

# Perspectivas en la genómica del retinoblastoma: Implicaciones del gen supresor de tumor RB1

Maricela Rodríguez-Cruz,\* Martha del Prado,\* Mauricio Salcedo\*\*

\* Unidad de Investigación Médica en Nutrición.

\*\* Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas.

Coordinación de Investigación en Salud, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

**Genomic retinoblastoma perspectives:  
Implications of suppressor gene of tumor RB1**

## ABSTRACT

*In order to define the molecular and cellular bases of the development of retinoblastomas it is necessary to know its etiology, and to apply the advances in genome technology to this kind of neoplasia. Retinoblastomas are childhood tumors of the eye with an average incidence of one case in every 15,000-20,000 live births, which occur in sporadic and hereditary forms. The sporadic form appears regularly as a unilateral tumor, while in the familial form of the disease, tumors may be unilateral and bilateral. This neoplasia is characterized by leukocoria, strabismus, and heterochromia. The retinoblastoma gene (RB1) is a molecular marker of retinoblastoma tumors. This gene is located in chromosome 13q14.2 and encodes a nuclear phosphoprotein (pRB) of 110 KDa, which plays a major role in cell proliferation control through cell cycle-regulated phosphorylation/dephosphorylation cycles of this protein. The RB1 gene is mainly affected by point mutations, which occur most frequently in exons 3, 8, 18 and 20. At the end of the last century, DNA technology has improved notably, allowing for its application to the study of a vast array of diseases. The aim of this work is to show the molecular aspects involved in retinoblastoma which are currently deciphering; this is possible thanks to new technology platforms that have been developed. This will allow us in a near future, to offer tests for the early diagnoses, prognoses, and the determination of individual predisposition towards this neoplasia.*

## RESUMEN

El retinoblastoma es una neoplasia embrionaria que se manifiesta en dos formas: esporádica (no heredada) o familiar (heredada). En los casos esporádicos el tumor es unilateral y en la forma familiar puede presentarse de manera unilateral o bilateral. Esta neoplasia tiene una incidencia promedio de 1/15,000 nacidos vivos, presentando signos y síntomas que incluyen leucocoria, estrabismo, midriasis unilateral y heterocromia. El gen que predispone al desarrollo de retinoblastoma es RB1 y se localiza en el cromosoma 13 en la región q14.2. El gen RB1 codifica para una fosfoproteína nuclear que participa de manera importante en la regulación del ciclo celular. De acuerdo con la hipótesis de Knudson, para que se desarrolle la neoplasia se deben presentar dos mutaciones en el gen RB1. Las mutaciones puntuales son las que más frecuentemente se presentan en el gen RB1; la mayoría de los estudios indican que los exones 3, 8, 18, 19 y 20 son las regiones de mutación preferencial. En la última década ha habido un gran avance en la tecnología del DNA, lo cual hace posible su aplicación en diferentes enfermedades. Estas herramientas moleculares podrían ser de gran utilidad en el diagnóstico o conocimiento de la predisposición a desarrollar un retinoblastoma. Entre estas valiosas herramientas se cuenta con la hibridación fluorescente realizada *in situ*, hibridación genómica comparativa, las microhileras y por último la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido. En conclusión, actualmente se están descifrando los aspectos moleculares que están relacionados con el retinoblastoma, gracias a la aplicación de nuevas plataformas tecnológicas. Esto permitirá en un futuro próximo ofrecer pruebas para un diagnóstico temprano o para conocer el pronóstico y la predisposición de individuos a desarrollar esta patología. Con el fin de entender las bases celulares y moleculares del desarrollo del retinoblastoma, el objetivo del presente trabajo es mostrar el estado del arte del conocimiento de esta neoplasia, así como su origen y los avances en la genómica aplicada al retinoblastoma.

**Key words.** Retinoblastoma. RB1, PRB1 protein.

**Palabras clave.** Retinoblastoma. RB1 proteína PRB1.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una gran cantidad de información acerca del estudio del retinoblastoma y su origen. El objetivo de este trabajo es tener de primera instancia, lo más relevante en el ámbito clínico y molecular sobre esta neoplasia, mencionando aspectos de uno de los genes que probablemente está involucrado en su desarrollo, el gen de retinoblastoma, RB1. Además, se abordan las principales estrategias moleculares de gran escala que actualmente tienen impacto en las enfermedades neoplásicas y que se están utilizando en el diagnóstico y pronóstico temprano de éstas. Se menciona la aplicación de estas tecnologías en el conocimiento de la genómica del retinoblastoma.

## LA GENÉTICA CLÍNICA DEL RETINOBLASTOMA

El retinoblastoma es un tumor maligno de las células de la retina que surge en niños menores de siete años y afecta en promedio a 1/15,000 nacidos vivos.<sup>1</sup> Esta incidencia es similar en nuestro país tal como lo reporta Amozorrutia, *et al.*<sup>2</sup> Esta neoplasia se puede manifestar en dos formas: la forma esporádica o no heredada y la familiar o heredada. La clínica de esta enfermedad ha demostrado que en los casos esporádicos, el tumor es unilateral de manera unifocal; generalmente se presenta a los dos años de edad y representa 60% de todos los casos de retinoblastoma. Por el contrario, los casos hereditarios aparecen a una edad más temprana. Éstos representan 40% de todos los casos de retinoblastoma, en donde 10% son transmitidos de algún parente afectado y el restante 30% originado por una mutación germinal *de novo* en alguno de los progenitores no afectados. Los casos hereditarios pueden presentarse de forma unilateral o bilateral. Se considera que en los casos heredados, la neoplasia es transmitida como una enfermedad clásica mendeliana autosómica dominante con penetrancia incompleta (90%) y expresividad variable.<sup>3</sup> Con respecto a la edad de aparición de esta neoplasia, existen diversos trabajos incluidos los realizados en nuestro país, que mencionan que dicho padecimiento puede presentarse durante los primeros seis años de edad.<sup>2,4,5</sup>

Los primeros síntomas que presentan los pacientes con retinoblastoma es leucocoria (conocida como "ojos de gato"), que resulta del reemplazo del humor vítreo por el tumor o por crecimiento de éste en la mácula. Otro síntoma es el estrabismo que ocurre cuando pequeños tumores maculares interfieren con la visión.<sup>6</sup>

