

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**“ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL GEN RB1
DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE RETINOBLASTOMA”**

Estudio descriptivo realizado en el Instituto Nacional de Cáncer;
Sección de Genética Humana, Maryland Estados Unidos
de Norte América, en muestras de pacientes de la Unidad
Nacional de Oncología Pediátrica -UNOP- Guatemala

abril – julio 2011

Giovana Bendfeldt Avila

Médico y Cirujano

Guatemala, agosto de 2011

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

**“ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL GEN RB1
DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE RETINOBLASTOMA”**

Estudio descriptivo realizado en el Instituto Nacional de Cáncer;
Sección de Genética Humana, Maryland Estados Unidos
de Norte América, en muestras de pacientes de la Unidad
Nacional de Oncología Pediátrica -UNOP- Guatemala

abril – julio 2011

Tesis

Presentada a la Honorable Junta Directiva
de la Facultad de Ciencias Médicas de la
Universidad de San Carlos de Guatemala

Por

Giovana Bendfeldt Avila

Médico y Cirujano

Guatemala, agosto 2011

El infrascrito Decano de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala hace constar que:

La estudiante:

Giovana Bendfeldt Avila 200410089

ha cumplido con los requisitos solicitados por esta Facultad, previo a optar al Título de Médico y Cirujano, en el grado de Licenciatura, y habiendo presentado el trabajo de graduación titulado:

**“ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL GEN *RBI*
DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE RETINOBLASTOMA”**

**Estudio descriptivo realizado en el Instituto Nacional de Cáncer;
Sección de Genética Humana, Maryland Estados Unidos
de Norte América, en muestras de pacientes de la Unidad
Nacional de Oncología Pediátrica -UNOP- Guatemala**

abril - julio 2011

Trabajo asesorado por el Dr. Federico Guillermo Antillón Klussmann, co-asesor Dr. Eddy René González Flores y revisado por el Dr. Luis Antonio Ríos Méndez, quienes avalan y firman conformes. Por lo anterior, se emite, firma y sella la presente:

ORDEN DE IMPRESIÓN

En la Ciudad de Guatemala, dieciocho de agosto del dos mil once


**DR. JESÚS ARNULFO OLIVA LEAL
DECANO**



El infrascrito Coordinador de la Unidad de Trabajos de Graduación de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, hace constar que la estudiante:

Giovana Bendfeldt Avila 200410089

ha presentado el trabajo de graduación titulado:

**“ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL GEN *RBI*
DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE RETINOBLASTOMA”**

**Estudio descriptivo realizado en el Instituto Nacional de Cáncer;
Sección de Genética Humana, Maryland Estados Unidos
de Norte América, en muestras de pacientes de la Unidad
Nacional de Oncología Pediátrica -UNOP- Guatemala**

abril - julio 2011

El cual ha sido revisado y corregido por el Profesor de la Unidad de Trabajos de Graduación -UTG- Dr. Edgar Rodolfo de León Barillas y al establecer que cumple con los requisitos exigidos por esta Unidad, se les autoriza a continuar con los trámites correspondientes para someterse al Examen General Público. Dado en la Ciudad de Guatemala, el dieciocho de agosto del dos mil once.

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Dr. Edgar Rodolfo de León Barillas
Coordinador



Guatemala, 18 de agosto del 2011

Doctor
Edgar Rodolfo de León Barillas
Unidad de Trabajos de Graduación
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad de San Carlos de Guatemala
Presente

Dr. de León Barillas:

Le informo que la estudiante abajo firmante:

Giovana Bendfeldt Avila



Presentó el informe final del Trabajo de Graduación titulado:

**"ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL GEN *RB1*
DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE RETINOBLASTOMA"**

Estudio descriptivo realizado en el Instituto Nacional de Cáncer;
Sección de Genética Humana, Maryland Estados Unidos
de Norte América, en muestras de pacientes de la Unidad
Nacional de Oncología Pediátrica -UNOP- Guatemala

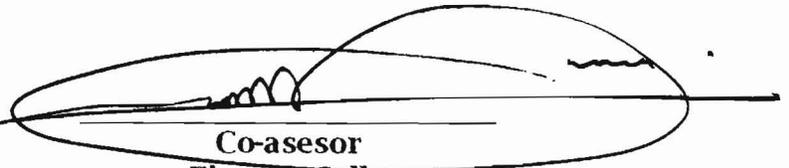
abril - julio 2011

Del cual como asesor y revisor nos responsabilizamos por la metodología,
confiabilidad y validez de los datos, así como de los resultados obtenidos y
de la pertinencia de las conclusiones y recomendaciones propuestas.



