer 3' nucleósido (A, C, T o G) se ancla a este soporte mediante un puente de succinato, el proceso se inicia lavando el soporte sólido que contiene el monómero inicial con dicloroetano y después se suceden en forma continua los siguientes pasos (*Fig. 12*):

- 1.- Desprotección del grupo 5-hidroxilo de la unidad terminal 2-desoxirribosa, removiendo el grupo 4,4'-dimetiltritol (DMTr) con dicloroetano, después se eliminan los residuos de agua con acetonitrilo.
- 2.- Acoplamiento: formación de un puente 3'-5' internucleotídico con el grupo fosfato del deoxirribonucleótido siguiente.
- 3.- Bloqueo: se bloquean los grupos hidroxilo sin reaccionar para garantizar que sólo se polimerice la secuencia correcta en los ciclos siguientes.
- 4.- Oxidación: se oxida el puente de triéster fosfato y se detiene la reacción.

Cada síntesis comprende una serie de ciclos en cada uno de los cuales, se agrega un nucleótido a la cadena en crecimiento, básicamente se compone de las siguientes reacciones químicas orgánicas:

Bloqueo: de grupos hidroxilo sin reaccionar para evitar la acumulación de secuencias equivocadas.

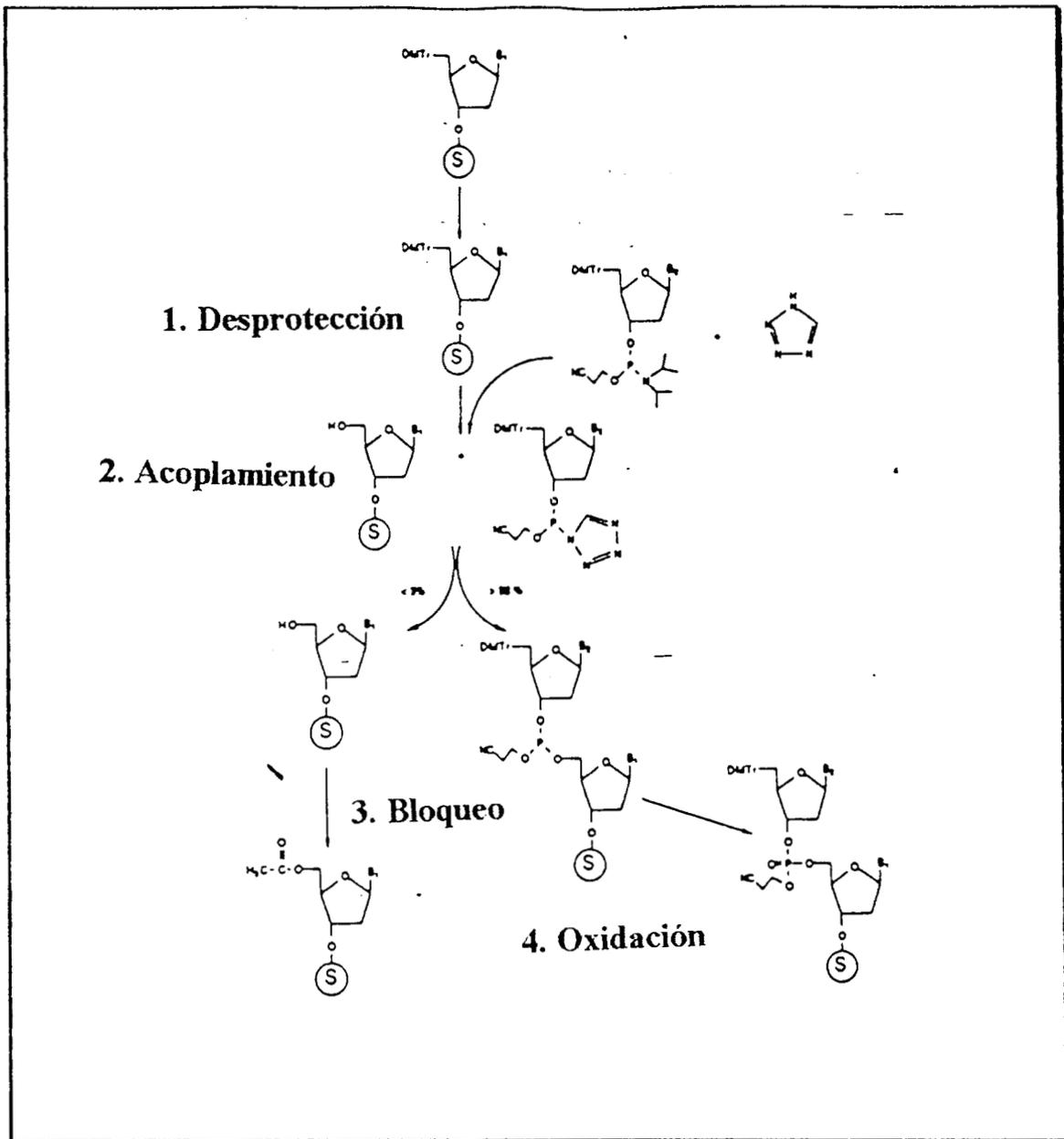
Corte: Eliminación del oligonucleótido sintetizado del soporte sólido en un proceso postsíntesis.

Acoplamiento: Reacción de condensación entre los nucleótidos.

Desprotección: Eliminación de los grupos de protección del oligonucleótido con amonio en un proceso postsíntesis.

Oxidación: Oxidación del triéster fosfito a triéster fosfato para detener el ciclo de reacción.

Purificación: Empleo de columnas de intercambio iónico o de sephadex para remover subproductos del oligonucleótido sintetizado.



(Pharmacia LKB, 1991)

Figura 12.- Síntesis de oligonucleótidos. Este proceso se repite hasta que la secuencia de nucleótidos requerida ha sido sintetizada. La síntesis de oligonucleótidos es básicamente una condensación entre el grupo 5'-hidroxilo de un nucleótido con el grupo 3' fosfato de un segundo nucleótido.

Secuencia de los oligonucleótidos utilizados

Las secuencias de los oligonucleótidos sintetizados fueron las siguientes:

Exón	Secuencia de Oligonucleótidos	Amplificado (pb)
2	R 5'TTGATTTATAAGTATAGCC 3' F 5'TTTTGTATAGTGATTTCGC 3'	247
3	R 5' CAGTTTTAACATAGTATCCA 3' F 5' ATACACTTTCATAACGGCTC 3'	397
4	R 5' AGTAGTGATTTGATGTAGAG 3' F 5' TGAGCTAACATTAAGGGA 3'	411
5	R 5' CTACTATGACTTCTAAATTCG 3' F 5' CAAGATGTTTGAGATTATTCC 3'	200
7	R 5' CCTGCGATTTTCTCTCATAC 3' F 5' GCAACTGCTGAATGAGAAAG 3'	226
8	R 5' ATTTTATATGATGGATGTAC 3' F 5' ATCTAAATCTACTTAACTG 3'	243

Los oligonucleótidos utilizados para la PCR fueron diseñados de acuerdo con las secuencias de las cadenas sencillas que flanquean los extremos de los exones del gen RB1 por lo que con ellos pueden analizarse tanto los sitios de unión intrón-exón como toda la secuencia codificadora de cada uno de los exones (Blanquet, 1993).

Amplificación por PCR

Para la estandarización de éste procedimiento se probaron diversas concentraciones de los diferentes reactivos utilizados como: Mg, Ca, oligonucleótidos, DNA, así como temperaturas y número de ciclos. En la *Tabla 2* se indican las condiciones que resultaron óptimas para la amplificación de los diferentes exones.

El proceso de amplificación automático que se diseñó para éste estudio es el siguiente:

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
a)	94°C	2 min	1
a)	94°C	20 seg.	30
b)	55°C	20 seg.	
c)	72°C	30 seg.	
a)	94°C	12 seg.	1
b)	65°C	20 seg.	
c)	72°C	7 min.	
d)	4°C	Indefinido	

- a) Etapa de desnaturalización
- b) Etapa de alineación
- c) Etapa de polimerización
- d) Terminación

Después de concluída la amplificación, ésta se verificó colocando 1µl del amplificado en un gel de agarosa al 2.5% con bromuro de etidio y se sometió a electroforesis a 85 V durante 1 h. Posteriormente se observó el DNA en un transiluminador de luz U.V. sobre el cual se tomó la fotografía correspondiente.

TABLA 2.- CONDICIONES PARA PCR

Reactivo	Volúmen	[Stock]	[Final]
H ₂ O	13.97 μ l		
Buffer taq.	2.70 μ l	10 X	1 X
ATGC	0.55 μ l	10 mM*	1.0 mM*
Oligonucleótido F	0.89 μ l	100 ng/ μ l	3.5 ng/ μ l
Oligonucleótido R	0.89 μ l	100 ng/ μ l	3.5 ng/ μ l
Taq Polimerasa Stoffel	1.00 μ l	10 U/ μ l	2.0 U/ μ l
MgCl ₂	4.00 μ l	25 mM	4.0 mM
<u>DNA</u>	100.00 ng/ μ l		
Volumen final	25.00 μ l		

* la concentración es de 10 mM por cada una de las bases

Análisis del polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP).

Procedimiento

Para detectar las mutaciones por SSCP, los amplificados obtenidos se reamplificaron nuevamente con el mismo programa de PCR, pero ésta vez en presencia de [α - 32 P]dCTP tal como se indica en la *Tabla 3*. Posteriormente los amplificados obtenidos en ésta reacción se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizante como se indica a continuación.

Electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizante

Una vez concluída la PCR en presencia de [α - 32 P]dCTP, se mezcló 1.5 μ l del amplificado con 9 μ l de colorante xilen cianol- azul de bromo fenol y se incubó por 10 minutos a 95 °C para desnaturizar el DNA. Inmediatamente después se colocó la mezcla en hielo frappé por 5 minutos y finalmente se colocaron 3 μ l de cada muestra en un gel de poliacrilamida por 19 h a 150 V en buffer TBE 1 X.

Autorradiografía

Después de transcurrido éste tiempo se colocó el gel en papel filtro y se cubrió con una película de Egapack, se secó a 80 °C en un sistema de vacío por 1 h y se montó en un cassette de fotoexposición con dos placas Kodak O-matic. Las placas se revelaron en tiempos de 12 y 24 horas para poder ver la señal radioactiva que quedó impresa en las autorradiografías.