## LA HIPÓTESIS DE KNUDSON EN EL RETINOBLASTOMA

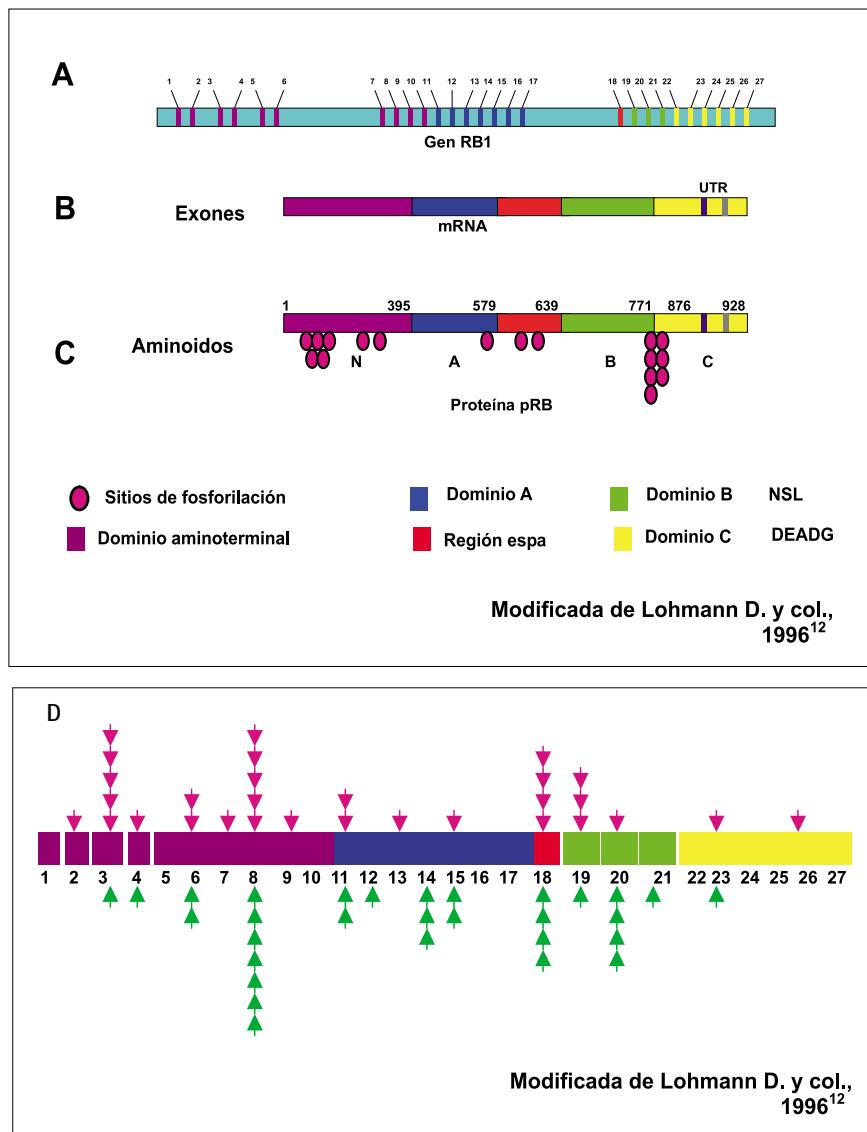
Actualmente existen diversas teorías acerca del origen genético del retinoblastoma. Sin embargo, continúa vigente la hipótesis propuesta por Knudson en la década de los 70's, la cual establece que son necesarias dos mutaciones para el desarrollo de esta enfermedad, es decir, la pérdida de heterocigocidad. En la forma heredada, la primera mutación se encuentra en todas las células del individuo (de manera germinal), en donde el alelo mutado se hereda de uno de los progenitores. La segunda mutación es somática y afecta células de la retina que tienen la primera mutación, generando la homocigocidad de alelos mutados. En la forma no heredada ambas mutaciones somáticas ocurren en la misma célula de la retina.<sup>7</sup>

## ASPECTOS MOLECULARES DEL RETINOBLASTOMA

### El gen del retinoblastoma

Uno de los genes más relacionados con esta patología es el gen RB1. Una amplia variedad de reportes indican que de 17 a 83% de los pacientes con retinoblastoma tienen algún tipo de alteración en RB1. Este gen tiene una longitud de 180,388 pares de bases (pb) y está formado por 27 exones. Además codifica para un ácido ribonucleico mensajero (RNAm) de 4.7 kb que se traduce en una fosfoproteína nuclear (pRB) constituida por 928 aminoácidos con un peso de 105-110 kDa (Figura 1A-1C).<sup>8,9</sup>

El gen RB1 se localiza en el cromosoma 13 en la región q14.2. El análisis citogenético de linfocitos de pacientes afectados con retinoblastoma ha demostrado que sólo en 5% de los casos se observa la pérdida de esta región cromosómica involucrando a este gen.<sup>10</sup> Es importante considerar que en el retinoblastoma existen otras anomalías cromosómicas, las cuales parecen estar asociadas con el desarrollo del tumor más que con la iniciación del mismo. Aun cuando el retinoblastoma es el cáncer intraocular más frecuente en niños, en reportes internacionales aparece sólo un estudio del tipo citogenético de nuestro país, en el cual se caracterizó a este tipo de pacientes pediátricos.<sup>11</sup> Este estudio mostró al igual que lo reportado en otros países, la presencia de sólo 5% de alteraciones citogenéticas en el cromosoma 13. Estos resultados muestran que en cierta medida debe existir otro tipo de alteraciones más finas, las cuales no pueden ser detectadas con esta tecnología.



**Figura 1.** Aspectos moleculares del gen RB1. A. Gen RB1 de 200 kb, constituido de 27 exones representados por las líneas verticales numeradas en colores y 26 intrones mostrados en color azul. B. Estructura del RNAm del gen RB1 de 4.7 kb, los números indican la posición de los exones. Los colores indican las regiones que codifican para los diferentes dominios de la proteína pRB. C. Proteína pRB en donde se observan los dominios N (amino), A, región espaciadora, B, NLS (señal de localización nuclear), DEADG (sitio consenso que es hidrolizado por caspasa-1),<sup>20</sup> C y los sitios de fosforilación; esta proteína está formada por 928 aminoácidos.<sup>19</sup> D. Representación de la distribución de mutaciones en el gen RB1 en pacientes con retinoblastoma. En la parte superior las flechas rosas señalan la distribución de las mutaciones en la línea germinal reportadas por Blanquet y col. (1995).<sup>13</sup> En la parte inferior se indica con flechas verdes el espectro de mutaciones en la línea germinal de pacientes con retinoblastoma hereditario, datos tomados de Lohmann y col. (1996).<sup>12</sup> Los números indican los exones en diferentes colores que representan los dominios de la proteína pRB mostrados en 1C.