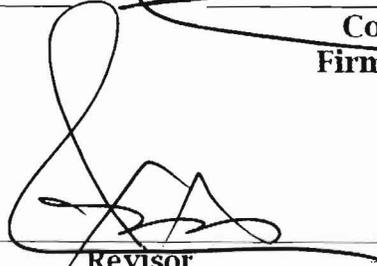
Asesor
Firma y sello

Dr. Federico G. Antillón K.
MEDICO Y CIRUJANO
Colegiado No. 6247



Co-asesor
Firma y Sello

Eddy René González Flores
Médico Genetista
12,225



Revisor
Firma y sello
Reg. de personal 9699

Dr. Luis Antonio Ríos
PROFESOR E. P. S RURAL
FACULTAD CIENCIAS MEDICAS
U.S.A.C

RESUMEN

Objetivo: Caracterizar el patrón de metilación e identificar mutaciones puntuales en el gen *RB1* a partir de muestras tumorales y saliva de pacientes con diagnóstico de retinoblastoma de Unidad Nacional de Oncología Pediátrica.

Metodología: Estudio de tipo descriptivo, en pacientes con diagnóstico de retinoblastoma de Unidad Nacional de Oncología Pediátrica, Guatemala, durante el período 2,000 - 2,009. En el Instituto Nacional del Cáncer (*NCI*), Sección de Genética Humana, Maryland, Estados Unidos de Norteamérica, fueron procesadas las muestras, donde se incluyeron y evaluaron alteraciones genéticas en 35 pacientes con el diagnóstico antes mencionado; de las cuales 17 fueron muestras de saliva, donde se identificaron mutaciones puntuales en el gen *RB1* y 18 muestras tumorales donde se caracterizó el patrón de metilación del mismo gen. **Resultados:** La metilación del promotor del gen *RB1* se detectó en 2/18 pacientes con retinoblastoma; lo que constituye el 11% de los cambios que contribuyen al silenciamiento del mismo gen. Asimismo este estudio identificó que el 100% (1/1) de pacientes con antecedentes familiares analizados en el estudio presentó una delección, 1/2 de los tumores bilaterales (50%) y en alrededor del 20% de los retinoblastomas unilaterales se identificaron mutaciones. **Conclusiones:** Los resultados presentados en este estudio, sugieren que son necesarios otros enfoques para mejorar el diagnóstico molecular del retinoblastoma en nuestros pacientes; asimismo, que otros factores implicados en la génesis del retinoblastoma merecen ser analizados.

Palabras clave: Gen *RB1*, mutaciones, metilación, retinoblastoma.

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. MARCO TEÓRICO.....	5
3.1 Contextualización del lugar de estudio	5
3.2 Antecedentes	8
3.3 Epidemiología.....	10
3.4 Bases moleculares del cáncer	11
3.5 Regulación del ciclo celular.....	13
3.6 Bases genéticas.....	15
3.7 Manifestaciones clínicas y diagnóstico	34
3.8 Tratamiento	36
3.9 Pronóstico	38
4. METODOLOGÍA	39
4.1. Tipo y diseño de la investigación	39
4.2. Unidad de análisis.....	39
4.3. Población y muestra	39
4.4. Selección de los sujetos a estudio	39
4.5. Definición y operacionalización de variables	40
4.6. Técnicas, procedimientos e instrumentos a utilizar en la recolección de datos	41
4.7. Plan de procesamiento y análisis de datos	49
4.8. Alcances y límites de la investigación.....	51
4.9. Aspecto ético de la investigación.....	52
5. RESULTADOS.....	53
6. DISCUSIÓN	63
7. CONCLUSIONES	69
8. RECOMENDACIONES.....	71
9. APORTES.....	73
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
11. ANEXOS.....	81

1. INTRODUCCIÓN

El retinoblastoma es el tumor intraocular maligno más frecuente en la edad pediátrica, y la segunda neoplasia intraocular primaria más frecuente en todos los grupos de edad; el melanoma de coroides ocupa el primer lugar.⁽¹⁾

El retinoblastoma tiene una incidencia aproximada entre 1/15,000-20,000 en niños menores de 5 años y disminuye en relación al incremento de la edad ^(2, 3, 4, 5). Sin embargo, ha sido reportada una mayor incidencia y mortalidad en países en vías de desarrollo, en algunos países de Centro y Sur América, el retinoblastoma es uno de los principales tumores sólidos malignos en edad pediátrica.^(6, *) En este sentido, algunos autores sugieren que la población hispana tiene una incidencia mayor comparada con otras.^(*) No se ha confirmado preferencia alguna relacionada con sexo y grupo étnico ^(7, 8). En Guatemala, la Unidad Nacional de Oncología Pediátrica diagnostica alrededor de 27-30 casos anuales y es la tercera patología más frecuente.^(†)

El retinoblastoma es considerado el paradigma del cáncer hereditario, su estudio ha proporcionado contribuciones significativas al conocimiento de las bases genéticas del cáncer.^(6, 9)

La caracterización genética del gen *RB1* en pacientes guatemaltecos con retinoblastoma es un estudio sin antecedentes. La metilación es un fenómeno fisiológico importante en la regulación de la expresión de los genes, durante la embriogénesis. Entre sus funciones primordiales se encuentran, mantener el silenciamiento genético con el fin de regular adecuadamente la expresión de los genes, y así asegurar un desarrollo normal del ser humano. En la oncogénesis existen patrones aberrantes de metilación:

Los niveles de metilación menores a los esperados, son hallazgos frecuentes en el tejido tumoral; esta disminución en la metilación global parece ser un hallazgo precoz en la tumorigénesis.