TABLA 3.- CONDICIONES PARA SSCP

Reactivo	Volumen	[Stock]	[Final]
H ₂ O	4.00 µl		
Buffer	1.00 µl	10 X	1 X
ATGC	0.40 µl	10 mM*	1.00 mM*
Oligonucleótido R	0.50 µl	100 ng/µl	5.0 ng/µl
Oligonucleótido F	0.50 µl	100 ng/µl	5.0 ng/µl
Taq Polimerasa Stoffel	1.00 µl	10 U/µl	2.00 u/µl
MgCl ₂	1.50 µl	25 mM	3.80 mM
[α- ³² P]dCTP	0.10 µl	2 mM	0.02 mM
<u>DNA amplificado</u>	<u>1.00 µl</u>		
Volumen final	10.00 µl		

* la concentración es de 10 mM por cada una de las bases

Densitometría

La densitometría se aplicó para analizar la intensidad de la señal radioactiva de las bandas del patrón electroforético en aquellos pacientes que presentaron alteraciones en el SSCP sugestivos de ser portadores de una deleción. Para ello se colocaron las placas de autorradiografías obtenidas en el paso anterior en un densitómetro (Cliniscan 2), el cual mide la intensidad de las bandas en función de la cantidad de luz que puede atravesar por la zona de la autorradiografía donde se imprimió la radioactividad incorporada en el producto amplificado. Los datos se registraron en forma gráfica empleando como unidad el porcentaje de transmitancia de luz.

Secuenciación por terminación de cadenas

222480

Para secuenciar el DNA es necesario primero purificar los productos de PCR antes de someterlos a la reacción de secuenciación con el fin de evitar la presencia de contaminantes que pueden inhibir la acción de los reactivos implicados en el procedimiento y eliminar subproductos generados en la PCR que pudiesen alterar la secuencia del DNA que se quiere analizar.

Purificación de productos de PCR para secuenciación.

- 1.- 50 μ l del producto de PCR se mezclaron con 500 μ l de buffer PB y la solución obtenida se colocó en una columna con un sustrato de alta afinidad por el DNA.
- 2.- La columna se colocó en una camisa especial y se centrifugó 60 seg a máxima velocidad en una micro centrífuga a 4 °C

3.- El DNA se adhirió al sustrato de la columna y el eluido obtenido en la camisa de la columna se desechó.

4.- 750 μ l de buffer PE se agregaron a la columna y se centrifugo 60 seg como en el paso 2, el eluido obtenido se desechó.

5.- La columna se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 μ l esteril y el DNA se recuperó de la columna después de colocar en ésta 50 μ l de agua bidestilada esteril seguido de una centrifugación a máxima velocidad durante 60 seg.

Reacción de secuenciación

La reacción de secuenciación se realizó con enzima diluida con pirofosfatasa y glicerol.

Protocolo para secuenciar una sola muestra:

1.- Se colocaron 2.5 μ l de cada didesoxinucleótido de terminación un un tubo (un tubo por cada didesoxinucleótido) y se incubaron a 37 °C.

2.- En otro tubo se preparó la mezcla de alineamiento del oligonucleótido de iniciación con los siguientes reactivos:

DNA amplificado	7	μ l
H ₂ O	2	μ l
Oligonucleótido	1	μ l
<hr/>		
Total	10	μ l

La mezcla anterior se incubó a 94 °C por 3 minutos e inmediatamente se colocó en un contenedor con hielo.

3.-En el tubo del paso dos se colocaron los siguientes reactivos, y se incubaron a temperatura ambiente 10 minutos:

Mezcla de alineamiento paso 2	10.0 μ l
DTT	1.0 μ l
mezcla de nucleótidos	2.0 μ l
α - ³⁵ SdTPP	0.5 μ l
Sequenace	1.0 μ l
<hr/>	
V. final	14.5 μ l

Reacción de terminación

4.- Se colocaron 4 μ l de la reacción anterior a cada uno de los tubos del paso uno, se mezclaron y se incubaron 5 minutos a 37°C

5.- Se paró la reacción del paso cuatro agregando 4 μ l de solución stop a cada uno de los tubos y se incubaron nuevamente a 75 °C por 2 minutos.

6.- Finalmente se colocaron 3 μ l en cada línea del gel para secuenciación y se corrieron las muestras a 600 V durante 12 h. Transcurrido éste tiempo se retiró el gel de la misma manera que con los geles de SSCP y se fijó con ácido acético glacial por 15 minutos para retirar el exceso de urea y glicerol contenidos en el gel, después se eliminó el ácido acético con un poco de agua y se secó el gel de la misma manera que los geles de SSCP, se colocaron dos placas para autorradiografía y se revelaron a las 72 h.

RESULTADOS

Hallazgos clínicos

En éste trabajo se estudiaron 60 pacientes con RB de los cuales, el 46.7% (28) presentéron RB unilateral y 53.3% (32) presentáron la forma bilateral, en todos los casos fue necesaria la enucleación de por lo menos un ojo. El principal motivo de la consulta fue la leucocoria en el 95% de los casos; y estrabismo en un 5% (*Tabla 4*). En todos los casos la edad de inicio del tumor fue antes de los 5 años de edad. En la mayoría de los niños con RB bilateral éste se manifestó antes de los seis meses de edad, y el 57.0% de los pacientes con RB unilateral presentaron el padecimiento antes del año de edad (*Tabla 5*).

Neoplasias asociadas con RB en los pacientes estudiados

De los 60 pacientes analizados en este trabajo se encontraron cuatro casos con RB bilateral y un caso unilateral que presentaron osteosarcoma y en todos los casos se manifestó en etapas posteriores a la enucleación del primer ojo y aún después del tratamiento con quimio y radioterapia para el tratamiento del segundo ojo. Por otro lado se encontraron trece casos con RB bilateral y uno con RB unilateral con antecedentes familiares de retinoblastoma.

Población de estudio

De los 60 pacientes analizádos 28 padecen RB unilateral y 32 RB bilateral; de los 28 con RB unilateral 13 son hombres y 15 son mujeres; mientras que de los 32 casos con RB bilateral, 20 son hombres y 12 son mujeres. De acuerdo con el análisis del pedigree se encontraron 7 casos de **no penetrancia** (el 11.6 % de la población estudiada) donde uno de los padres del paciente tiene la mutación en el gen RB1 pero es clínicamente sano (*Tabla 6*).

**TABLA 4.-DATOS OCULARES EN PACIENTES CON
RETINOBLASTOMA**

Signos	Motivo de la Consulta		
	RB Unilateral N°	RB Bilateral N°	(%)
Leucocoria	26	31	95
Estrabismo	2	1	5
Otros	0	0	0
Total	28	32	100

TABLA 5.- EDAD DE INICIO DEL PADECIMIENTO

Edad de inicio	RB Unilateral	RB Bilateral	(%)
0 - 6 m	8	21	48.4
7 - 12 m	8	6	23.3
13 m - 5 a	12	5	28.3
> 5 a	0	0	0.0
Total	28	32	100

m = meses, a = años

TABLA 6.-POBLACION DE ESTUDIO

Pacientes	Muestras	Unilateral		Bilateral	No penetrancia
		Izquierdo	Derecho		
Hombres	33	4	9	20	2
Mujeres	27	6	9	12	5
TOTAL	60	10	18	32	7

Formación del banco de DNA

Se creó un banco de DNA de todos los pacientes y de sus familiares de primer grado sumando un total de 136 individuos (*Tabla 7*).

El DNA se obtuvo a partir de sangre periférica por el método descrito en la metodología, en todos los casos la concentración del DNA fue mayor de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y se consideró como criterio de pureza el cociente mayor a 1.6 obtenido al dividir la densidad óptica (D.O.) con λ de 240 nm que detecta el fenol contaminante y de 280 nm correspondiente a las proteínas. En todos los casos la integridad del DNA valorada en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio presentó un patrón óptimo de integridad observándose una sola banda de alto peso molecular, gruesa y nítida (*Fig. 13*).

DETECCION DE MUTACIONES POR PCR Y SSCP.

Amplificación por PCR

El producto obtenido de la amplificación de cada exón corresponde al registrado en la literatura, en las *figuras 14 y 15* se ejemplifica el resultado obtenido en la amplificación de los exones 5 y 7. El análisis de los pacientes mostró que los fragmentos obtenidos por la PCR fueron del tamaño esperado y no presentaron variaciones en la migración ni bandas accesorias, por lo tanto se procedió a detectar mutaciones por la técnica de SSCP.

TABLA 7.-BANCO DE DNA

DNA de pacientes	60
DNA de familiares 1 ^{er} grado	76 *
<hr/>	
TOTAL	136

* Se obtuvo la muestra de los familiares de primer grado que acudieron al INP.

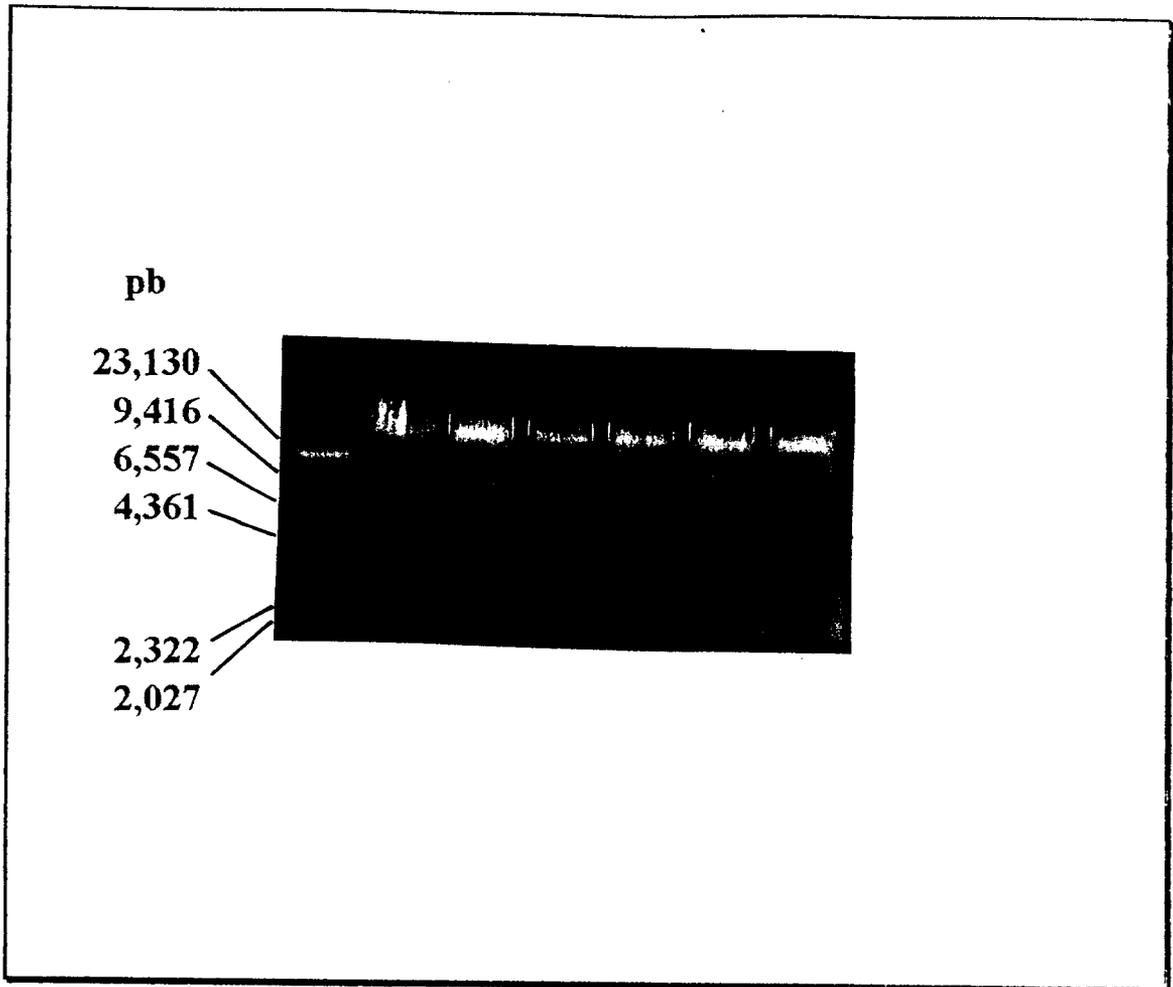


Figura 13.- Integridad del DNA. Carril 1: marcador de pesos moleculares λ Hind III; carriles 2 al 7 DNA integro el cual se encuentra concentrado en una sola banda gruesa y nítida por arriba del fragmento de mayor tamaño del marcador de pesos moleculares.