En el caso específico del gen RB1 en la entidad del retinoblastoma, a la fecha se han reportado todo tipo de mutaciones como: eliminaciones, inserciones, duplicaciones, inversiones, transiciones en regiones CpG y mutaciones puntuales. Las mutaciones puntuales son las más frecuentes contando cerca de 50% de las alteraciones en el gen RB1. La mayoría de los estudios concuerdan con que los exones 3, 8, 18, 19 y 20 son las regiones preferenciales de mutación ("hot spots"). Estas mutaciones se localizan en el dominio amino (en los exones 3 y 8) y en el dominio "B" (exones 18-20), figura 1D.<sup>12-14</sup> en este último se encuentra una de las regiones reguladoras de la pRB.

Recientemente en un trabajo de nuestro grupo,<sup>15</sup> se realizó la búsqueda de alteraciones estructurales

en el gen RB1 en pacientes pediátricos afectados con retinoblastoma de nuestro país. En dicho trabajo se analizaron 19 casos con retinoblastoma: tres del tipo hereditario y 16 no hereditario. De manera interesante, encontramos cinco mutaciones puntuales en pacientes sin antecedentes heredofamiliares; estas mutaciones se localizaron en los "hot spots" de los exones 8, 18 y 20 que no habían sido reportadas previamente; estos datos sugieren probables diferencias respecto a la zona geográfica.<sup>15</sup> Esto es apoyado por estudios realizados en la población mexicana por Coral R, *et al.*,<sup>16</sup> en donde reportan mutaciones diferentes en el gen de la distrofina a las previamente reportadas en los principales sitios calientes mayor y menor, característicos de la distrofia muscular de tipo Duchenne.

Por otro lado, diversos estudios indican que las secuencias CpG son regiones hipermetiladas susceptibles a mutaciones, debido a la desaminación de las citosinas metiladas originando cambios de citosina por timina (C→T). Estas transiciones conducen a la formación de codones UGA (codón de terminación), dando como resultado la terminación prematura de la síntesis de la proteína. Este tipo de secuencias susceptibles a metilación pueden encontrarse dentro de la secuencia codificadora del gen RB1. A la fecha se han identificado mutaciones en los codones CGA de los exones 8 y 14 del gen RB1, por lo que estas citosinas hipermetiladas son puntos calientes para mutaciones.<sup>17</sup>

En el contexto de explotación o minería de datos, analizamos las mutaciones puntuales en el gen RB1 reportadas a la fecha (base de datos de la página [www.lohman.pointmutations/RB1.com](http://www.lohman.pointmutations/RB1.com)). De manera interesante, observamos que la mayoría de las mutaciones son transiciones C→T. Aunque no podemos comprobarlo en estos momentos, proponemos que estas citosinas están hipermetiladas permitiendo su desaminación generando así las mutaciones. Así que, la desaminación de las citosinas pudiera ser uno de los principales mecanismos que generan las mutaciones en RB1 en cualquiera de las formas de presentación del retinoblastoma (Cuadro 1). Otro dato importante por mencionar es que es dos veces más frecuente encontrar alteraciones germinales (heredadas) C→T que somáticas. Además, resalta la observación que en el exón 8 esta alteración es cinco veces más fre-

cuente en el tipo germinal que en el tipo somático. Por otro lado, también se encuentran mutaciones en otros exones, que pudieran ser específicas del tipo de entidad, es decir, mutaciones en los exones 11, 18 y 23 para el tipo germinal.

Asimismo, es interesante mencionar que las mutaciones presentadas en el cuadro 1, dan como resultado el cambio simple de base o SNP (del inglés single nucleotide polymorphism SNP) C→T. Esta observación se presenta en más de 95% de las mutaciones puntuales reportadas, favoreciendo el cambio a treonina, aminoácido susceptible de ser fosforilado (Cuadro 1). Estos hallazgos sugieren una tasa mayor de fosforilación alterando así la funcionalidad de la proteína pRB.

Por otro lado, otros estudios han mostrado que en las secuencias promotoras de RB1 también puede presentarse una metilación anormal, es decir, una pérdida de impronta genómica que conlleva la inhibición de la expresión del gen.<sup>18</sup> Resumiendo estos dos mecanismos, la función regulatoria alterada de pRB puede darse por:

1. Metilación anormal de secuencias exónicas generando una desaminación.
2. Nuevos sitios de fosforilación por la ganancia de treonina.

Sin embargo, debe tomarse en cuenta que la alteración del gen RB1 no es el único mecanismo que predispone al desarrollo del retinoblastoma. De manera que

Cuadro 1. Frecuencia de mutaciones puntuales en el gen RB1 en el retinoblastoma.

Región	Mutación	Aminoácido alterado	Frecuencia de mutaciones germinales (%)	Frecuencia de mutaciones totales (%)
Mutaciones germinales				
Exón 8	CGA > TGA	A > T	16.0	10.7
Exón 11	CGA > TGA	A > T	6.9	4.6
Exón 14	CGA > TGA	A > T	6.9	4.6
Exón 17	CGA > TGA	A > T	9.7	6.5
Exón 18	CGA > TGA	A > T	10.4	7.0
	CAA > TAA	V > I		
Exón 23	CGA > TGA	A > T	6.9	4.6
			100%	66.9
Mutaciones somáticas				
Exón 4	GAA > TAA	L > I	7.0	2.3
Exón 8	CGA > TGA	A > T	7.0	2.3
Exón 10	CGA > TGA	A > T	14.0	4.6
Exón 14	CGA > TGA	A > T	11.2	3.7
Exón 17	CGA > TGA	A > T	8.4	2.8
			100%	33.1

en los casos en que el gen RB1 se encuentra normal, es probable que otros factores o proteínas (factores de transcripción como la familia E2F, desacetilasas de histonas, desaminasas, cinasas, ciclinas, etc.) que regulan la función de la proteína pRB, sean los que están alterados favoreciendo de manera indirecta el desarrollo de retinoblastoma. Actualmente se conocen otras dos proteínas que pertenecen a la familia de la pRB, la p107 y la p130. Todos los miembros de esta familia comparten el dominio funcional que es muy importante para el control de la división celular. Se desconoce si la alteración en estas proteínas pudiera relacionarse con el origen de esta neoplasia.