* Luna-Fineman S, Castellanos M, Barnoya M. Retinoblastoma en Guatemala: Diagnóstico Temprano Salva Vidas [Documento no publicado] 2010.

† Sage J, Cleary ML, Luna-Fineman S. Retinoblastoma in Central America: Improving Cure Outcomes. [Documento no publicado] 2010.

Tanto el patrón hiper como el hipometilado pueden variar como respuesta a diversos factores: la dieta, polimorfismos genéticos y exposición a agentes químicos; pueden presentarse de manera individual o simultánea. ^(10, 11, 12, 13)

En este contexto, además del interés implícito de la producción de conocimiento, este trabajo es pionero en la caracterización genética de los pacientes guatemaltecos con diagnóstico de retinoblastoma. La caracterización de los patrones de metilación como parte de la oncogénesis y la identificación de nuevas mutaciones nos permitió comparar nuestros hallazgos con los descritos para otras poblaciones respecto al diagnóstico, pronóstico, evolución clínica como la respuesta a la terapia.

Este estudio de tipo descriptivo; persiguió como fin primordial la caracterización del patrón de metilación del gen *RB1*, así como la identificación de mutaciones puntuales en el gen *RB1* a partir de muestras tumorales y de saliva de pacientes con diagnóstico de retinoblastoma de Unidad Nacional de Oncología Pediátrica. Dichas muestras fueron procesadas y analizadas en la Sección de Genética Humana, del Instituto Nacional de Cáncer, *Campus Frederick, Maryland, Estados Unidos de Norteamérica*, en un período de 10 semanas.

Asimismo se recabaron datos de cada uno de los pacientes de bases de datos diseñados específicamente para oncología pediátrica (*POND Pediatric Oncology Network Database*), con el objetivo de obtener una caracterización clínica y molecular de tumores de retinoblastoma diagnosticados en los últimos 10 años en Unidad Nacional de Oncología Pediátrica.

2. OBJETIVOS

2.1 General

Describir alteraciones genéticas en el gen *RB1* de pacientes con diagnóstico de retinoblastoma de Unidad Nacional de Oncología Pediátrica entre el año 2000 y 2009.

2.2 Específicos

2.2.1 Caracterizar el patrón de metilación del gen *RB1* a partir de muestras tumorales de pacientes con diagnóstico de retinoblastoma de Unidad Nacional de Oncología Pediátrica entre el año 2000 y 2009.

2.2.2 Identificar mutaciones puntuales en el gen *RB1* a partir de muestras de saliva de pacientes con diagnóstico de retinoblastoma de Unidad Nacional de Oncología Pediátrica entre el año 2000 y 2009.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Contextualización del lugar de estudio

3.1.1 Instituto Nacional de Cáncer (por sus siglas en inglés, *NCI-National Cancer Institute*)

El Instituto Nacional del Cáncer (*NCI*) fue fundado por El Congreso de los Estados Unidos de Norteamérica, por medio de la Ley del Instituto Nacional de Cáncer del 5 de agosto de 1937, que se convirtió en la creación de lo que es la organización más prestigiosa de investigación sobre cáncer en el mundo. Asimismo, es uno de los 27 institutos y centros que conforman los Institutos Nacionales de Salud (*NIH*), que pertenecen al Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos (*DHHS*).

Las principales responsabilidades del Instituto Nacional del Cáncer, según las define el Decreto del Instituto Nacional del Cáncer, son: la realización y el fomento de investigación del cáncer; la revisión y aprobación de solicitudes para apoyar proyectos prometedores de investigación sobre las causas, diagnóstico, tratamiento y prevención del cáncer; la colección, el análisis y disseminación de los resultados de investigación del cáncer que se realice en los Estados Unidos y en otros países; y el suministro de capacitación e instrucción en el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

Para cumplir con sus responsabilidades, el NCI ha establecido una red nacional que incluye centros oncológicos regionales y locales, médicos especializados en cáncer, grupos cooperativos de investigadores clínicos y grupos de extensión voluntarios y urbanos. Además, el NCI ha creado una infraestructura para la invención, que consiste en mecanismos de apoyo, organizaciones y redes que enlazan a científicos, instituciones, recursos e información. Esta infraestructura proporciona los cimientos de actividades de investigación básica, aplicada y clínica que comprenden todos los aspectos del cáncer como su biología, genética, epidemiología, detección, diagnóstico, tratamiento, prevención, cuidados paliativos y supervivencia.