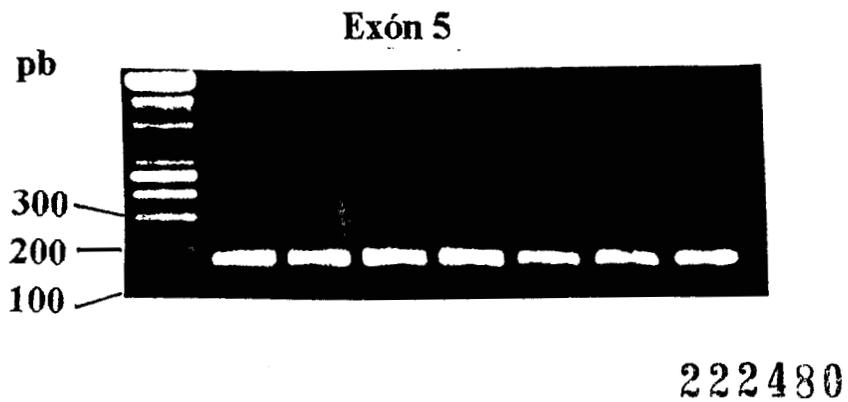


Figura 14.- Amplificación del exón 5. Se muestran siete casos con RB bilateral. Carril 1: marcador de peso molecular ladder; carril 2: RB103; carril 3: RB115; carril 4.- RB505; carril 5: RB506; carril 6: RB310; carril 7: RB380.

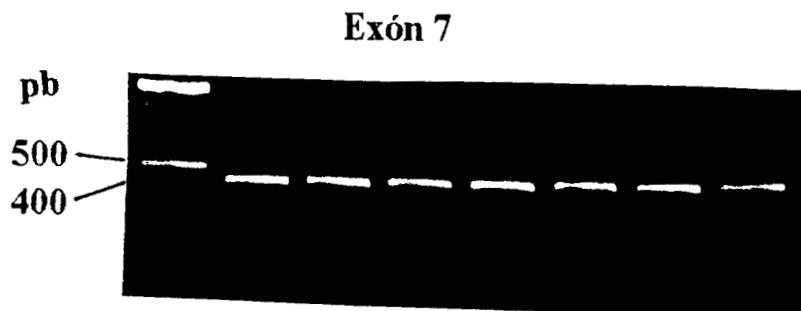


Figura 15.- Amplificación del exón 7. Se muestran siete casos con RB unilateral. Carril 1: marcador de peso molecular ladder; carril 2: RB85; carril 3: RB470; carril 4: RB405; carril 5: RB408; carril 6: RB28; carril 7: RB412.

Patrones electroforéticos normales de SSCP para los exones 3,4 y 5 del gen RB1.

En las *Figuras 16 - 18* se muestra un grupo de casos índice todos ellos con patrones electroforéticos normales de SSCP correspondientes a los exones 3, 4 y 5 respectivamente donde se puede observar que cada exón tiene un patrón electroforético único determinado por la secuencia de bases que lo constituyen.

Patrones electroforéticos anormales en pacientes con RB

Se analizaron 32 casos con RB bilateral (*Tabla 8*) y 28 con RB unilateral (*Tabla 9*). En este análisis se encontraron dos pacientes con alteración en el exón 3: uno con RB bilateral (RB272) (*Fig. 19*) y uno con RB unilateral (RB351) (*Fig. 20*); 6 pacientes con alteraciones en el exón 4: de estos 4 con RB unilateral (RB175, RB28, RB289, RB333) y 2 con RB bilateral (RB267 y RB242) (*Figs. 21 - 25*), y 2 pacientes con alteraciones en el exón 5 ambos con RB bilateral (RB164 y EB115) (*Fig. 25 y 26*).

Es importante resaltar que el paciente RB289 (*Fig. 22*) no presentó bandas accesorias, sin embargo una de ellas fue de menor intensidad. El análisis densitométrico del patrón electroforético de este paciente (*Fig. 27*) se comparó con el del paciente RB28 que presentó una banda accesoria en la fracción 2 (*Fig. 28*) y con el de un control normal (*Fig. 29*). De estas 3 muestras se analizaron las 4 bandas que constituyen el patrón de SSCP para el exón 4 y se calculó el valor de cada una de las curvas obtenidas.

El análisis comparativo de las fracciones mostró que tanto el control normal como el paciente RB28 no presentaron diferencias significativas entre cada uno de los valores obtenidos de sus 4 fracciones,

correspondiéndoles un valor de 39.6% a la fracción 4 del control y de 41.7% a la del caso RB28. Sin embargo contrastaron notablemente con el 14.9% de la fracción 4 del paciente RB289. Este hallazgo parece ser el resultado de una deleción, por lo que es posible que sólo se conserve la mitad de la dosis génica en este exón.

El análisis densitométrico del paciente RB28 se presentó un desplazamiento de la fracción 2, producto de la presencia de la banda aberrante (*Fig. 22*).

Figura 21.- Casos RB175 y RB267. Carril 1: control de DNA de un individuo normal; carril 2: RB175; carril 3: RB267; las flechas señalan dos bandas extra que se encontraron en el paciente RB175 que pueden ser el resultado de una estructura heteroduplex y una banda extra en el paciente RB267, ambos en el exón 4.

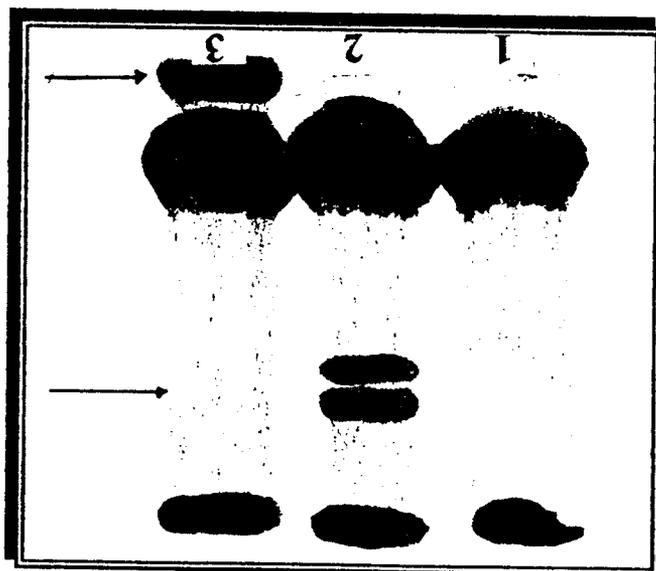
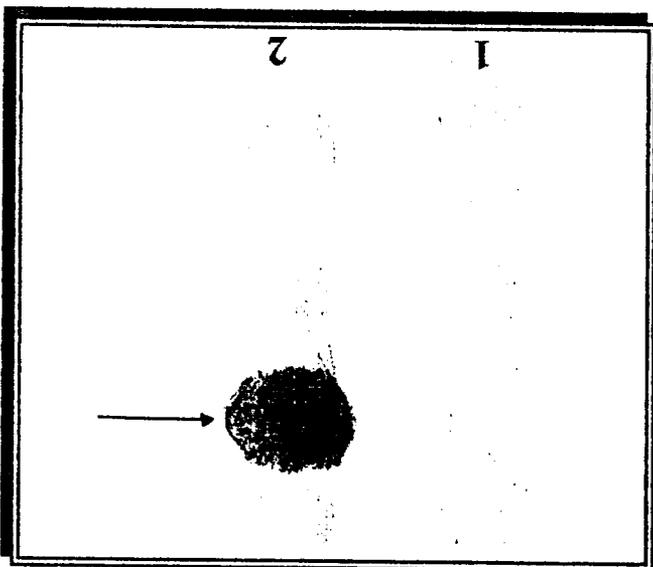


Figura 20.- Caso RB351. Carril 1: control de DNA de un individuo normal; carril 2: RB351; la flecha indica una banda anormal en el exón 3 de este paciente.



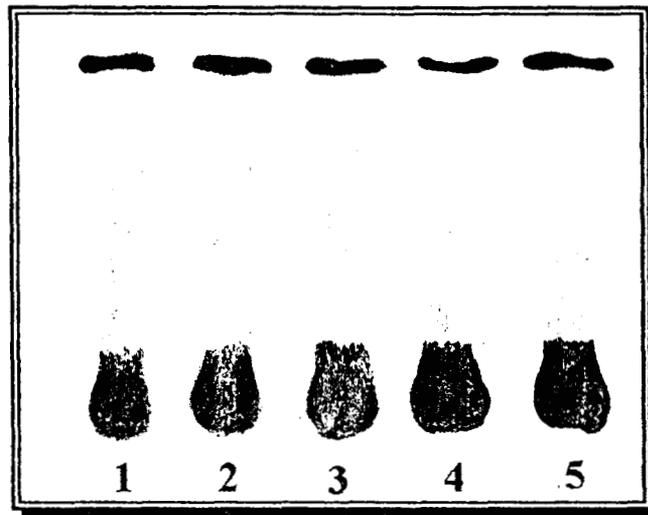


Figura 16.- Patrón normal de SSCP para el exón 3. Se muestra un grupo de pacientes afectados con RB. Carril 1: control de DNA de un individuo normal; carril 2: RB85; carril 3: RB402; carril 4: RB405; carril 5: RB408.

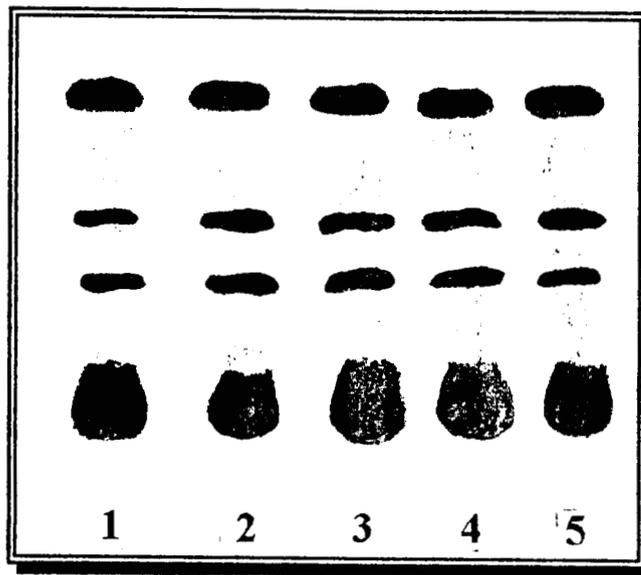


Figura 17.- Patrón normal de SSCP para el exón 4. Se muestra un grupo de pacientes afectados con RB. Carril 1: control de DNA de un individuo normal; carril 2: RB133; carril 3: RB341; carril 4: RB351; carril 5: RB133.