### **La función del guardián principal del ciclo celular**

A la fecha no ha sido cristalizada la proteína pRB, sin embargo, se ha mostrado que pRB está formada por seis dominios (Figura 1C): 1<sup>13</sup>. El dominio amino terminal (aa 1 al 395), 2. El dominio A (aa 395 al 579), 3. El dominio B (aa 639 al 771), a su vez estos dos dominios forman el dominio “bolsa” A/B, el cual abarca los aminoácidos del 395 al 876; además, entre A y B existe una región a la que se le ha llamado dominio inserto (ID) que incluye los aminoácidos 579 al 639; 4. El dominio carboxilo terminal incluye los aa del 771 al 928; 5. Una señal de localización nuclear (NLS) y 6. Una región que es hidrolizada por la familia de caspasas-3/ICE (aa 886 y 887) durante la respuesta a la muerte celular. Es importante mencionar que la proteína pRB como la p53, presenta una actividad dual, es decir, está involucrada en el ciclo celular y en el proceso de apoptosis.<sup>19</sup>

A los dominios A y B se pueden unir proteínas celulares y virales.<sup>20</sup> Una de las proteínas celulares que se unen a la pRB es el factor regulador E2F. Este factor de transcripción se une a los dominios “bolsa” A/B y al extremo carboxilo terminal. De esta manera, pRB secuestra a E2F y evita la activación de genes dependientes de E2F como: timidina cinasa, myc, myb, reductasa de ribonucleótido, reductasa del dihidrofolato y DNA polimerasa  $\alpha$ , los cuales están involucrados en la progresión de la célula hacia la fase de síntesis (fase S).<sup>21,22</sup> Actualmente, se acepta que la proteína pRB es una proteína reguladora del ciclo celular, en donde su forma hipofosforilada suprime la transcripción de genes que regulan la división celular.<sup>23</sup>

Las otras proteínas p107 y p130/RB2 que forman parte de la familia de proteínas de retinoblastoma, tienen un dominio que presenta una alta homología con el dominio “bolsa”, el cual está altamente conser-

vado entre especies. De manera interesante, estas proteínas también se unen específicamente a los miembros de la familia E2F.<sup>23</sup>

Se ha demostrado que algunas oncoproteínas virales como el antígeno T grande de SV40, E1A tipo 5 del adenovirus humano y E7 del virus del papiloma humano de alto riesgo, forman complejos con pRB, la cual además de ser secuestrada es marcada para su degradación por el sistema de ubiquitina. Dicha interacción provoca alteraciones en el control del ciclo celular permitiendo que la célula permanezca dividiéndose de manera descontrolada.<sup>24</sup>

### **Mecanismos moleculares de represión mediada por pRB**

La familia de proteínas pRB es regulada por mecanismos de fosforilación. Así, en la fase G1 las proteínas están activas (hipofosforiladas) y unidas a E2F. La proteína pRB es fosforilada (110-116 kDa) al final de la fase G1 por cinasas dependientes de ciclinas (ciclina D-CDK4 o CDK6 o ciclina E-CDK2).<sup>25</sup> En esta etapa, la pRB fosforilada libera a E2F, el cual activa la transcripción de genes que regulan el ciclo celular y la célula entra a la fase S; la proteína pRB permanece fosforilada en las fases G2 y M.<sup>26</sup>

Se ha sugerido que el mecanismo molecular de la pRB para regular el ciclo celular es formar un puente entre el factor E2F y una desacetilasa de histonas (HDAC1); este complejo evita la expresión de promotores dependientes de E2F.<sup>27-29</sup> De manera que la asociación entre pRB y HDAC1 parece ser fisiológicamente importante para controlar el ciclo celular.

### **Expresión del gen RB1 en tejidos humanos**

En estudios de expresión utilizando la técnica de inmunohistoquímica clásica, se ha observado que la pRB se expresa en todos los tejidos del organismo.<sup>30</sup> Estos datos han sido apoyados por experimentos de análisis de expresión en que se utilizan microhileras en los diferentes tejidos del humano (para mayor información visite la página web: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin> donde se encuentra una base de datos para todos los genes conocidos del humano). Sin embargo, se ha visto heterogeneidad en su expresión dependiendo del estrato celular en donde se observe, del estado de maduración celular o de la fase del ciclo celular en que se encuentre la célula. Por ejemplo, en la capa interior de la retina del ojo normal, que incluye células ganglionares y amacrinas, se presenta un patrón inmunorreactivo nu-

clear intenso, mientras que la capa externa compuesta de células fotorreceptoras muestra un patrón de tinción débil.<sup>30</sup>

Por otro lado, algunos estudios sugieren que los patrones alterados de la expresión de la pRB se asocian con formas diferentes de cáncer humano. Tal es el caso de algunos tumores benignos y en etapas tempranas de invasión de diversas neoplasias donde se expresan altos niveles de la pRB. También se ha reportado que en algunas neoplasias malignas (sarcomas, cáncer de células pequeñas de pulmón, carcinomas primarios de células no pequeñas de pulmón, carcinoma hepatocelular y cáncer de mama) los niveles de la pRB fluctúan en un rango de niveles bajos a no detectables, correlacionando esta baja expresión con un pronóstico clínico desfavorable.<sup>31-35</sup> Resultados recientes de nuestro grupo muestran que en lesiones invasoras del cervix uterino humano, la expresión de la pRB es casi nula a diferencia de lo que sucede con las lesiones premalignas del cervix, en donde existe una gran expresión de dicha proteína.<sup>36</sup> Estos resultados apoyan la idea que la ausencia de la pRB en algunos tipos de cánceres, puede indicar un pobre pronóstico clínico de los pacientes.

