

Retinoblastoma en gemelas monocigotas resultado de un evento postcigótico

María Estela Arroyo Yllanes¹, J Fernando Pérez Pérez¹, Luz María González-Huerta², Sergio Alberto Cuevas-Covarrubias²

RESUMEN

El retinoblastoma (Rb) representa el tumor ocular maligno más frecuente en niños con una incidencia mundial de 1 en 13,500-25,000 nacidos vivos. En promedio, el diagnóstico se realiza en los casos bilaterales a los 12 meses y en los unilaterales a los 18 meses. Las características clínicas iniciales incluyen leucocoria, estrabismo, midriasis y heterocromía. Se calcula que 60% de los casos son no hereditarios y unilaterales, 15% hereditarios y unilaterales y 25% son hereditarios y bilaterales. El desarrollo del tumor requiere la presencia de dos eventos mutacionales, el primero que puede ser heredado a través de las células germinales o ser adquirido en las células somáticas y el segundo que ocurre en las células somáticas y genera el desarrollo del tumor. Cualquiera de estos eventos puede corresponder a mutaciones puntuales, deleciones o duplicaciones en el gen Rb localizado en los brazos largos del cromosoma 13 (13q14). Existen pocos reportes de Rb en gemelos monocigotos o dicigotos. En el presente estudio analizamos dos gemelas monocigotas, comprobado por estudios de DNA, en las cuales únicamente una de ellas presentaba Rb. Este hallazgo nos permite suponer que el evento que generó el Rb en la gemela afectada ocurrió postcigóticamente.

Palabras clave: Gen RB1, retinoblastoma, gemelas monocigotas, gene Scan.

SUMMARY

Retinoblastoma (Rb) is the most common malignant tumor of the developing retina in children and occurs between 1 in 13,500 and 1 in 25,000 new born. In general, diagnosis is done at age of 12 month in bilateral cases and at age of 18 months in unilateral cases. Leukocoria, strabismus, unilateral mydriasis and heterochromia are the presenting clinical characteristics. Sixty percent of cases are nonhereditary and unilateral, 15 percent are hereditary and unilateral and 25 percent are hereditary and bilateral. A model suggests two mutational events for tumor generation. The first one can occur in germinal cells of the parents or can be somatically acquired and the second one occurs in somatic cells and leads to Rb. Mutational events correspond to deletion, duplication, or point mutation in the Rb locus at chromosome 13 (13q14). There are few cases of monozygotic twins with retinoblastoma. In the present study we analyzed monozygotic twins with retinoblastoma in which only one of them was affected. Monozygous state was confirmed through DNA analysis. We concluded that mutation in the twin with Rb occurred in a post-zygotic event.

Key words: Gen RB1, retinoblastoma, monozygotic twins, gene Scan.

INTRODUCCIÓN

El retinoblastoma (Rb) es el tumor maligno más frecuente en niños, con una incidencia en el mundo que va de 1 en 13,500 a 1 en 25,000 recién nacidos vivos, sin diferencias significativas entre sexos y razas (1-4). En la mayoría de los casos el primer signo que se presenta es el reflejo característico de ojo

de gato, que muchas veces es referido por los padres del paciente. Este reflejo, denominado leucocoria, es el resultado del crecimiento del tumor en la retina. (5, 6). También pueden presentarse estrabismo, dolor ocular por glaucoma, celulitis orbitaria, midriasis unilateral y heterocromía (7-9). El diagnóstico se realiza en promedio a los 12 meses en los casos bilaterales y a los 18 en los unilaterales; en general, al tercer