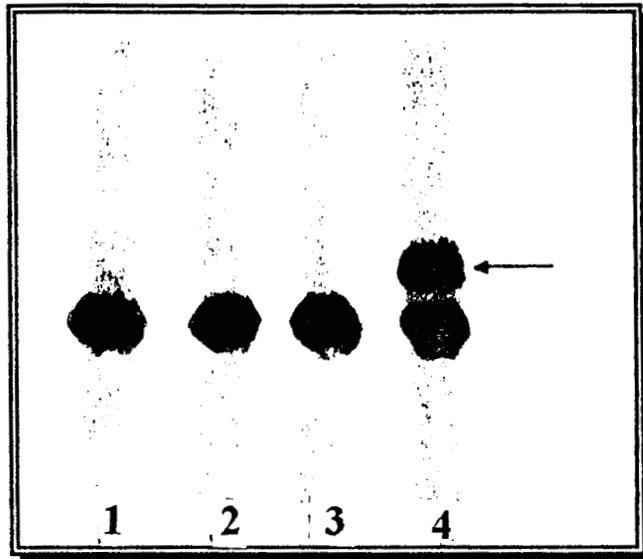


Figura 19.- Caso RB272. Carril 1: control; carril 2: RB320; carril 3: RB164; carril 4: RB272. La flecha indica la presencia de una banda extra en el patrón de SSCP del exón 3.

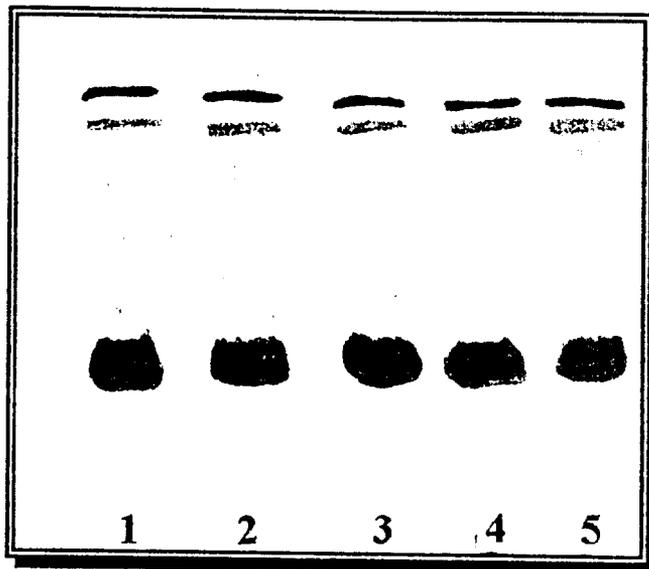


Figura 18.- Patrón normal de SSCP del exón 5. Se muestra un grupo de pacientes afectados con RB. Carril 1: control de DNA de un individuo normal; carril 2: RB310; carril 3: RB133; carril 4: RB325; carril 5: RB341.

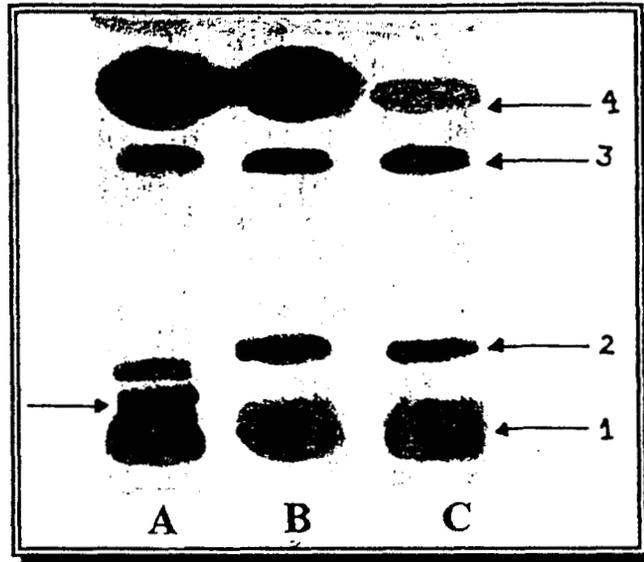


Figura 22.- Casos RB289 y RB28. Carril A: RB28; carril B: control de DNA de un individuo normal; carril C: RB289 con una clara diferencia en la intensidad de la señal en la fracción 4; la flecha de la izquierda indica la presencia de una banda extra en la fracción 2 en el exón 4 del caso RB28 carril A.

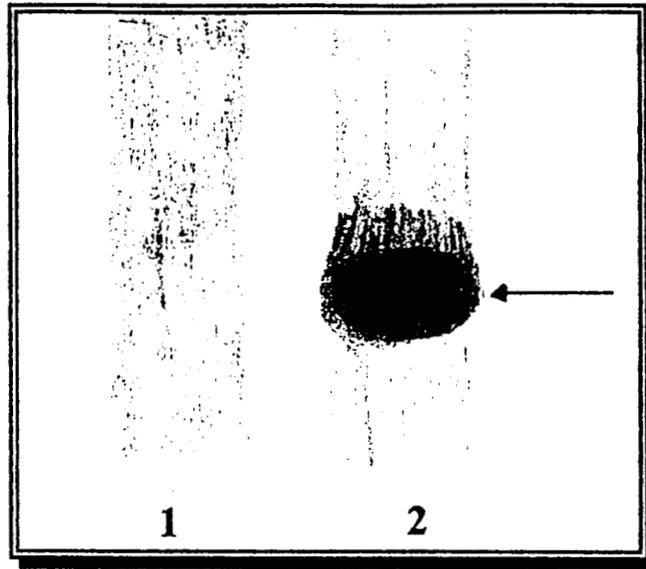


Figura 23.- Caso RB333. Carril 1: control de DNA de un individuo normal; carril 2: RB333 la flecha indica una banda extra en el exón 4 de este paciente.

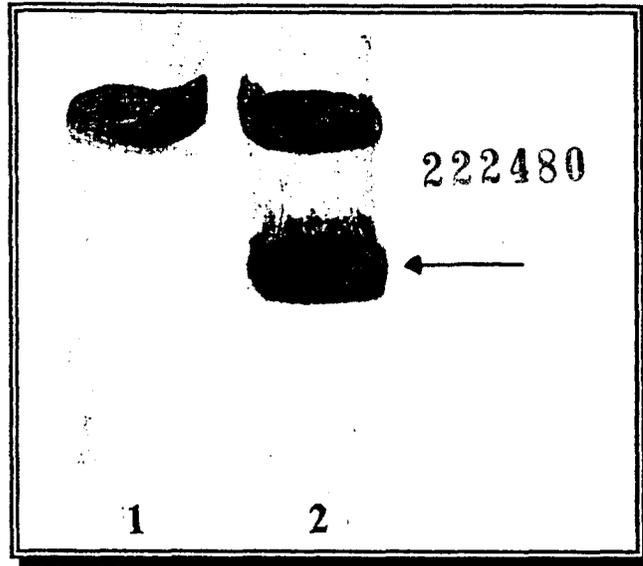


Figura 24.- Caso RB242. Carril 1: control de DNA de un individuo normal; carril 2: RB242; la flecha señala una banda extra en el exón 4 del paciente RB242.

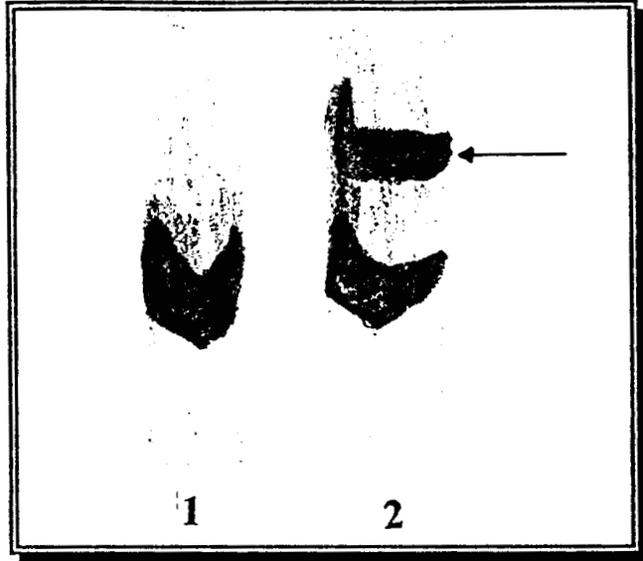


Figura 25.- Caso RB164. Carril 1: control de DNA de un individuo normal; carril 2: RB164; la flecha indica la presencia de una banda extra en el exón 5 de este paciente.

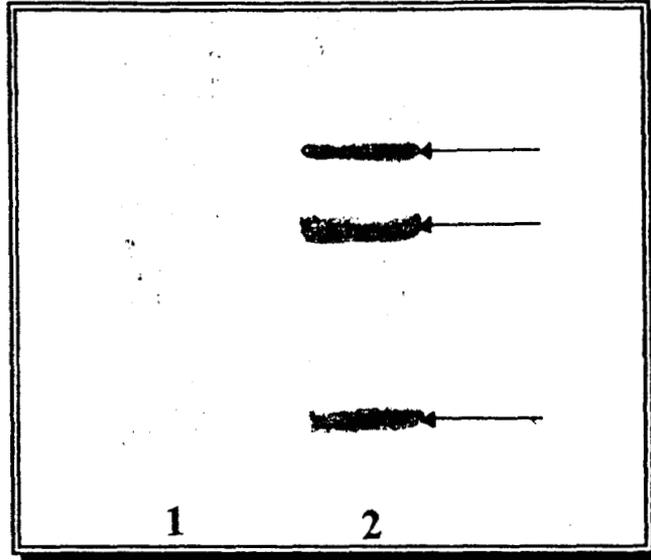


Figura. 26.- Caso RB115. Carril 1: control de DNA de un individuo normal; carril 2: RB115; las flechas indican la presencia de tres bandas extra en el exón 5 de este paciente.