La infraestructura del Instituto Nacional del Cáncer apoya también programas de capacitación para asegurar la preparación continua de investigadores altamente calificados en ciencias básicas, ciencia clínica,

control de cáncer, y del comportamiento. Cada año los esfuerzos de miles de científicos apoyados por dicha infraestructura producen adelantos científicos en todos los campos de investigación de cáncer. Asimismo, el Instituto ha iniciado programas de control de cáncer para acelerar la aplicación de los conocimientos que se adquieren por medio de la investigación.

El Instituto continúa y amplía los programas para brindar a los médicos y al público en general, información actualizada del tratamiento de los distintos tipos de cáncer e identificar estudios clínicos que pudieran beneficiar a los pacientes, haciendo progresar al mismo tiempo los conocimientos del tratamiento del cáncer.⁽¹⁴⁾

El Instituto Nacional de Cáncer, Campus Frederick (NCI), es uno de los dos campus del NCI, se ubica dentro de Fort Detrick, una base del ejército y forma parte de los Institutos Nacionales de Salud (NIH), los cuales son una dependencia del gobierno federal de los Estados Unidos. Los Institutos Nacionales de la Salud son centros de investigación y desarrollo financiados con fondos federales; son una de las ocho dependencias que componen el Servicio de Salud Pública del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos (U.S. *Department of Health and Human Services*, DHHS, en inglés).

NCI-Frederick funciona como el principal recurso de biotecnología para NCI/NIH, a su vez es importante mencionar que centra en la investigación directa el objetivo de identificar las causas del cáncer, el SIDA y enfermedades relacionadas. Más de 100 científicos se encuentran investigando, los factores moleculares, ambientales y del comportamiento que contribuyen a los diferentes cánceres humanos, así como la identificación de nuevos objetivos para el diagnóstico, tratamiento y prevención del mismo. Debemos resaltar que NCI-Frederick proporciona conocimientos científicos básicos y desarrollo de tecnología avanzada para el NCI, el NIAID (Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas), y otros componentes del NIH a través del Programa de Tecnología Avanzada (ATP) y otros.

El Programa del NCI-Frederick de inflamación y cáncer (CIP), está formado por el Laboratorio de Inmunología Experimental (LEI), junto con el Laboratorio de Inmunorregulación Molecular (LMI).

El LEI conformado por 11 secciones:

- ✓ Sección de Inmunología Molecular
- ✓ Sección de Inmunogenética (HLA)
- ✓ Sección de Inflamación y Tumorigénesis
- ✓ Sección de Modulación Inmune
- ✓ Sección de Señalización de los leucocitos
- ✓ Sección de Biología de Leucocitos
- ✓ Sección de Inmunoterapia molecular
- ✓ Sección de Inmunobiología del Cáncer
- ✓ Sección de Terapias Experimentales
- ✓ Sección de Inmunología Celular y Molecular
- ✓ Sección de Genética Humana: el principal investigador es Dr. Michael Dean, en esta área su principal objetivo es el desarrollo de métodos para el análisis de enfermedades complejas y su aplicación a enfermedades genéticas humanas, tales como el cáncer, infección por VIH y otras enfermedades. El laboratorio de esta sección cuenta con un área que incluyen 2,500 metros cuadrados. Es un laboratorio totalmente equipado con áreas específicas para cultivo de tejidos, aislamiento y extracción de ADN, cuentan con la facilidad para realizar reacción en cadena de polimerasa (PCR), poseen instalaciones básicas de computación, área fría, sala de congeladores, y capacidad para el almacenamiento de las muestras. El equipo de laboratorio molecular de genética humana incluye escáneres de código de barras, un sistema para el seguimiento de la muestra, dos microcentrífugas congeladoras, una campana de humo, dos campanas de bioseguridad, congeladores con temperaturas de -20C y 80C. Equipos de análisis molecular en el laboratorio, incluyen 12 termocicladores (*Applied Biosystems GeneAmp 9700 96*) 384 máquinas de PCR, equipos de electroforesis en gel de agarosa, espectrofotómetro. Asimismo cuentan con un secuenciador *ABI 3700xl* para secuenciación

tradicional. Es decir secuenciar de una muestra con un fragmento de ADN a la vez, la máquina puede trabajar aproximadamente 300 por hora.

Un secuenciador *Roche 454jr* de nueva generación, con el cual se pueden combinar fragmentos y generar 100,000 secuencias al mismo tiempo.