A la fecha son escasos los estudios reportados sobre la expresión de la pRB en retinoblastomas. En uno de estos estudios se indica que la proteína pRB no se expresa en dichos tumores. Los autores explican que la ausencia de esta proteína podría ser la responsable del desarrollo del retinoblastoma.<sup>37</sup> Sin embargo, es importante ahondar en este tipo de estudios si se considera que diferentes mutaciones sobre el gen RB1 pue-

den tener diferentes efectos a nivel de la transcripción y esto puede repercutir en la expresión parcial, total o nula de la proteína correspondiente.<sup>38</sup>

En este contexto, recientemente en un estudio realizado por nuestro grupo, se encontraron retinoblastomas con diferentes grados de diferenciación: tumor diferenciado en rosetas de Flexner-Wintersteiner (Figura 2), tumor medianamente diferenciado y tumor indiferenciado (datos no publicados). Con excepción de sólo un caso tipo Flexner, todos los tumores presentaron la proteína, sugiriendo que otras alteraciones moleculares por ejemplo una mayor fosforilación de la pRB, podrían estar presentes además de la alteración estructural del gen RB1 en retinoblastoma.

#### APLICACIÓN DE NUEVAS HERRAMIENTAS PARA EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DEL RETINOBLASTOMA

En la última década ha habido un gran avance en la tecnología del DNA, lo cual está permitiendo su aplicación en el diagnóstico y pronóstico de algunas enfermedades.

Se sabe que ciertas alteraciones citogenéticas pueden ser el "sello" característico de tumores malignos específicos, por ejemplo, la translocación t(9;22) en leucemias, y t(8;14) en linfomas y probablemente en el caso del retinoblastoma la pérdida de 13q14.2. Para identificar la pérdida de esta región citogenética se ha utilizado la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH, o fluorescence *in situ* hybridization).<sup>39</sup> Esta metodología de citogenética molecular es muy útil, pero tiene algunas desventajas: es cara y laboriosa. Afortunadamente, gracias al continuo avance tecnológico se ha propuesto una alternativa al FISH en donde el marcaje es *in situ* (PRINS primed *in situ*), lo cual permite evaluar eliminaciones genéticas en metafases usando la reacción en cadena de la polimerasa. Así, usando PRINS, se ha evaluado la detección de eliminaciones pequeñas del gen RB1 en pacientes con alteraciones hematológicas con resultados satisfactorios.<sup>40</sup> Desafortunadamente, a la fecha no existe ningún reporte de esta tecnología aplicada a los retinoblastomas.

Se sabe que en todos los tumores existen diferentes tipos de alteraciones genéticas. El análisis citogenético convencional de tumores sólidos es técnicamente difícil e involucra un alto costo. Para evitar estas dificultades, se desarrolló la técnica de hibridación genómica comparativa (HGC), útil para identificar desbalances cromosómicos utilizando 3 fluorocromos diferentes a la vez. Es decir, con esta técnica global es posible detectar todos los desbalances cro-

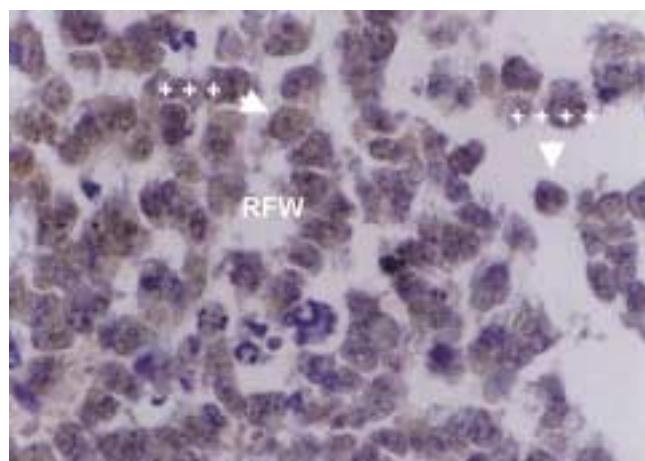
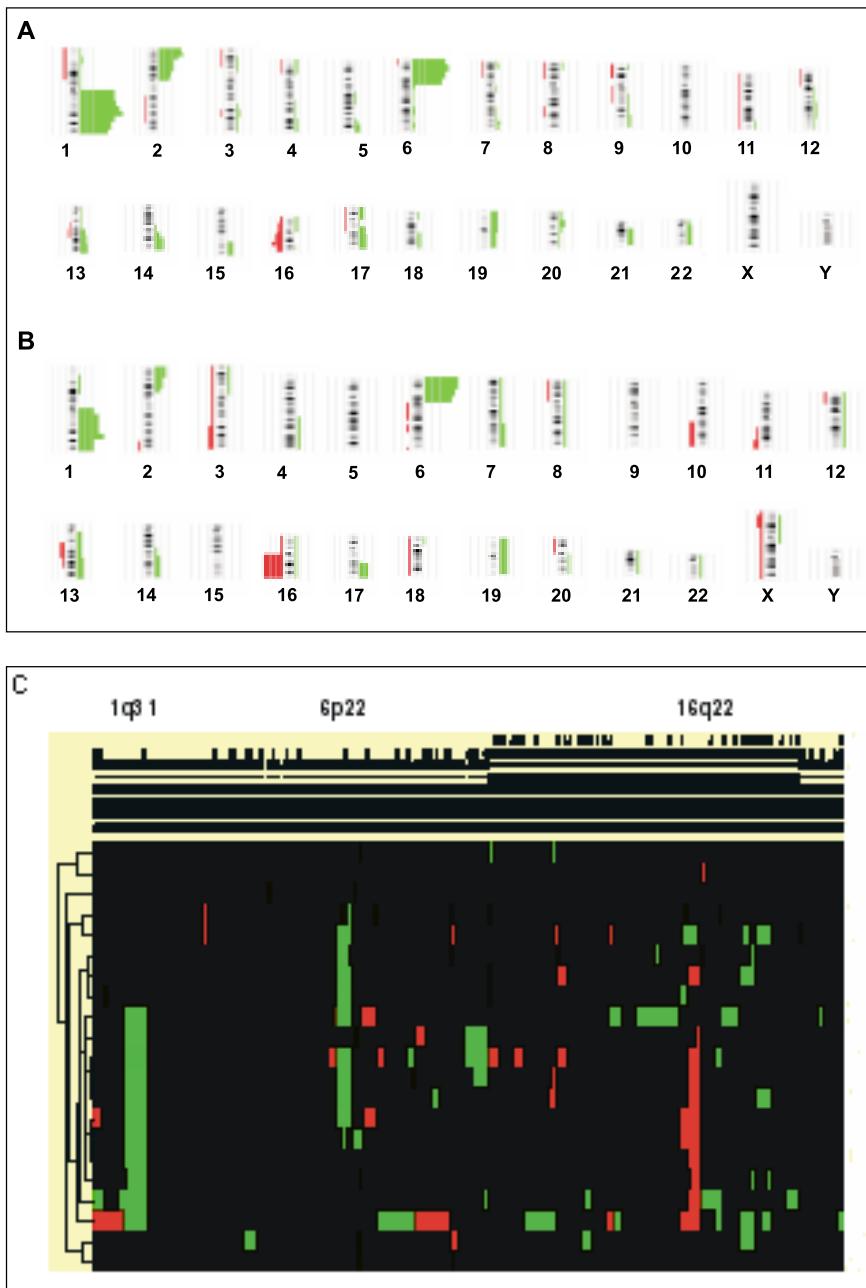