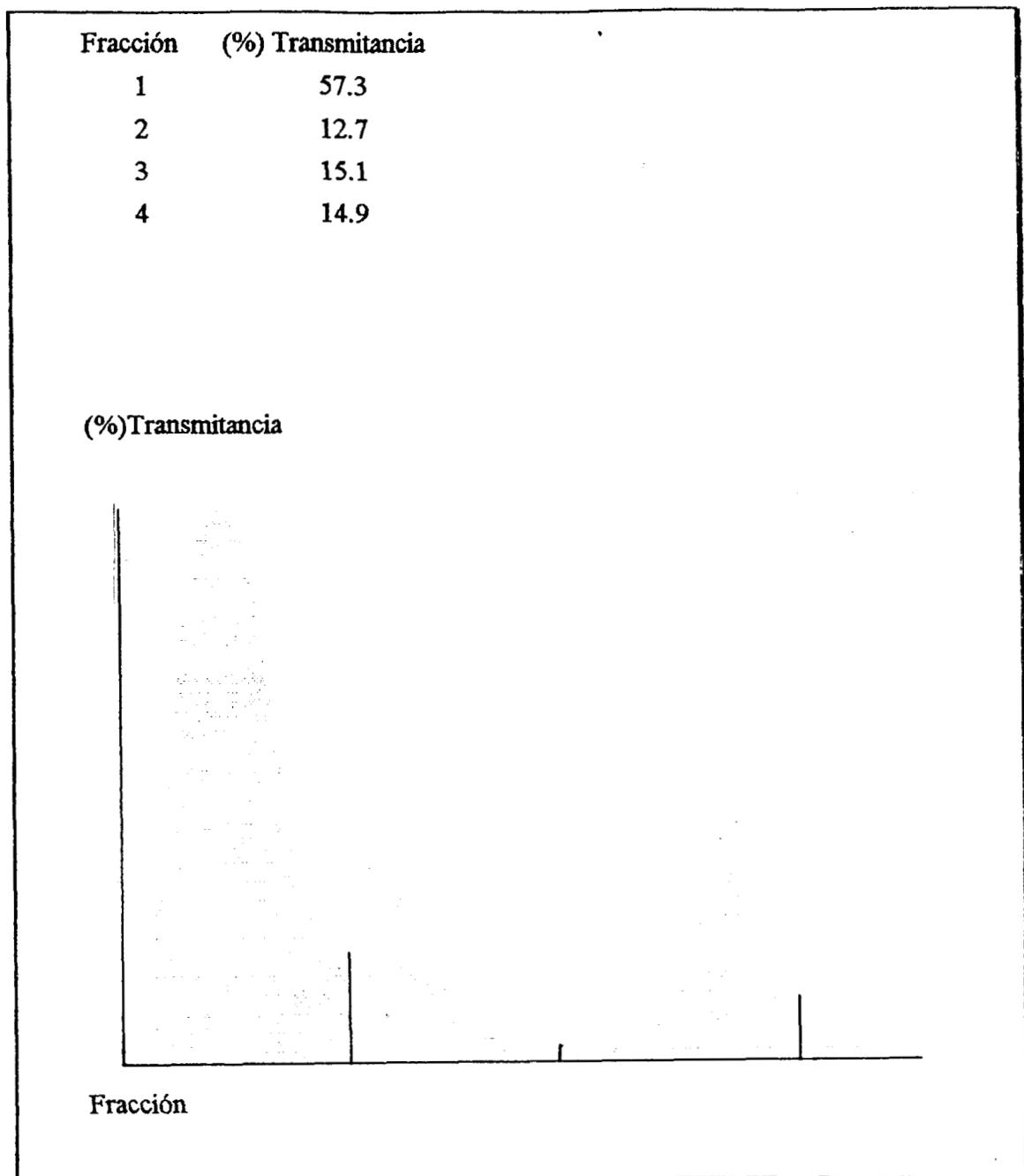


Figura 27.- Densitometría del caso RB289. Se muestran las curvas correspondientes a cada una de las cuatro fracciones que constituyen el patrón de SSCP en el análisis del exón 4. Nótese que existe relación entre el porcentaje de transmitancia, la forma de la curva y la intensidad de la señal radioactiva observable en el carril C de la figura 22. Compárese la fracción 4 del paciente RB289 con los datos correspondientes a la misma fracción del caso RB28 y del control en las figuras 28 y 29.

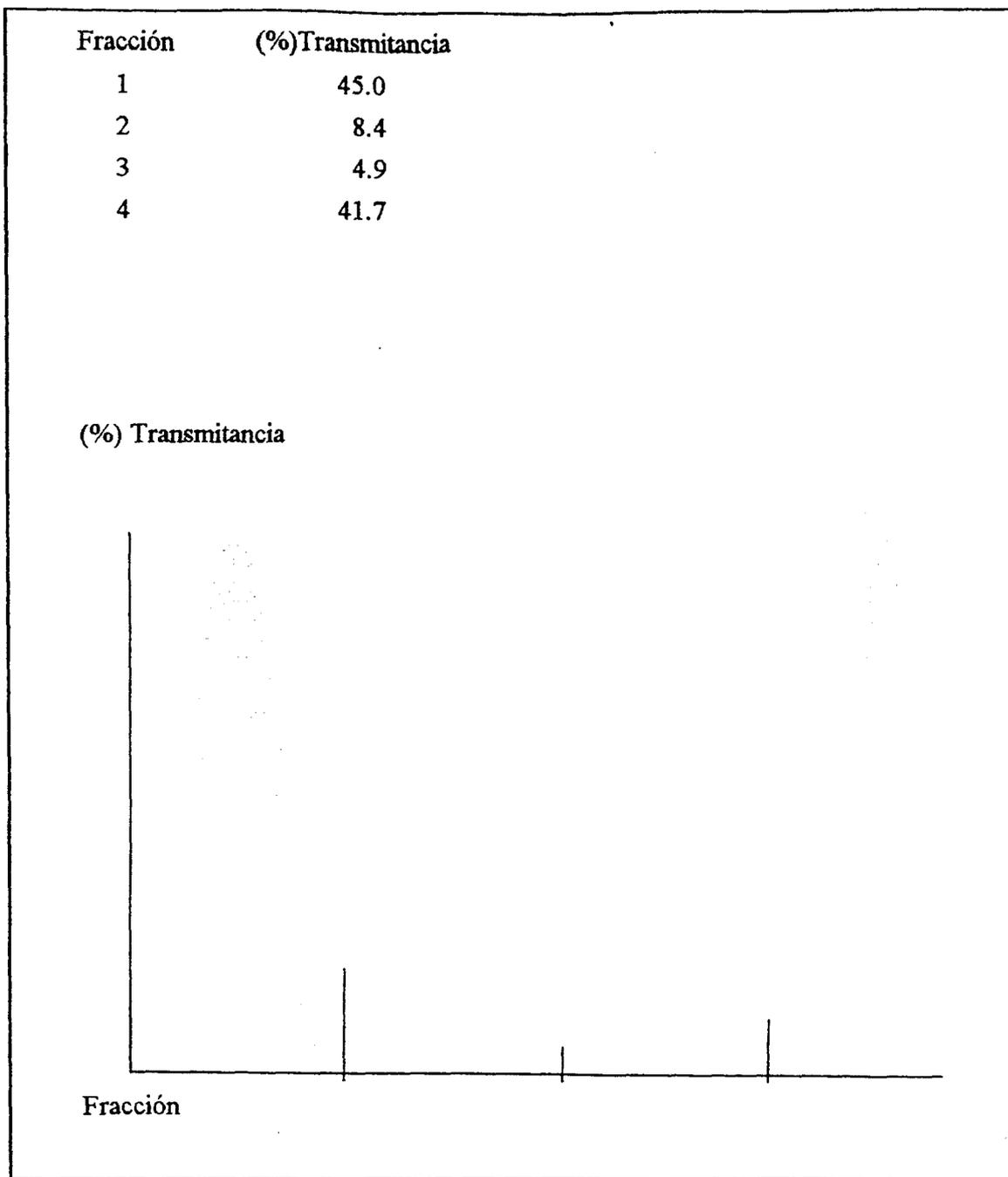


Figura 28.- Densitometría del caso RB28. Se muestran las curvas correspondientes a cada una de las cuatro fracciones que constituyen el patrón de SSCP en el análisis del exón 4. Nótese la relación que existe entre el porcentaje de transmitancia, la forma de la curva y la intensidad de la señal radioactiva observable en el carril A de la figura 22.

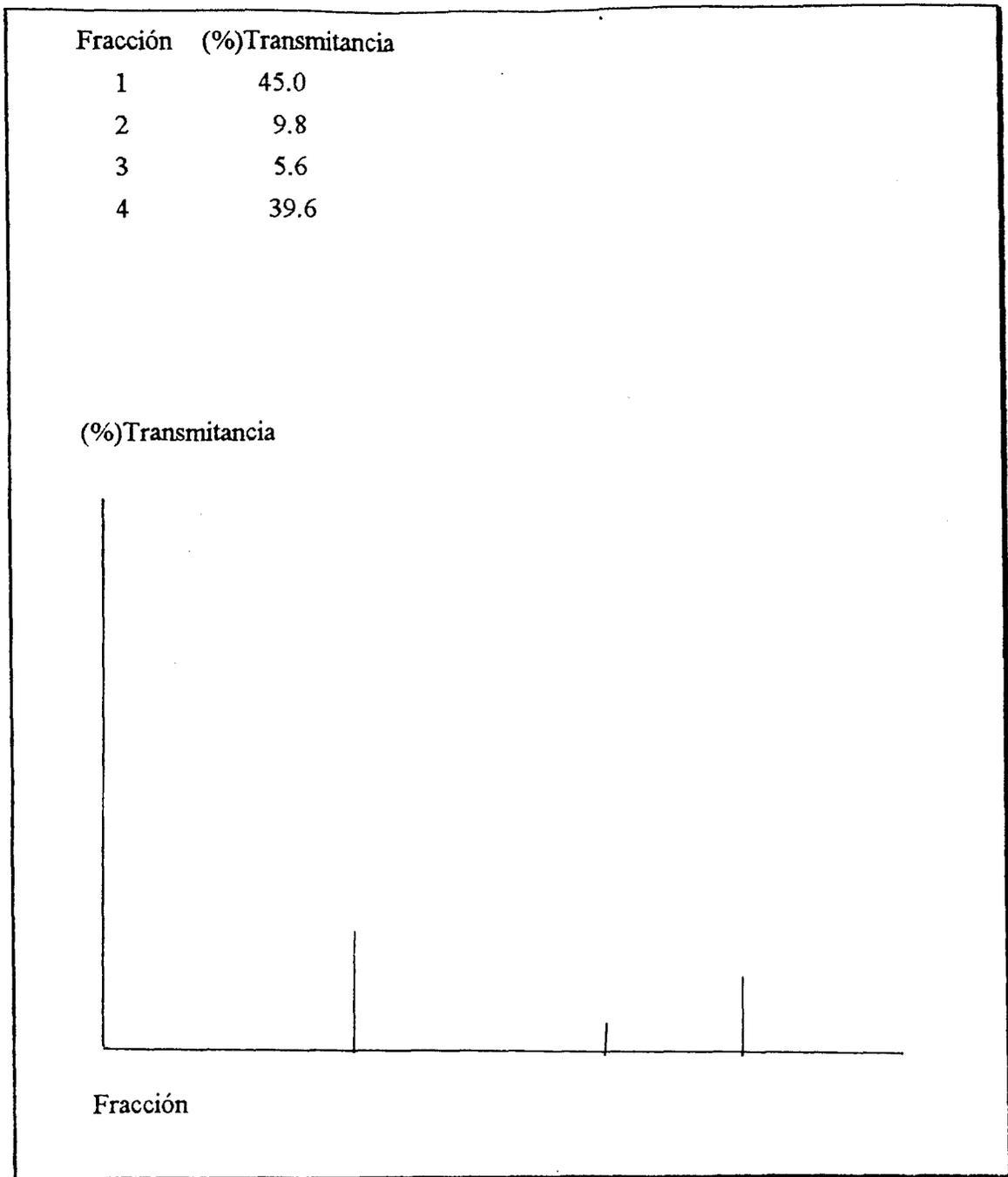


Figura 29- Densitometría del control. Se muestran las curvas correspondientes a cada una de las cuatro fracciones que constituyen el patrón de SSCP. Nótese la relación que existe entre el porcentaje de transmitancia, la forma de la curva y la intensidad de la señal radioactiva observable en el carril B de la figura 22.