¹ Servicios de Oftalmología y ² Genética, Hospital General de México, Facultad de Medicina UNAM. México D.F., México.
Correspondencia: Dr. Sergio Cuevas Covarrubias. Servicio de Genética, Hospital General de México. Dr. Balmis 148, Doctores CP.06726, México D.F., México. Tel (52 55) 5999-6133 ext. 1278, 1279, Email sergioa@servidor.unam.mx

año de vida se ha diagnosticado 90% de los casos. Los estudios histopatológicos muestran la presencia de rosetas y *fleurettes* que se consideran el resultado de la maduración y diferenciación de las células neoplásicas. Aunque la mayoría de los pacientes con Rb se presenta de manera esporádica, actualmente está bien confirmado que los casos hereditarios se transmiten como rasgo autosómico dominante (10-11). Aun cuando se considera que la enfermedad tiene una penetración completa, se ha informado de familias en las cuales el padecimiento salta generaciones (12). En ambos casos, hereditarios y no hereditarios, el Rb es el resultado de la homocigocidad mutacional que se produce en el locus RB1, localizado en 13q14 (13). El gen RB1 está compuesto de 27 exones y produce un transcrito de RNAm de 4.7 Kb (14). No se ha informado de sitios polimórficos en la región del marco de lectura abierto, pero existen variantes polimórficas intrónicas y marcadores microsatélites altamente polimórficos y un minisatélite, ambos correspondientes a regiones de DNA dentro del gen RB1.

Existen pocos reportes de gemelos monocigotos con la presencia de Rb, en estos casos se ha informado de concordancia y discordancia entre ambos gemelos (15-18). En el presente estudio analizamos dos gemelas monocigotas, una de ellas con Rb, en las cuales el estudio molecular de DNA confirmó la monocigocidad entre ambas y el análisis mediante FISH en células periféricas de la gemela afectada descartó la pérdida del gen RB1 aunque no una posible mutación puntual.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes

Las propósitas eran dos gemelas de 2 años de edad que acudieron al servicio de Oftalmología por presentar una de ellas una mancha blanquecina en el ojo izquierdo. Físicamente eran muy parecidas refiriendo sus padres que ambas eran gemelas idénticas. A la exploración física de la paciente afectada se encontró exotropía monocular derecha, segmento anterior sin alteraciones y en la oftalmoscopia se observó masa retrocristaliniana ocupando toda la cavidad vítreo, con vasos en su superficie. El ultrasonido mostró imágenes heterogéneas que ocupaban la totalidad de la cámara vítreo, por una masa sólida, endofítica, mal limitada, con escasas zonas de calcificación (fig. 1). El estudio histopatológico reportó Rb, con invasión superficial a coroides sin evidencia de tumor en el nervio óptico.

Análisis mediante FISH (hibridación *in situ* fluorescente) del gen RB1

Se tomaron de ambas gemelas 5 ml de sangre periférica para obtener DNA y realizar cariotipo en sangre periférica de linfocitos así como para llevar a cabo la hibridación *in situ* (FISH). El DNA se extrajo con métodos convencionales como se refiere previamente (19), el FISH fue realizado con la sonda LSI RB1 en metafases de linfocitos bajo las indicaciones del proveedor y el cariotipo se llevó a cabo mediante técnicas

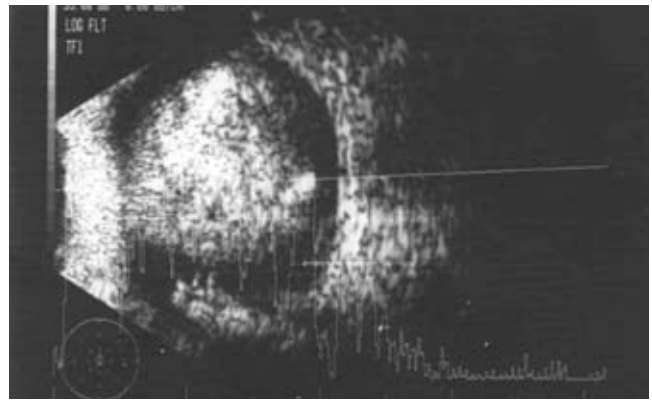


Fig. 1. Ultrasonido del ojo de la paciente donde se observan imágenes heterogéneas ocupando la totalidad de la cámara vítreo.

convencionales. Para confirmar que ambas gemelas eran homocigotas se realizó GeneScan con el DNA obtenido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El resultado del cariotipo mostró un complemento cromosómico 46, XX en ambas gemelas sin observarse alteraciones numéricas ni estructurales (fig. 2). El análisis de distintos marcadores de DNA mediante GeneScan permitió comprobar que ambas gemelas eran monocigotas. El estudio de FISH en linfocitos (fig. 3) mostró hibridación normal con la sonda LSI RB1 en ambos cromosomas 13, lo que permitió descartar la presencia de delección del gen RB1 en este tejido en la paciente afectada. Los estudios de la gemela sin Rb fueron normales.