Se dispone de tres servidores Dell para apoyo del laboratorio con el sistema de archivos compartidos, y el sistema de base de datos que se utiliza para el seguimiento de muestras y otros datos para el proyecto. Estos servidores apoyan plenamente las 24 horas del día para la división avanzada de los servicios de información del Centro de Informática Biomédica del Instituto Nacional de Cáncer.⁽¹⁵⁾

3.2 Antecedentes

En el año 1994 se realizó un estudio descriptivo- observacional, en 21 pacientes menores de 12 años con diagnóstico de retinoblastoma, que consultaron a la Unidad de Hematología del Hospital Roosevelt en el período comprendido entre enero de 1987 a diciembre de 1993. Dicha investigación tenía como fin primordial el estudio clínico-genético del retinoblastoma; no se realizó ninguna prueba de diagnóstico genético para el mismo, únicamente una descripción de los antecedentes familiares oncológicos, recolectados en una boleta diseñada especialmente para dicho propósito.⁽¹⁶⁾ En 1997 se realiza un estudio retrospectivo, en el Hospital Rodolfo Robles, titulado "Características epidemiológicas y clínicas del retinoblastoma", donde se obtuvieron 21 casos nuevos durante el período comprendido entre 1988-1996, de los cuales se excluyeron dos del estudio por no cumplir los criterios de inclusión.

En dicho estudio se encontró que en un 42% el diagnóstico fue realizado al año de vida, y en un 73% la presentación del retinoblastoma fue unilateral. El estudio se enfatizó principalmente en la clínica, epidemiología, manejo y pronóstico de estos pacientes.⁽¹⁷⁾

Recientemente en México, se realizó la búsqueda de alteraciones estructurales en el gen *RB1* en pacientes pediátricos con retinoblastoma. En dicho estudio se

analizaron 19 casos, de los cuales: tres eran del tipo hereditario y 16 no hereditario. Un hallazgo importante fue el encontrar cinco mutaciones puntuales en pacientes sin antecedentes hereditarios.⁽¹⁸⁾ Varios son los investigadores que constantemente emprenden la búsqueda desde nuevos enfoques, para obtener mayor información del paradigma que representa el cáncer en la población pediátrica.

Países en desarrollo y países tropicales, de acuerdo con registros poblacionales, presentan una mayor incidencia de retinoblastoma. En Asia, se realizó un estudio del estado de metilación del promotor *RB1* en pacientes con retinoblastoma, dicho estudio muestra que la metilación del promotor, no es un mecanismo importante para los pacientes con retinoblastoma en la India, sin embargo el análisis del estado de metilación resulta sumamente útil en el asesoramiento genético de las familias afectadas. ^(7, 19)

Otro estudio publicado en Argentina en el 2009, persiguió como objetivo principal evaluar la importancia de la detección de mutaciones en el gen *RB1* para el asesoramiento genético de las familias argentinas con retinoblastoma. Los resultados de la investigación demostraron la importancia de contar con Acido Desoxirribonucleico (ADN) del tumor, al momento de realizarse la enucleación, asimismo contribuyó el estudio a dar un adecuado asesoramiento genético a los pacientes y sus familias.⁽²⁰⁾ Sin embargo, el avance en los métodos de detección y tratamiento del retinoblastoma, han contribuido a que la cantidad de enucleaciones disminuya progresivamente y por ende dificulte la obtención de muestras tumorales para poder aislar de las mismas el ADN.

De acuerdo a lo descrito anteriormente podemos observar que varios son los países que se encuentran en constante actualización de los avances que ofrece la biología molecular y persiguen obtener un diagnóstico genético-molecular de sus poblaciones; actualmente en Guatemala no se cuenta con un diagnóstico genético-molecular de los pacientes diagnosticados con retinoblastoma, con el cual poder: brindar una clasificación más precisa de la forma de presentación de la neoplasia, identificar familias con riesgos genéticos elevados de transmitir la susceptibilidad tumoral, correlacionar fenotipo-genotipo y los efectos sobre el tratamiento de elección para cada uno de los pacientes.

3.3 Epidemiología

El retinoblastoma es un tumor embrionario, de origen retiniano, que se manifiesta en la infancia.⁽²⁾ Representa alrededor del 4% de los cánceres en niños y más o menos 1% de todos los cánceres.⁽²¹⁾

El retinoblastoma posee una incidencia en Estados Unidos y Europa de 4 casos por millón de niños menores de 14 años. Un estudio realizado en México, de la incidencia de los cánceres infantiles ha revelado diferencias en la incidencia del retinoblastoma en ciertas regiones del país, con una mayor incidencia en Chiapas; región fronteriza con Guatemala.⁽²²⁾ Según datos del censo poblacional del año 2002, el retinoblastoma en Guatemala tiene una incidencia de 5 casos por millón de habitantes; misma incidencia reportada para Chiapas. En cuanto a etnias, la incidencia en ladinos es mayor (6 casos por millón al año), mientras que en indígenas es de 3 casos. En el Departamento de Guatemala la incidencia para ambas etnias; ladina e indígena, es alta; 8 y 7 casos respectivamente.[‡]