TABLA 9.- POBLACION AFECTADA CON RB UNILATERAL

Muestra	Sexo	Localización	E. inicio (meses)	Signo	AHF	Neplasias Asoc	Exones analizados	Mutados
260	F	Izq	20	L			3,4,5	
303	F	Izq	1	L			3,4,5,8	
333	F	Izq	48	L	*	Osteosarcoma	3,4,5,8	4
341	F	Der	1	L			3,4,5,8	
351	F	Der	9	L			3,4,5	3
175	F	Der	3	L			3,4,5	4
189	F	Izq	12	L			3,4,5	
402	F	Der	33	L			3,4,5,8	
405	F	Der	33	L			3,4,5	
418	F	Der	24	L			3,4,5,8	
427	F	Izq	24	L			3,4,5	
263	F	Der	2	L			3,5,7,8	
496	F	Der	24	L			2,3,4,5	
354	M	Der	3	L			2,3,5,7,8	
470	F	Izq	12	L			2,3,5,7,8	
133	M	Der	12	E			3,4,5,8	
325	M	Der	8	L			2,3,4,5,8	
289	M	Der	3	L			3,4,5	4
28	M	Der	24	L			3,4,5	4
85	M	Der	8	L			2,3,4,5,8	
408	M	Der	42	L			3,4,5,8	
412	M	Izq	2	L			3,4,5,8	
415	M	Izq	24	L			3,4,5,8	
467	F	Der	24	E			2,3,7,8	
474	M	Izq	12	L			2,3,7,8	
502	M	Der	48	L			2,3,5,7,8	
488	M	Der	5	L			2,3,5,7,8	
215	M	Izq	8	L			3,5,7,8	

L : Leucocoria

E: Estrabismo

AHF : Antecedentes heredofamiliares

TABLA 8.- POBLACION AFECTADA CON RB BILATERAL

Muestra	Sexo	E. Inicio (meses)	Signo	AHF	Neoplasias Asoc	Exones analizados	Mutados
103	F	1	L	*		3,4,5,8	
202	F	3	L		Osteosarcoma	3,4,5,8	
242	F	1	L	*		3,4,5,8	4
288	F	2	L	*		2,3,4,5,8	
115	M	1	L			3,4,5,8	5
319	M	48	L			2,3,4,5,8	
334	M	15	L	*		3,4,5,8	
335	F	15	L	*		3,5,7,8	
330	M	3	L		Osteosarcoma	2,3,4,5	
164	M	2	L		Osteosarcoma	3,4,5	5
272	M	28	L			3,4,5	3
267	M	3	L	*		3,4,5	4
392	M	3	L			2,3,4,5,8	
505	M	8	L	*		2,3,5,7	
506	F	12	E	*		2,5,7,8	
310	M	6	L			2,3,4,5	
512	M	4	L			2,3,7,8	
380	M	3	L		Osteosarcoma	2,3,5,7,8	
12	F	8	L	*		5,7	
367	M	2	L			2,3,7,8	
482	M	4	L	*		2,3,7,8	
485	M	3	L			2,3,4,5,8	
322	M	5	L			3,4,5	
409	F	4	L			3,4,5,8	
477	F	3	L	*		3,4,5,8	
478	F	3	L	*		2,3,4,5	
316	M	4	L	*		2,3,4,5	
238	F	12	L			3,5,7	
338	F	48	L			2,3,7,8	
509	M	12	L			2,8	
90	M	5	L			2,8	
494	M	12	L			3,4,5,8	

L : Leucocoria

E: Estrabismo

AHF : Antecedentes heredofamiliares

También se encontraron bandas de migración lenta en el patrón electroforético de los pacientes RB175 y RB115 (*Fig. 21 y 26*) que sugieren la presencia de deleciones o de inserciones pequeñas que permiten la formación de estructuras heteroduplex, las cuales son el producto de la renaturalización de una cadena normal con una mutada y que se observa en una electroforesis cuando la deleción o la inserción es mayor de 2 pb.

Búsqueda de mutaciones en los padres de pacientes afectados

Considerando que en los trastornos autosómicos dominantes los hijos tienen una probabilidad del 50 % de heredar de sus padres el gen mutante (Carnevale y Del Castillo, 1993), se analizaron las muestras disponibles de los padres de los pacientes RB267, RB289 RB272, RB115, RB164 y RB175 para determinar si tales alteraciones fueron heredadas por los padres o son mutaciones *de novo*. Este análisis sólo reveló la presencia de bandas normales en los padres con lo cual se deduce que tal alteración no fue heredada de éstos y que probablemente se trate de mutaciones *de novo*; aunque no se puede descartar la posibilidad de un mosaicismo gonadal en los padres de los pacientes.

Secuenciación de las muestras RB272, RB351 y RB164.

RB351 donde se encontró una doble sustitución de tres nucleótidos causando un cambio de los tripletes TTT *fen*, TCC *ser*, AAA *gln*, TAT *tir* por los tripletes TGA *codon de paro*, CCC *pro*, AGT *ser* y CAT *his* en la posición +56, +57, +18 y +19 del intron 3.

RB272 en el se encontró una inserción en el exón 3 de cuatro nucleótidos (GGAA) en la posición del triplete que codifica para el aminoácido 101 de la proteína pRB110.

RB164 en este paciente se encontró una sustitución en el exón 5 que cambia los tripletes ATA *Ile* y TAT *Tir* por ATG *Met* y TGG *Tip* que codifican para los aminoácidos 172 y 173 de la proteína pRB110; los resultados se muestran en las *Figuras 30 a la 32*.

Las secuencias obtenidas experimentalmente se compararon con la secuencia del gen RB1 registrada en la literatura por el grupo de McGee y Yandell, (1989).

En la *tabla 10* se resumen los resultados obtenidos en éste trabajo.

Paciente RB351 · intrón 3

5'AGA CCT AAA AGG AGA3'

3'TCT GGA TTT TCC TCT5'

Secuencia complementaria

triplete

triplete

normal

mutado

TTT *fen*

→

TGA *codon* UGA

TCC *ser*

→

CCC *pro*

posición

+56 pb intrón 3

+57 pb intrón 3

5'ATA TTT ATA TTC CGG3'

3'TAT AAA TAT AAG5'

Secuencia complementaria

triplete

triplete

normal

mutado

AAA *gln*

→

AGT *ser*

TAT *tir*

→

CAT *his*

posición

+18 pb intrón 3

+19 pb intrón 3

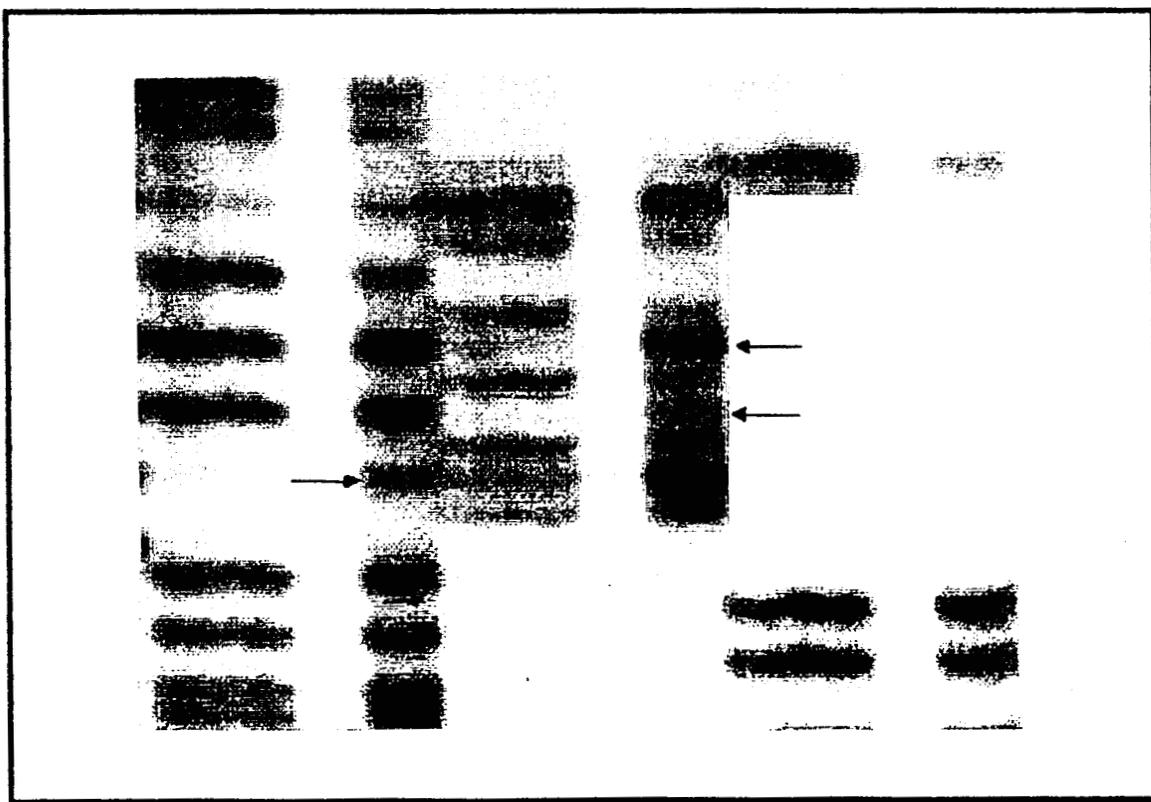


Figura 30.- Secuenciación de la muestra RB351. Las dos sustituciones que se encontraron en este paciente se localizan en el intrón 3, las flechas indican las bandas extra producto de los tripletes mutados TGA, CCC, AGT y CAT pertenecientes al alelo mutado.