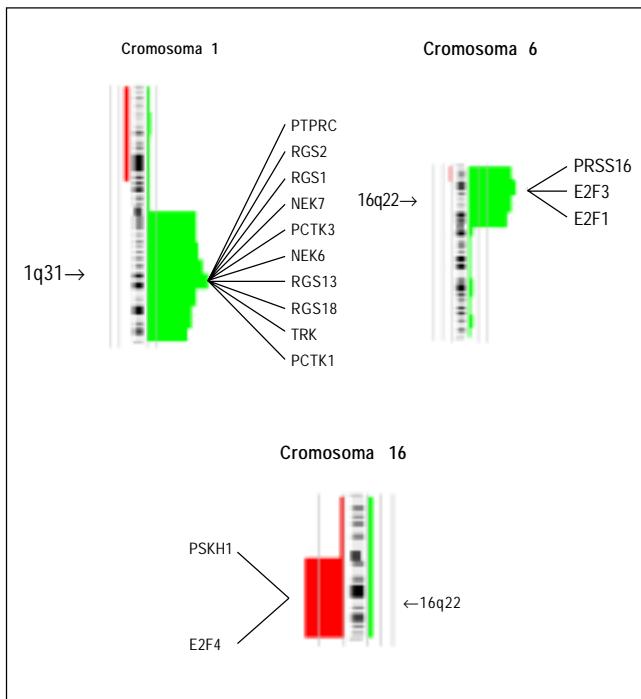
Figura 2. Inmunodetección de la proteína pRB en un retinoblastoma. Tumor diferenciado que presenta tinción positiva para todas las células del tumor, observándose la disposición de las rosetas de Flexner Wintersteiner (RFW) características de este tipo de tumor. La intensidad de la tinción fue mediana tinción (++) e intensa (+++). Aumento 40X.



**Figura 3.** Desbalances cromosómicos en retinoblastomas. La figura muestra el ideograma completo de las alteraciones observadas en retinoblastomas en general, conteniendo casos unilaterales como bilaterales (A) y retinoblastomas esporádicos unilaterales (B). El color verde al lado derecho de cada ideograma muestra la ganancia de secuencias, por el contrario, la pérdida se muestra en color rojo, al lado izquierdo. Los datos de hibridación genómica comparativa fueron normalizados por pruebas estadísticas específicas y posteriormente sujetas a agrupamiento jerárquico tipo aglomerativo, en la cual se observan mayoritariamente las alteraciones estadísticamente significativas (C). Los datos fueron tomados de la página de datos de [www.progenetix.com](http://www.progenetix.com)

mosómicos en todos los cromosomas en un experimento. Además, no hay necesidad de utilizar cultivos celulares, por lo que los tejidos incluidos en parafina pueden usarse en esta metodología. Debido a su aplicación en diversas neoplasias, actualmente se están obteniendo las “firmas” cromosómicas de todos los tumores que afectan al ser humano. La aplicación de HGC en retinoblastomas, tanto esporádico como familiar, ha mostrado dos regiones que se ganan más frecuentemente; 1q31 (más de 50% de los casos) y 6p22 (más del 65% de los casos) y una región

que más frecuentemente se pierde es 16q22 (aproximadamente en 25% de los casos) (Figura 3). De manera interesante, no se encontró desbalance en la región 13q14.2.<sup>41-43</sup> Esto sugiere que algunos grupos de genes localizados en las regiones 6p22 (por ejemplo; serina proteinasa 16, factores de transcripción E2F3 y E2F1), 16q22 (por ejemplo, proteína serina cinasa H1 y factor de transcripción E2F4) y 1q31 (por ejemplo, catepsina E, proteínas reguladoras G, interleucina 10, oncogén TRK, BAX, etc., entre otros) (Figura 4), podrían tener la importancia biológica clave que



**Figura 4.** Ideograma de los cromosomas humanos 1, 6 y 16. Para el caso de los cromosomas 1 y 6 se muestran los genes potenciales relacionados con el cáncer, que se encuentran localizados en las regiones cromosómicas mostradas que se ganan (derecha) frecuentemente en los retinoblastomas. En el cromosoma 16 se muestran los genes potenciales relacionados con carcinogénesis que frecuentemente se pierden (izquierda) en los retinoblastomas. Esta información se logró de la búsqueda en la base de datos provenientes del proyecto del genoma humano ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap99/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap99/)).

permitiera entender las bases moleculares del desarrollo de esta neoplasia. De esta manera, contamos con una probable firma cromosómica del retinoblastoma disponible en bases de datos públicas ([www.progenetix.com](http://www.progenetix.com)).

Recientemente, se han investigado los mecanismos moleculares del desarrollo del retinoblastoma para identificar potenciales blancos moleculares para posibles futuras intervenciones terapéuticas. En dicha investigación, se ha utilizado la tecnología del “chip” de Affymetrix-ADNc el “Affychip” para determinar el perfil de expresión de los retinoblastomas primarios. Mediante el análisis del agrupamiento de tipo “no supervisado” de las clases de datos de expresión de este tipo de tumores, se logró detectar un par de grupos que nos permite clasificar como retinoblastomas benignos (retinomas) y otro como retinoblastomas malignos. Estos datos de expresión también son interpretados sobre el fondo genético de alteraciones de la dosis génica identificado por HGC. La región q31-32 del cromosoma 1, presentó una gran dosis gé-

nica en la mayoría de los retinoblastomas.<sup>43</sup> Actualmente se está precisando por HGC en matriz, la definición de los genes conocidos que presentan dichos desbalances cromosómicos. De esta manera, el papel de las alteraciones moleculares en el gen RB1 en el retinoblastoma podría ser menor a lo que se pensaba.