Estudios de retinoblastoma en México y otros países en vías de desarrollo han encontrado evidencia de cepas patógenas del virus del papiloma humano, sin embargo otros estudios no han podido confirmarlo.^(23, 24) Otro estudio relacionado con la dieta e incidencia de retinoblastoma, en pacientes mexicanos, reporta la deficiencia de ácido fólico como cofactor. Un estudio realizado en Brasil encontró una asociación con la metionina sintasa (MTR), que participa en el metabolismo de ácido fólico, y el retinoblastoma.^(25, 26)

El retinoblastoma no presenta preferencia alguna por género ni etnia. Tampoco presenta predilección por alguno de los ojos. La edad media de diagnóstico es a los 18 meses; en el caso de los tumores bilaterales (12 meses) y en quienes padecen tumores unilaterales (24 meses). En los Estados Unidos se diagnostican aproximadamente 300-350 casos nuevos cada año y alrededor del mundo se estima que son diagnosticados 5,000 a 8,000 casos nuevos anualmente.^(1, 2, 3, 5, 10, 11, 21)

Ha sido reportada una mayor incidencia y mortalidad en países en vías de desarrollo, y en algunos países de Centro y Sur América, el retinoblastoma ocupa

[‡] Datos obtenidos del POND (Pediatric Oncology Network Database) en el mes de julio de 2011. Unidad de informática, Unidad Nacional de Oncología Pediátrica.

los primeros lugares de los tumores sólidos malignos más comúnmente diagnosticados. En este sentido algunos autores sugieren que la población hispana tiene una incidencia mayor comparada con otras.^(6, 4, 27)

3.4 Bases Moleculares del Cáncer

En las últimas dos décadas, se ha avanzado significativamente en los mecanismos moleculares por los que una célula sana se transforma en maligna.

Definimos al cáncer como una familia de enfermedades que se desarrolla a partir de acumulación y selección sucesiva de alteraciones tanto genéticas como epigenéticas, por medio de las cuales las células son capaces de replicarse, eludir mecanismos reguladores de apoptosis, proliferación y del ciclo celular.

El cáncer es un problema mundial de salud pública y es considerado una de las principales causas de mortalidad humana. Sin embargo a nivel celular es un acontecimiento sumamente raro; el cáncer se produce por proliferación descontrolada de una sola célula, por lo que es considerado monoclonal. Asimismo es una enfermedad genética, debido a que el patrón genético de la célula se ve modificado cualitativa o cuantitativamente y su origen se debe a la acumulación de distintos defectos genéticos en las células.^(7, 28, 29)

Podemos definir a la inestabilidad genética de los tumores humanos como inestabilidad de microsatélites (MIN); debido a errores en la polimerasa y la inestabilidad cromosómica (CIN); resultado de errores en el posicionamiento de los cromosomas. La célula tumoral debe mantener un nivel de inestabilidad tumoral que sea capaz de permitir la acumulación de alteraciones que otorga la ventaja adaptativa a la célula pretumoral y a su vez continúe permitiendo su viabilidad.

A nivel cromosómico algunas de las manifestaciones de la inestabilidad genética son aneuploidía, deleción, translocación, recombinación, cromosomas DM (*Double Minutes*) y HSR (*Homogeneously Staining Regions*), en tanto que a nivel molecular hablamos de mutaciones puntuales, deleción, inserción, amplificación, inestabilidad de microsatélites y alteraciones de la reparación.

Uno de los mayores aportes de la biología molecular en el cáncer ha sido determinar que la información genética en las células cancerígenas no es la misma que la encontrada en los mismos tejidos sanos, debido que identifica elementos diferenciales entre las células sanas y tumorales.

Una célula para dar origen a un clon tumoral requiere de varios cambios, uno de los principales es que la primera (s) alteraciones genéticas den una ventaja sobre la célula tumoral en contraste con las no tumorales.

Los "genes del cáncer" se pueden clasificar dentro de las siguientes categorías:

- a) Oncogenes: son promotores del crecimiento y por lo general de naturaleza dominante, algunos son de origen viral y son copias de proto-oncogenes mutadas, los cuales tiene como fin primordial participar a todo nivel de las vías de señalización celular o regular el ciclo celular.
- b) Genes de Supresión Tumoral: son por naturaleza recesivos; ambos alelos deben presentar alteración para condicionar el fenotipo tumoral y con frecuencia se pierde una de las copias mediante LOH (*loss of heterozygosity*) o por delección hemicigota, en tanto la otra es anulada por medio de mutación puntual, delección o mecanismos epigenéticos.