Paciente RB164 exón 5

GAA CTT ATA TAT TTG ACA CAA

Secuencia normal

GAA CTT ATG TGG TTG ACA CAA

Secuencia mutante

triplete
normal

ATA *Ile*

→

triplete
mutado

ATG *Met*

posición

aminoácido 172

TAT *Tir*

→

TGG *Trp*

aminoácido 173

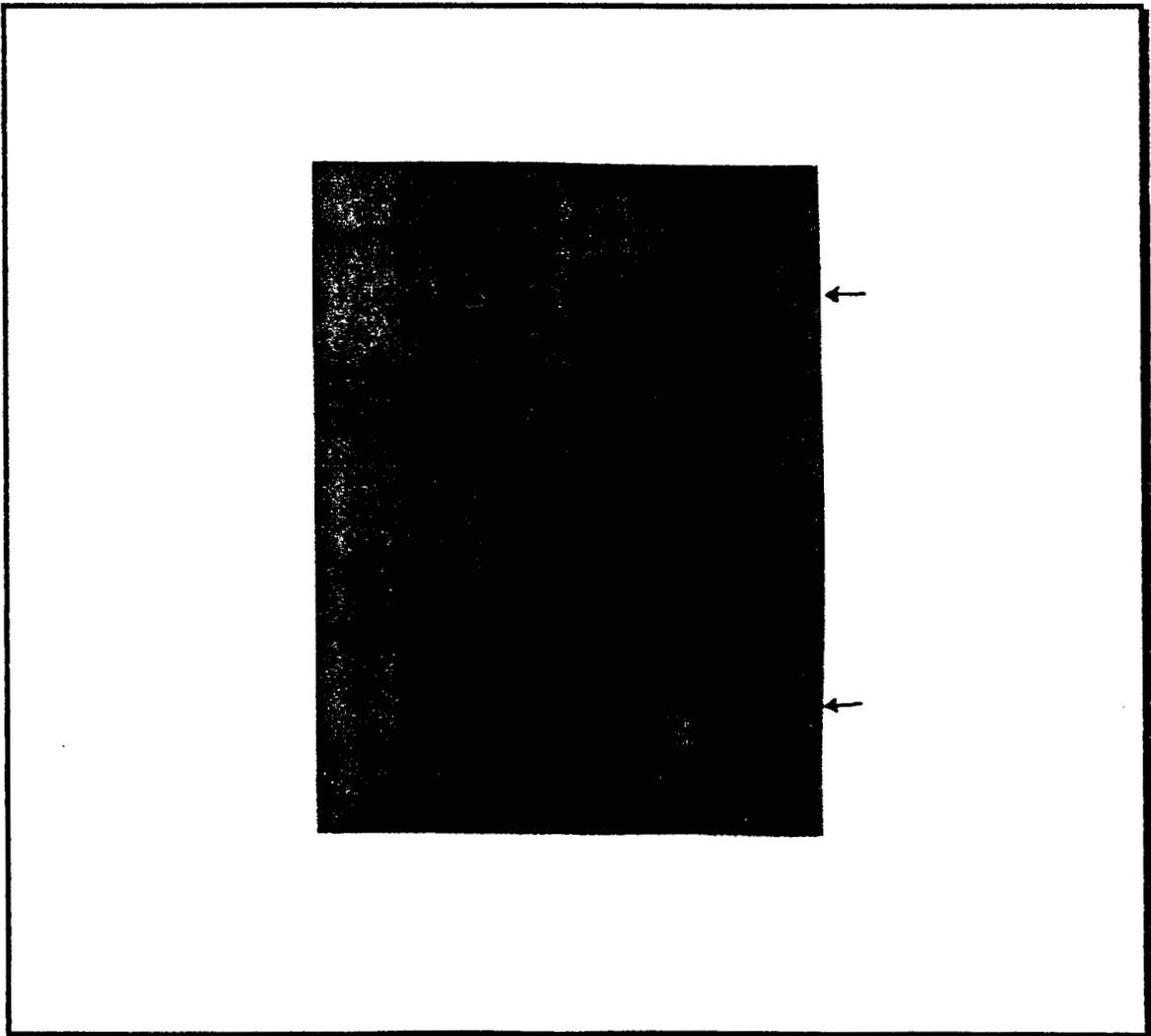


Figura 33.-Secuenciación de la muestra RB164. En la figura las flechas indican la presencia de tres nucleótidos que en el alelo alterado sustituyen a los tripletes que codifican para los aminoácidos 172 y 173 de la proteína pRB110.

TABLA 10.- RESUMEN DE RESULTADOS

Paciente	Presentación del tumor.	Mutaciones		Consecuencia
		localización	tipo	
RB351	Unilateral	intrón 3	sustitución	unión intrón-exón alterada
RB175	Unilateral	exón 4		
RB28	Unilateral	exón 4		
RB289	Unilateral	exón 4	deleción parcial	pRB110 inactiva
RB333	Unilateral	exón 4		
RB272	Bilateral	exón 3	inserción	pRB110 inactiva
RB262	Bilateral	exón 4		
RB242	Bilateral	exón 4		
RB115	Bilateral	exón 5		
RB164	Bilateral	exón 5	sustitución	pRB110 inactiva

DISCUSION DE RESULTADOS

De acuerdo con la literatura el retinoblastoma hereditario se manifiesta antes del primer año de edad mientras que el retinoblastoma no hereditario se manifiesta más tardíamente, en contraste con lo anterior, en la población estudiada encontramos que el 84.4% de los casos con RB bilateral y el 57.1% con RB unilateral presentaron el tumor antes del año de edad, esto sugiere que en la población estudiada el RB unilateral hereditario se presenta con mayor frecuencia que lo reportado en la literatura para otras poblaciones o que estos sean casos en los que el desarrollo del tumor en el otro ojo se presente en etapas posteriores al estudio y que por lo tanto sean casos de RB bilateral pues el 72% de los pacientes estudiados presentó la enfermedad antes del primer año de edad dato que se correlaciona adecuadamente con la edad de inicio registrada en la literatura para la forma hereditaria.

De los 60 pacientes estudiados el 95.0% presentaron leucocoria como principal signo de diagnóstico del tumor y de acuerdo con la literatura ésta es la principal manifestación del retinoblastoma, seguida en orden de importancia por el estrabismo que en este estudio lo presentó sólo el 5.0% de los pacientes.

Con respecto a la penetrancia, no se encontró una diferencia notable entre el 10% registrado en la literatura y el 11.6% obtenido en la población analizada por lo que la penetrancia dentro de nuestra población puede considerarse que tiene el mismo comportamiento que los datos registrados a nivel mundial.

Por otra parte, se ha reportado que una mutación germinal en el gen RB1 (forma hereditaria) predispone, además del retinoblastoma, a otro tipo de tumores primarios y más del 50% de estos pacientes desarrolla

tumores no oculares, en los siguientes 32 años de vida, principalmente osteosarcoma, (Benedict y cols, 1990). En los pacientes que se analizaron en este estudio cinco desarrollaron osteosarcoma uno de ellos con RB unilateral y cuatro con RB bilateral. No se encontraron otras neoplasias asociadas, sin embargo la mayoría de los pacientes son menores de 5 años, por lo que es posible que algunos de ellos posteriormente desarrollen tumores no oculares.

El análisis por SSCP resultó ser de gran utilidad ya que se pudo establecerse la localización de mutaciones en 5 casos de los 32 con RB bilateral y en 5 casos de los 28 con RB unilateral, con lo cual se hace evidente la sensibilidad de la técnica para detectar mutaciones que por otros procedimientos comunes no pueden ser detectados.

De los 28 pacientes con RB unilateral se encontraron 5 casos con alteraciones en el patrón electroforético, este es un resultado muy interesante ya que al haberse encontrado dichas alteraciones en el DNA de sangre periférica, se puede concluir que estos casos con RB unilateral son hereditarios ya que todos los casos con RB no hereditario presentan la mutación exclusivamente en las células de la retina tal como lo establece la ley de Knudson.

Es importante notar que el 57.1% de los pacientes con RB unilateral manifestaron el padecimiento antes del año de edad, y por otra parte el 72% de toda la población estudiada presentó el tumor antes del primer año de edad éste es uno de los parámetros que caracteriza a los casos hereditarios, por lo que éste hallazgo junto con las mutaciones encontradas en los pacientes con RB unilateral sugiere que los casos hereditarios son más frecuentes en nuestra población en comparación con lo registrado en la literatura.

Se analizaron las muestras disponibles de DNA de los padres de los pacientes RB267, RB289 RB272, RB115, RB164 y RB175 y en ninguno de ellos se encontró alteración en los patrones electroforéticos analizados en sangre periférica, por lo que estos resultados sugieren que las alteraciones encontradas en esos pacientes son mutaciones *de novo* que de acuerdo con Blanquet y cols (1995) surgen como formas esporádicas en familias sin antecedentes familiares con retinoblastoma ya que ninguno de los padres es portador de dicha mutación en las células sanguíneas.

Entre los pacientes analizados en este trabajo se encontraron casos de gran interés: el paciente RB175 que presentó dos bandas extra en el exón 4, y el paciente RB115 que presentó tres bandas extra en el exón 5, estos resultados pueden ser causados por la formación de estructuras heteroduplex, las cuales pudieron originarse debido a una delección o a una inserción en uno de los alelos, de tal manera que si cada una de las cadenas normales se renaturaliza con una cadena mutada se formarán estructuras heteroduplex (Orozco, 1993).

El análisis comparativo de las curvas obtenidas por densitometría tanto del paciente RB28 como del control reveló que guardan una gran similitud entre los valores correspondientes a 3 de sus cuatro fracciones, pero existe una marcada diferencia en la fracción cuatro del caso índice RB289, correspondiéndole un valor de 39.6% a la fracción 4 del control y de 41.7% a la del caso RB28; ambos porcentajes contrastan notablemente con el 14.9% de la fracción 4 del paciente RB289, por lo tanto es posible que al paciente RB289 sea portador de un alelo normal y de un alelo mutado en ésta región del exón 4.

Por otra parte, en este trabajo el exón 4 presentó el mayor número de patrones electroforéticos anormales un dato que sin duda llama la atención

debido a que en la literatura existen muy escasos registros de mutaciones en este exón por lo tanto la caracterización de las mutaciones detectadas en este trabajo podrían sugerir que en nuestra población el exón 4 tiene una alta predisposición a presentar mutaciones inactivantes del gen RB1.

En la literatura existen muy pocos registros de mutaciones presentes en el exón 5 y sin embargo la mayoría de estas dan lugar a proteínas estructuralmente alteradas como se propone para las mutaciones detectadas en este estudio.

Por otra parte en los resultados obtenidos al secuenciar el DNA del paciente RB351 se encontró una sustitución de bases en la posición +56 del intrón 3 la cual cambia el codón de *fenilalanina* por un codón de paro (UGA) y en la posición +57 del mismo intrón el codón para *Serina* se sustituye por un codón de *Prolina* estas mutaciones podrían alterar el proceso de síntesis del RNAm y por lo tanto hacerse evidentes en la función alterada de la proteína pRB110 por otro lado en el mismo paciente se encontró la sustitución de tres nucleótidos que cambian a los nucleótidos ubicados en la posición +18 y +19 del intrón 3 que podrían alterar el proceso de síntesis del RNAm y por lo tanto afectar a la función de la pRB110.

En el paciente RB272 se encontró una inserción de cuatro nucleótidos esta mutación representa por lo tanto un corrimiento del marco de lectura que genera una proteína estructuralmente alterada del aminoácido 101 al 105 inhabilitada para ejercer su función como regulador del ciclo celular.