Gracias al desarrollo de proyectos como el del Genoma Humano, han surgido nuevas tecnologías útiles en la identificación de regiones citogenéticas y de expresión de genes. Una de ellas son las microhileras o biochips. De tal manera que, actualmente contamos con el desarrollo de la HGC en microhileras haciendo el estudio más fino. A la fecha, no ha sido explorado en retinoblastomas, la definición de los genes marcadores alterados; esto podría resolverse aplicando cualquier variante de microhileras, siendo éste un campo virgen para ser explotado.

En otros tipos de cánceres como en el cáncer colorrectal, cáncer mamario, se están construyendo microhileras dirigidas para estas patologías, seleccionando genes que son expresados de manera específica. En este contexto, se incluyeron los principales genes sospechosos involucrados en la carcinogénesis colorrectal de acuerdo con la literatura. Así, usando este “colonchip” se han identificado 59 genes, posibles candidatos para el diagnóstico y la terapia de esta neoplasia.<sup>44</sup> Para el caso del cáncer mamario, la utilización de 70 clonas de secuencias conocidas, pueden dar la firma para el buen o pobre pronóstico a desarrollar metástasis. Existen en el mercado otros chips diseñados *ex profeso* para otras patologías: por ejemplo los hepatochips, oncochips, cardiochips, etc.

En el caso del retinoblastoma sugerimos dos diseños de “retinochips”, uno genómico que incluya entre otros a las regiones cromosómicas 6p22, 16q22 y 1q31, útil para determinar los genes marcadores en el pronóstico de la neoplasia. El otro, un “retinochip de expresión” que incluya los genes RB1, p53, E2F y todos aquellos genes relacionados con la expresión y regulación del gen RB1. Este tipo de diseño dependerá de los datos que se obtengan a partir de experimentos con microhileras y la posterior aplicación de herramientas bioinformáticas tales como GenMAPP, Gene Ontology, BodyMAP, etc.

Otro de los grandes campos de investigación que surge del Proyecto del Genoma Humano, es la definición de las bases de susceptibilidad para determinada patología, mediante el uso de un sistema de genotipificación basado en microhileras para identificar polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs, directamente de una muestra de DNA genómico. Este procedimiento es altamente sensible y específico, lo cual sugiere que pue-

de constituir una poderosa herramienta para el análisis de la variación genética que podría aplicarse en los casos de retinoblastoma hereditario y más aún ser útil como una prueba pronóstica y de susceptibilidad para el probable desarrollo de esta neoplasia.<sup>45</sup> A la fecha, se conocen algunos polimorfismos de una base en el gen RB1 sin que se tenga una validación poblacional. De acuerdo con la base de datos del portal del Centro Nacional de Biotecnología (<http://www.genelyn.org/cgi-bin/record?glid=8262>) existen al menos 30 polimorfismos diferentes a todo lo largo del gen RB1. Se desconoce cuáles son los polimorfismos relacionados con el retinoblastoma. Esto abre la necesidad de definir primero cuál es el patrón de polimorfismos de una base, característicos del gen RB1 presentes en nuestra población y posteriormente relacionarlos con la susceptibilidad al desarrollo de un proceso neoplásico, en este caso para el retinoblastoma.

Finalmente, con toda la información vertida a la fecha referente a los estudios genómicos, en conjunto con la explotación de datos, hoy en día se está logrando entender las bases celulares y moleculares del retinoblastoma, aplicando las nuevas plataformas tecnológicas como las que ofrece la medicina genómica nueva.

El total conocimiento de la genética, la epidemiología, la patología, los mecanismos celulares y moleculares que se llevan a cabo en el retinoblastoma, nos permitirá un rápido desarrollo en el diagnóstico y pronóstico de esta neoplasia, proporcionando al paciente o individuo susceptibles una mejor calidad de vida.

## REFERENCIAS

1. McLean IW. Retinoblastomas, retinocytomas, and pseudoretinoblastomas. In: Spencer WH (Ed.) *Ophthalmic pathology: an atlas and textbook*. Philadelphia: WB Saunders; 1996, p. 1332-80.
2. Amozorrutia-Alegría V, Bravo-Ortiz JC, Vázquez-Viveros J, Campos-Campos L, Mejía-Arangure M, Juárez-Ocana S, Martínez-García Ma. del C, Fajardo-Gutiérrez A. Epidemiological characteristics of retinoblastoma in children attending the Mexican Social Security Institute in Mexico City, 1990-94. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2002; 16: 370-4.
3. Vogel F. The genetics of retinoblastoma. *Hum Genet* 1979; 52: 1-54.
4. Ortiz B, Sánchez M, Gutiérrez F. Algunas características epidemiológicas del retinoblastoma en niños residentes del Distrito Federal. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1996; 53: 234-9.
5. Gómez-Martínez R, Leal CA, Rivera-Luna R, Cárdenas RS, Martínez AB, Medina A. Epidemiological aspects of bilateral retinoblastoma. *Gac Méd Méx* 1995; 131: 527-31.
6. Newsham IF, Hadjistilianou T, Cavenee WK. Retinoblastoma. In: Scriver CH, Beaudet A, Sly W, Valle D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Cap 11. 7<sup>th</sup> Ed. New York, USA: McGraw-Hill, Inc.; 1995, p. 613-42.
7. Knudson AG. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-3.
8. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986; 323: 643-6.
9. Lee WW, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee HY. Human retinoblastoma susceptibility gene: Cloning, identification and sequence. *Science* 1987; 235: 1394-9.
10. Yunis JJ, Ramsay N. Retinoblastoma and subband deletion of chromosome 13. *Am J Dis Child* 1978; 132: 161-3.
11. Salamanca GF, Luengas F, Antillón F. Genetic and cytogenetic studies in children with retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; 13: 129-38.
12. Lohmann D, Brandt B, Hopping W, Passarge E, Horsthemke B. The spectrum of RB1 germ-line mutations in hereditary retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 940-9.
13. Blanquet V, Turleau C, Gross MM, Sénamaud BC, Doz F, Besmond C. Spectrum of germline mutation in the RB1 gene: a study of 232 patients with hereditary and non hereditary retinoblastoma. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 383-8.
14. Alonso J, Miguel-García P, Abelairas J, Mendiola M, Sarret E, Vendrell MT, Navajas A, Pestaña A. Spectrum of germline RB1 gene mutations in Spanish retinoblastoma patients: Phenotypic and molecular epidemiological implications. *Human Mutation* 2001; 17: 412-22.
15. Rodríguez M, Salcedo M, González M, Coral-Vázquez R, Salamanca GF, Arenas D. Identification of novel mutations in the RB1 gene in Mexican patients with retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 138: 27-31.
16. Coral R, Arenas D, Cisneros B, Peñaloza L, Salamanca F, Kofman S, Mercado R, Montañez C. Pattern of deletions of the dystrophin gene in Mexican Duchenne/Becker muscular dystrophy patients: The use of new designed primers for the analysis of major deletion "hot spot" region. *Am J Med Genet* 1997; 70: 240-6.
17. Mancini D, Sing S, Ainsworth P, Rodenhiser. Constitutively methylated CpG dinucleotides as mutation hot spot in the retinoblastoma gene (RB1). *Am J Hum Genet* 1997; 61: 80-7.
18. Stirzaker C, Millar DS, Paul ChL, Warnecke PM, Harrison J, Vincent PC, Frommer M, Clark SJ. Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors. *Cancer Res* 1997; 57: 2229-37.
19. Welch P, Wang J. Disruption of retinoblastoma protein functions by coexpression of its C-pocket fragment. *Genes Develop* 1995; 9: 31-46.
20. Wang JYJ. Retinoblastoma protein in growth suppression and death protection. *Curr Opin Genet Develop* 1997; 7: 39-45.
21. Graña X, Reddy E. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDK's), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKI's). *Oncogene* 1995; 11: 211-19.
22. Cobrinik D, Dowdy S, Hinds P, Mittnacht S, Weinberg R. The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling. *TIBS* 1992; 17: 311-15.
23. Paggi MG, Baldi A, Bonetto F, Giordano A. Retinoblastoma protein family in cell cycle and cancer. A review. *J Cell Biochem* 1996; 62: 418-30.
24. Stahl A, Levy N, Wadzynska Thérèse, Sussan JM, Jourdan FD, Saracco JB. The genetics of retinoblastoma. *Ann Génét* 1994; 37: 172-8.
25. Sherr CJ. Cancer cell cycle. *Science* 1996; 274: 1672-7.
26. Dyson N. The regulation of E2F by pRB- family proteins. *Genes Dev* 1998; 12: 2245-62.
27. Pazin MJ, Kadonaga JT. What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* 1997; 9: 325-8.
28. Luo RX, Postigo AA, Dean DC. Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* 1998; 92: 463-73.
29. Jaulin LM, Groisman R, Naguibneva I, Robin P, Lorain S, Le Villain JP, Troalen F, Trouche D, Bellan AH. Retinoblastoma