Los genes supresores de tumor de acuerdo a su función los podemos clasificar en:

- 1. *Gatekeepers*: implicados en la proliferación o cualquier otra propiedad celular que secundario a supresión o inactivación de la misma desencadene la expansión clonal y el desarrollo tumoral.
 - 2. *Caretakers*: implicados en el mantenimiento de la integridad del genoma y del nivel crítico de inestabilidad genética.
- c) Genes reparadores: son encargados de codificar proteínas que tiene como función primordial la corrección de los errores que se originan durante la replicación del ADN, por tanto la alteración de estos genes favorece la acumulación de mutaciones en otros genes involucrados en el desarrollo de tumores.⁽⁷⁾

3.5 Regulación del Ciclo Celular

Definimos al ciclo celular como el intervalo entre cada división celular, se encuentra conformado por cuatro fases puntuales y rigurosamente reguladas; G1 (gap1), S (síntesis del ADN), G2 (gap 2) y M (mitosis/meiosis). El ciclo celular normal es el encargado de la replicación del ADN durante la fase S de manera veraz, así como de la segregación del ADN duplicando a las células hijas durante la fase M.⁽²⁸⁾

En fase G0 residen las células mamíferas quiescentes que no se encuentran en crecimiento, dicha fase es considerada un estado de reposo. La armonía entre estos mecanismo, coordina el crecimiento en los tejidos, por tanto su alteración o inestabilidad es capaz de generar un tumor.

Como mecanismo compensatorio para la detección del daño en el ADN, la célula ha desarrollado sistemas de vigilancia, los cuales a su vez favorecen la reparación del ADN a través de puntos de control o *checkpoints*, logando de esta manera conservar el equilibrio del material genético.⁽⁷⁾

El punto de restricción o R es el principal punto de control, el cual tiene lugar en las fases G1/S; se encuentra respaldado por señales extracelulares, debido a que en omisión de señales mitógenas las células realizan una parada a nivel de G1/S y no se realiza la división.

Los puntos de control son pausas en el ciclo celular, durante los cuales se confirma la duplicación del ADN y acepta editar y restaurar la información genética que cada una de las células hijas obtiene.

Estudios genéticos han identificado a *cdc2*, conocido como gen crítico, el cual es el encargado del control de la progresión del ciclo celular y su producto genético; es quien regula la transición de la fase S y M. En la actualidad se conocen homólogos de *cdc2*, llamados cinasas dependientes de ciclinas (CDKS).

Las ciclinas se sintetizan en el transcurso de la interfase y son destruidas al final de la mitosis. Las CDKS se dividen en dos clases de acuerdo a su función: ciclinas B1 y B2 quienes actúan a nivel de G2/M y las ciclinas C, D y E, actúan en G1/S. Durante la fase S a la M encontramos presente a la ciclina A.

La función de la familia de genes supresores de tumores, que están comprometidos en la regulación del ciclo celular anormal, es evitar el avance del ciclo celular al obstaculizar con la activación de ciclinas/cinasas dependientes de ciclinas. p21, p27 y p16 son consideradas las principales proteínas inhibidoras de cinasas de cdk y son quienes paralizan el crecimiento en ausencia de factores de crecimiento.

Las ciclinas B son indispensables para estar presentes en la mitosis, así como su degradación que tiene lugar en el cambio entre la metafase y anafase, es crucial para abandonar la misma. De presentar alguna mutación las ciclinas, estas no pueden degradarse y son retenidas en la metafase. Poco antes que tenga lugar la destrucción de la ciclina B, la ciclina A es sintetizada durante la fase S y degradada durante la metafase. De presentar alguna mutación la ciclina A, se detiene la progresión de la fase S y M. La ciclina A se asocia a proteínas reguladoras del crecimiento celular, entre los más importantes cabe resaltar, el producto del gen del retinoblastoma (*RB1*), el factor de transcripción E2F y la oncoproteína del adenovirus E1A.

En cuanto a las ciclinas C,D y E debemos mencionar que se expresan específicamente durante las fases G1 y S, las ciclinas E se asocian con cdk2 y el complejo E-cdk2 a su vez se vincula con otras proteínas reguladoras celulares con Rb y E2F. En tanto las ciclinas D se combinan con cdk2, 4 y 5 y el complejo ciclina D-cdk4 o el de la ciclina E-cdk2 fosforilan específicamente el producto del gen *RB1*, que provoca la liberación de factores de transcripción, como E2F, c-abl entre otros, los cuales estimulan la transcripción de diferentes genes que impulsan la progresión a través de G1 y que son indispensables para la síntesis de ADN.

Uno de los mayores progresos en cuanto al conocimiento del cáncer ha sido explorar que las mismas moléculas que presiden el ciclo celular normal pueden proceder como oncogenes (ciclinas y CDKs) o genes supresores de tumores (*RB1*, etc).^(7, 28) En la Figura 3.1 se presenta el prototipo de los eventos más importantes del ciclo celular.