Es importante aclarar que las mutaciones detectadas en los pacientes RB351 y RB272 no corresponden a las que se han reportado en la literatura para el mismo exón y en otras poblaciones.

Con respecto al paciente RB164 donde la mutación que altera a los codones de los aminoácidos 172 y 173 puede dar lugar a una proteína

estructuralmente alterada inhabilitada para actuar como regulador del ciclo de división celular.

Con respecto al resto de los pacientes que presentaron un patrón electroforético normal, es posible que la mutación se localice en regiones del gen no analizadas en este trabajo como podría ocurrir con los 14 codones de arginina localizados a todo lo largo del gen RB1 que de acuerdo con recientes descubrimientos (Cowell, 1991; Zaoxia L, 1995) son sitios muy susceptibles de sufrir mutaciones que crean codones de terminación en pacientes con Retinoblastoma y en otras formas de cancer relacionadas con el gen RB1 lo cual abre una nueva vía de investigación encaminada a conocer la relación que existe entre el gen RB1 y otras formas de cáncer.

CONCLUSIONES

El diagnóstico molecular puede emplearse con éxito para localizar alteraciones genéticas involucradas en el desarrollo del retinoblastoma y aplicarse eficientemente como una forma de diagnóstico diferencial entre el RB hereditario y el RB no hereditario.

Dentro de nuestra población la penetrancia de la enfermedad guarda un comportamiento similar al resto de la población mundial

El alto índice de mutaciones encontradas en los pacientes con RB unilateral sugiere que los casos con RB unilateral hereditario son más frecuentes en nuestra población que lo reportado en la literatura para otras poblaciones.

Las mutaciones caracterizadas en este trabajo representan un valioso aporte al conocimiento de las alteraciones implicadas en el desarrollo del retinoblastoma y de otras formas de cáncer.

BIBLIOGRAFIA

Abramson M.1990. Retinoblastoma 1990: Diagnosis, treatment and implications. *Pediatr Ann* 19:387-395.

Ausubel F; Brent R.1988. *Current protocols in Molecular Biology. Overview of DNA Sequencing Methods.* Greene Publishing Associates and Wiley- Interscience. New York. pp 12.8.9

Benedict W; Xu H; Hu S.1990. Role of the Retinoblastoma gene in the initiation and progression of human cancer. *J Clin Invest* 85:988-993.

Blanquet V; Créau N; De Grouchy J.1991. Molecular detection of constitutional deletions in patients with Retinoblastoma. *Am J Med Genet* 39:355-361.

Blanquet V; Turleau C; Gross M.1993. Identification of germline mutations in the RB gene by denaturant gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction direct sequencing; *Hum Mol Genet* 2:975-979.

Blanquet V; Gross M; Turleau C.1994. Three novel germline mutations in exons 8 and 18 of the Retinoblastoma gene. *Hum. Mol. Genet* 3:1185-1186.

Blanquet V; Turleau C; Gross M.1995. Spectrum of germline mutations in the RB1 gene: a study of 232 patients with hereditary and non hereditary retinoblastoma; *Hum Mol Gen* 4:383-388.

Carnevale A; Del Castillo V.1993. Herencia mendeliana en: "Genética y Biología Molecular en Cardiología". *Sociedad Mexicana de Cardiología.* México. 51-71.

Caron de Fromentel C; Soussi T.1992. TP53 tumor suppressor gene: a model of investigation in human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer.* 4:1-15

Cowell J.1991. The Genetics of Retinoblastoma. *Br.J. Cancer* 63:333-336.

Damjan G; Dean M.1993. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mutat* 2:404-414.

Díaz M, Orozco L.1992. Estudio Clínico-Genético del Retinoblastoma. Boletín Médico Hospital Infantil de México 49:175-179.

Draper G; Sanders B; Kingston E.1986. Second neoplasms in patients with retinoblastoma. Br J Cancer 53:661.

Dunn J; Phillips R; Becker A.1988. Identification of germline and somatic mutations affecting the Retinoblastoma Gen. Science 241:1797-1800.

Francke U.1976. Retinoblastoma and chromosome 13. Cytogenet Cell Genet. 16:131-134.

Friend S; Bernards R; Rogel S.1986. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. Nature 323:643-6.

Fung Y; Murphree A.1987. Structural evidence for the authenticity of the human Retinoblastoma gene. Science 236:1567-1661.

Gallie, L; Joremy A. 1990. Biology of disease. Mechanism of oncogenesis in Retinoblastoma. Lab Invest 62:175-179.

Hollingsworth R; Carmel E; Wen-Hwa L.1993. Retinoblastoma protein and the cell cycle. Current Opinion in Genetics and Development. 3:55-62.

Horowitz J; Yandell D; Sango P.1989. Point mutational inactivation of the Retinoblastoma Antioncogene. Science 243:937-940.

Iwahana H; Orita M; Kanasawa H.1989. Detection of polymorphisms of human DNA gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci 86:2766-2770.

Jorgen H; Winther J; De Nully P.1990. Risk of non-ocular cancer in first degree relatives of Retinoblastoma patients. Hum Genet 85:283-287.

Kevin N; Douglas C.1996. Domains A and B in the Rb pocket interact to form a transcriptional represor motif. Molecular and cellular Biology. 16:9:4862-4868

Knudson A.1996. Hereditary Cancer: two hits revisited. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 122(3) 135-40.

Knudson A.1993. Antioncogenes and human cancer. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90:109-121.

Knudson A.1971. Mutation and cancer: Statistical study of Retinoblastoma. J NIH Res 2:67-72.

Lih-Juan S; Eva Y; Hoang To.1988. Human esterase D gene: complete cDNA sequence, genomic structure and applications in the genetic diagnosis of human retinoblastoma. Hum. Genet. 79:137-141.

Linn.1994. en :Emery & Rimon's.1997. Principles & Practics of Medical Genetics.3^a ed. II Churchill Livingstone.USA.

Lohmann D; Brandt R; Hopping W. 1994. Distinct RB1 gene mutations with low penetrance in Hereditary retinoblastoma.Hum.genet. 94(4):349-54

Lohmann D; Martin G; Birgit B.1997. Constitutional RB1-gene mutations in patients with isolated unilateral retinoblastoma.Am. J. Hum. Genet. 61:282-294.

Ludlow J; De Caprio J. Huang C.1989. SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the Retinoblastoma susceptibility gene product family. Cell 56:57-65.

Maniatis, T; Sambrook, J.1989. Molecular Cloning, a laboratory manual. V11 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA pp 7.87

McGee T; Yandell D; Dryja T.1989. Structure and partial genomic sequence of the human Retinoblastoma susceptibility gene. Gene 80:119-128.

Mitchell C; Cowell J.1988. Molecular evidence that the esterase-D gene lies proximal to the retinoblastoma susceptibility locus in chromosome region 13q14. Hum Genet 81: 57-60.

Naumova A; Sapienza C.1994. The genetics of Retinoblastoma, revisited. Am J Hum Genet 54:264-273.

Norck M; Terry L; imanshu M. 1995.Retinoblastoma. Cell of origin. Arc. ophthalmol. 113:791-802.

Orita M. Youichi S. Takao S. y Kenshi H. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 5:874-879.

Orozco L.1993. Biología molecular aplicada al estudio de las enfermedades hereditarias en: "Genética y Biología Molecular en Cardiología". Sociedad Mexicana de Cardiología. México. 87-104.

Pharmacia LKB, Biotechnology. 1991. Gene Assembler Plus (80-2081-57) Users Manual.

Roarty J; Mclean I; Zimmerman L.1988. Incidence of second neoplasms in patients with bilateral Retinoblastoma. Ophthalmology. 95:1583.

Sanger F; Nicklen S; Coulson A.1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci 74:5463-5467.

Scheffer H; te Herman G; Kruize Y.1989. Linkage analysis of families with hereditary Retinoblastoma: Nonpenetrance of mutation, revealed by combined use of markers within and flanking the RB1 gene Am J Hum Genet 45:252-260.

Shimizu T; Toguchida J; Kato M.1994. Detection of mutations of the RB1 gene in Retinoblastoma patients by using exon-by-exon PCR-SSCP analysis. Am J Hum Genet 54:793-800.

Shirodkar S; Ewen M; DeCaprio J.1992. The transcription Factor E2F Interacts with the Retinoblastoma Product and a p107-Cyclin A Complex in a Cell Cycle-Regulated Manner.Cell 68:157-166.

Sparkes, 1980 en: Christopher D; Mitchell, J. 1988. Molecular evidence that the esterase-D gene lies proximal to the retinoblastoma susceptibility locus in chromosome region 13q14. *Hum. Genet.* 81:57-60.

Stern J; Tao Y; Kennett S. 1996. The amino terminus of the retinoblastoma (Rb) protein associates with cyclin-dependent kinase-like kinase via Rb amino acids required for growth suppression. *Cell Growth-differ.* 7(1):53-64.

Toguchida J; Ishisaki K; Sasaki M. 1988. Chromosomal reorganization for the expression of recessive mutation of Retinoblastoma susceptibility gene in the development of Osteosarcoma. *Cancer Res* 48:3939-3943.

Thonney F; Munier F; Balmar A. 1996. Le retinoblastome: aspects cliniques et diagnostic moléculaire. *Schweiz-Rundsch-Med-Prax.* 85 (35):1058-62.

Vaughan D; Taylor A. 1987. *Oftalmología general.* 8ª ed. Ed. El Manual moderno. México D.F. pp. 412-415.

Vogelstein B. 1998. *The genetic bases of human cancer.* McGraw-Hill. USA. pp731.

Weatherall D. 1991. "The new genetics and clinical practice" 3ª ed. Oxford University Press, Oxford. pp. 376.

Weinberg R. 1991. Tumor suppressor genes. *Science* 254:1138-1146.

Wiggs J; Nordenskjöld H; Yandell D. 1988. Prediction of the risk of hereditary retinoblastoma using DNA polymorphisms within the retinoblastoma gene. *The New Engl J Med* 318:151-157.

Yandell D; Dryja T. 1989. Sequencing of alleles at the Human Retinoblastoma Locus: Application to Cancer Diagnosis and Genetic Counseling. en: "Molecular Diagnostics of Human Cancer". *Cancer Cells.* Cold Spring Harbor Laboratory. Massachusetts USA. pp.223-227

Yunis JJ, Ramsey N. 1978. Retinoblastoma and subband deletion of chromosome 13. *Am. J Dis. Child.* 132:161-163.

Zaoxia L; Yue S; Britta B.1995.Germline mutations in the RB1 gene in patients with hereditary retinoblastoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 14:277-284.

**LOS INTEGRANTES DEL JURADO, DESIGNADOS POR LA
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD, DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD
IZTAPALAPA, APROBARON LA PRESENTE TESIS EL DÍA 29 DE
JULIO DE 1998.**

PRESIDENTE



DRA. LORENA OROZCO OROZCO

SECRETARIO



DRA. ARIADNA E. GONZALEZ DEL ANGEL

VOCAL



DRA. ROCIO ORTIZ MUÑIZ