El análisis citogenético de linfocitos de sangre periférica para Rb en la región 13q14 detecta delecciones o rearrreglos cromosómicos mayores. Sin embargo, esto puede apreciarse únicamente en 5% de los casos con Rb unilateral y en 7.5% de los casos con Rb bilateral. Si el defecto molecular se encuentra en sangre periférica, la posibilidad de que el paciente tenga una mutación germinal es alta. Contrariamente, si la mutación no es encontrada en linfocitos, esta posibilidad se reduce considerablemente. Cabe mencionar que el hecho de no encontrar la mutación en linfocitos reduce pero no elimina la posibilidad de que la mutación se haya presentado en células germinales. En nuestro análisis mediante FISH se observó la presencia de ambos genes RB1 en las gemelas. La presencia Rb en sólo una de las gemelas nos hace suponer que la mutación ocurrió en células somáticas, lo que representaría una discordancia entre ambas gemelas. Existen escasos reportes en distintos padecimientos en los cuales no existe la

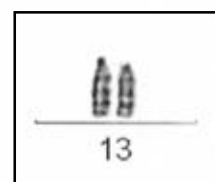


Fig. 2. Cromosomas 13 del cariotipo de la paciente donde se aprecian ambos cromosomas de características normales.

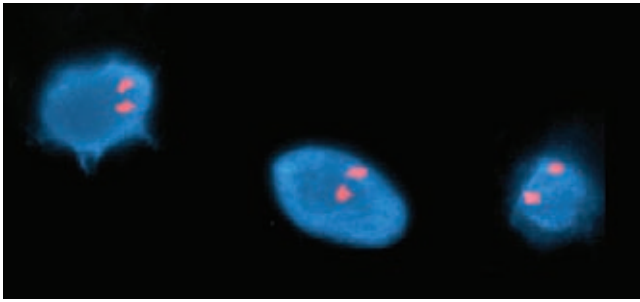


Fig. 3. Estudio de FISH en linfocitos mostrando hibridación normal con la sonda LSI RB1 en ambos cromosomas 13.

concordancia entre gemelos monocigotos. Este efecto representaría la aparición de un evento mutacional somático generado posterior al momento de la división de ambos productos. En el caso de padecimientos con patrón de herencia mendeliana, esperaríamos encontrar en gemelos monocigotos una concordancia de 100%, ya que ambos proceden del mismo óvulo fecundado y por tanto poseen la misma carga genética. Aunque el Rb hereditario se transmite como un rasgo autosómico dominante, es un hecho que ocurre un defecto recesivo a nivel de las células de la retina (21). Independientemente de tratarse o no de un Rb hereditario, el desarrollo de la neoplasia requiere forzosamente de la afectación de ambos alelos, tanto el paterno como el materno. En el caso del Rb hereditario, el defecto de un alelo está presente en todas las células y es producto de una alteración molecular del gen Rb generada en las células germinales, el segundo evento que altera el otro alelo se presenta en las células somáticas, en este caso en la retina, produciendo de este modo el Rb. Cuando se trata de un Rb no hereditario los dos eventos que alteran el gen Rb ocurren en las células somáticas retinianas. Los riesgos en ambos casos son muy diferentes, siendo mayor en el caso del Rb hereditario. Los mecanismos mediante los cuales se presenta el segundo evento mutacional pueden ser una no-disyunción mitótica que condicione la pérdida del alelo silvestre (que corresponde al sano), una no-disyunción mitótica con duplicación del cromosoma mutante, una recombinación mitótica y otros más como conversión génica, delección o mutación.