- toma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* 1998; 391: 601-4.
30. Cardo CC, Richon MV. Expression of the retinoblastoma protein is regulated in normal human tissues. *Am J Pathol* 1994; 144: 500-10.
  31. Cance WG, Brennan MF, Dudas ME, Huang CM, Cordon-Cardo C. Altered expression of the retinoblastoma gene product in human sarcomas. *N Engl J Med* 1990; 323: 1457-62.
  32. Hensel CH, Hsieh CL, Gazdar AF, Johnson BE, Sakaguchi AY, Naylor SL, Lee WH, Lee E. YH. Altered structure and expression of the human retinoblastoma susceptibility. *Cancer Res* 1990; 50: 3067-72.
  33. Xu HJ, Hu SX, Cagle PT, Moore GE, Benedict WF. Absence of retinoblastoma protein expression in primary non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 1991; 51: 2735-9.
  34. Zhang X, Xu T, Murakami Y, Sachse R, Yashima K, Hirohashi S, Hu S, Benedict W, Sekiya T. Deletions of chromosome 13q, mutations in retinoblastoma 1 and retinoblastoma protein state in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 4177-82.
  35. Lee WH. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science* 1988; 241: 218-21.
  36. Salcedo M, Taja L, Utrera D, Chávez P, Hidalgo A. Changes in retinoblastoma gene expression during cervical cancer progression. *Int J Exp Pathol* 2003; 83: 1-11.
  37. Yuge K, Nakajima M, Uemura Y, Miki H, Uyama M, Tsubura A. Immunohistochemical features of the human retina and retinoblastoma. *Virchows Arch* 1995; 26: 571-5.
  38. Dunn JM, Phillips RA, Zhu X, Becker A, Gallie BL. Mutations in the Rb1 gene and their effects on transcription. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 4596-4604.
  39. Damjanovich J, Adany R, Berta A, Beck Z, Balazs M. Mutation of the RB1 gene caused unilateral retinoblastoma in early age. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 119: 1-7.
  40. Tharapel SA, Kadandale JS. Primed in situ labeling (PRINS) for evaluation of gene deletions in cancer. *Am J Med Genet* 2002; 107: 123-6.
  41. Lillington DM, Kingston JE, Coen PG, Price E, Hungerford J, Domizio P, Young BD, Onadim Z. Comparative genomic hybridization of 49 primary retinoblastoma tumors identifies chromosomal regions associated with histopathology, progression, and patient outcome. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36: 121.
  42. Herzog S, Lohmann DR, Buiting K, Schuler A, Horsthemke B, Rehder H, Rieder H. Marked differences in unilateral isolated retinoblastomas from young and older children studied by comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 2001; 108: 98-104.
  43. Chen D, Gallie BL, Squire JA. Minimal regions of chromosomal imbalances in retinoblastoma detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 129: 57.
  44. Takemasa I, Higuchi H, Yamamoto H, Sekimoto M, Tomita N, Nakamori S, Matoba R, Monden M, Matsubara K. Construction of preferential cDNA microarray specialized for human colorectal carcinoma: molecular sketch of colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 1244-9.
  45. Huber M, Mundlein A, Dornstauder E, Schneeberger C, Tempf CB, Mueller MW, Schmidt WM. Accessing single nucleotide polymorphisms in genomic DNA by direct multiplex polymerase chain reaction amplification on oligonucleotide microarrays. *Anal Biochem* 2002; 303: 25-33.

*Reimpresos:*

**M. en C. Maricela Rodríguez-Cruz**  
 Apartado postal C-029 C. S. P. I. "Coahuila"  
 Coahuila No. 5,  
 Col. Roma  
 06703, México, D.F.  
 Tel.: (5) 5627-6900 Ext. 22483 o 22484  
 Fax (5) 5627-6944  
 Correo electrónico: giraviol@yahoo.es

*Recibido el 28 de enero de 2004.  
 Aceptado el 14 de febrero de 2005.*