Con relación a nuestras gemelas, resultaba importante identificar si ambas mostraban el defecto molecular por el riesgo que esto representa. Al tratarse de gemela monocigotas era de esperar que las dos tuvieran la misma carga genética. Sin embargo, únicamente una de ellas presentaba el Rb, lo que hace suponer que el defecto molecular se suscitó durante el desarrollo intrauterino en una de las gemelas, lo que cambia el riesgo en ambas, ya que lo más probable es que se trate de un Rb de tipo esporádico. Cabe considerar que el tiempo de aparición del evento mutacional durante la gestación es otro factor que influye en la determinación del riesgo e incluso de la transmisión del Rb. Cuando este mosaicismo es de aparición más temprana el riesgo es mayor. Establecer correctamente la forma de transmisión del Rb esporádica o hereditaria se traduce entonces en un asesoramiento genético adecuado y en un mejor manejo y cuidado del paciente durante su vida.

Agradecimientos

Este estudio fue apoyado por PAPIIT, DGAPA, UNAM. Proyecto no. IN229905

REFERENCIAS

1. Devesa SA. The incidence of retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 1975; 80:263.
2. Sander BM, Draper GJ, Kingston JE. Retinoblastoma in Great Britain 1969-80: Incidence, treatment and survival. *Br J Ophthalmol* 1988; 75:567.
3. Jensen RD, Miller RW. Retinoblastoma: Epidemiologic characteristics. *New Engl J Med* 1971; 285:307.
4. Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ, Bieber C. The international incidence of childhood cancer. *Int J Cancer* 1988; 42:511.
5. Morgan G. Diffuse infiltrating retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* 1971; 55:600.
6. Nicholson DH, Norton EWD. Diffuse infiltrating retinoblastoma. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1980; 78:265.
7. Francois J. Differential diagnosis of leukocoria in children. *Ann Ophthalmol* 1978; 10:1375.
8. Balmer A, Gaillaud C. Retinoblastoma: Diagnosis and treatment. *Dev Ophthalmol* 1983; 7:36.
9. Binder PS. Unusual manifestations of retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 1974; 77:674.
10. Falls HF, Neel JV. Genetics of retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1951; 151:197.
11. Schappert-Kimmissser J, Hemmes GD, Nijiland R. The hereditary of retinoblastoma. *Ophthalmologica* 1966; 151:197.
12. Warburton D, Anyane-Yebo K, Tataerka P. Deletion of 13q14 without retinoblastoma. A case of non-penetrance. *Am J Hum Genetic* 1986; 39:A137.
13. Dryja TP, Cavenee WK, White RL, Rapaport JM, Peterson R, Albert DM, Bruns GAP. Homozygosity of chromosome 13 in retinoblastoma. *N Eng J Med* 11984; 310:550.
14. Lee WH, Bookstein R, Homg F, Young LJ, Shew JY, Lee EYHP. Human retinoblastoma susceptibility gene: Cloning, identification and sequence. *Science* 1987; 235:1394.
15. Prochazkova D, Konecna P, Cihalova V, Hrstkova H, Rehurek J, Autra R. Retinoblastoma in mozygotic twins. *Cesk Sloc Oftalmol* 2003; 59:134-40.
16. Marcus DM, Papastergiou GI, Patel M, Pandya A, Brooks SE. Discordant retinoblastoma in monozygotic twins. *Am J Ophthalmol* 1999; 128:524-6.
17. Buckley JD, Buckley CM, Breslow NE, Draper GJ, Roberson PK, Mac TM. Concordance for childhood cancer in twins. *Med Pediatr Oncol* 1996; 26:223-9.
18. Verin P, Vildy A, Maurin JF, Saudubray F, Cales R. Retinoblastoma in 2 twin sisters. *Bull Soc Ophthalmol Fr* 1980; 80:311-4.
19. Jimenez-Vaca AL, Valdes-Flores M, Rivera-Vega MR, Gonzalez-Huerta LM, Kofman-Alfaro SH, Cuevas-Covarrubias SA. Deletion pattern of the STS gene in X-linked ichthyosis in a Mexican population. *Mol Med* 2002; 7:845-849.
20. Walker NF. Discordant twins with retinoblastoma and cleft palate. *Am J Hum Genet* 1950; 2:375-84.
21. Knudson AGJR. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1971; 68:820.