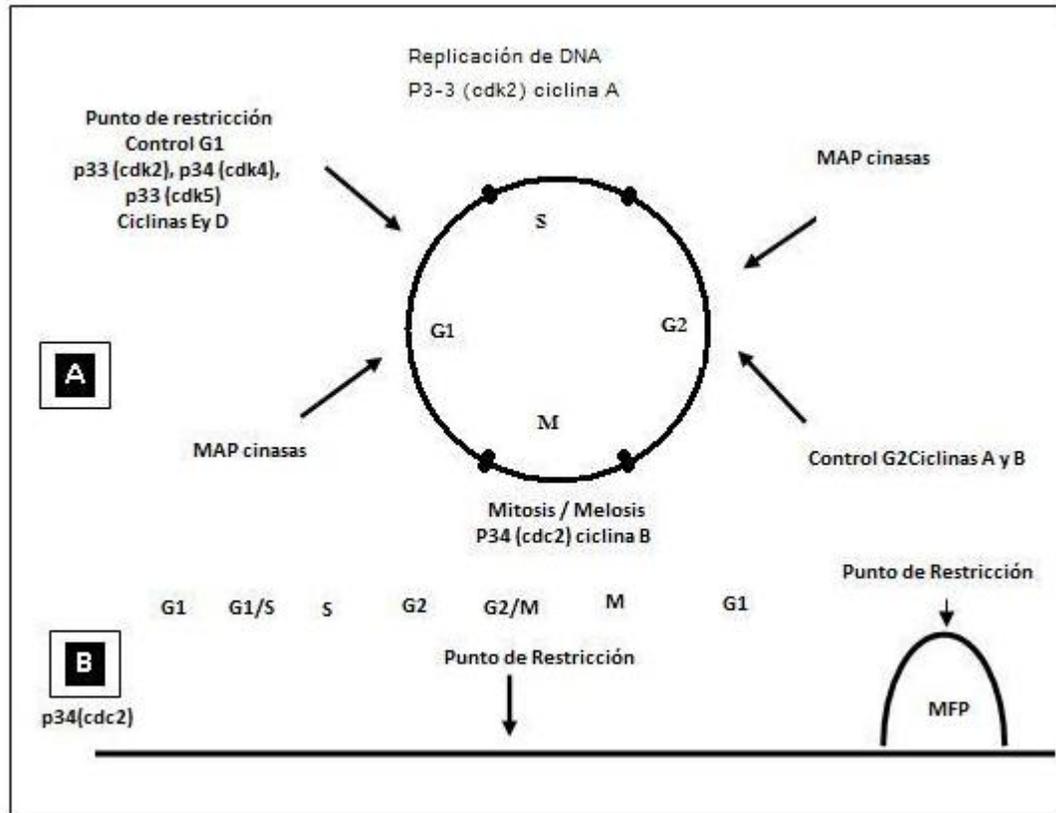


Figura 3.1 Representación esquemática del ciclo celular y sus puntos de restricción.

Fuente: Tomado de Meza-Junco J, Montañó-Loza, Aguayo-González. Bases moleculares del cáncer. Rev Invest Clin 2006; 58 (1): 56-70

3.6 Bases Genéticas

La genética es el nuevo paradigma del proceso salud-enfermedad. Un área de la ciencia con evolución exponencial que nos lleva a extender nuestro conocimiento y a reinterpretar el desarrollo fisiopatológico desde nuevos y mejorados conceptos.

El estudio del retinoblastoma ha contribuido de forma valiosa a la obtención de información sobre las bases genéticas del cáncer. El gen del retinoblastoma *RB1*, fue el primer gen supresor de tumores clonado y estudiado.⁽³⁰⁾

En la oncogénesis participan tres grupos de genes: los supresores de tumores, los oncogenes y los micro-RNA. La forma hereditaria del retinoblastoma representa el 40% de su incidencia. Es una enfermedad con un patrón de herencia mendeliano autosómico dominante: El retinoblastoma puede presentarse de forma hereditaria en un 40% y no hereditaria o esporádica en el 60% de los

casos. En la variante familiar, el fenotipo tumoral segrega de forma dominante con un 90% de penetrancia.⁽⁵⁾

En los años 70, Alfred C. Knudson Jr predice que la existencia de dos mutaciones consecutivas que afectan a ambos alelos del gen *RB1* de una misma célula:

- ✓ Retinoblastoma Hereditario (40%): La primera mutación aparece en la línea germinal, provocando un retinoblastoma multifocal, bilateral, como consecuencia de que la segunda mutación puede ocurrir en varias células, de manera muy excepcional puede presentarse un tumor unilateral. Los pacientes que portan una mutación en la línea germinal están predispuestos a desarrollar varios tipos de neoplasias.
- ✓ Retinoblastoma Esporádico (60%): La segunda mutación ocurre únicamente en los retinoblastos (somática), los tumores siempre son unilaterales, unifocales y no existe posibilidad de transmisión de la enfermedad a la descendencia, debido a que las mutaciones en el gen *RB1* se encuentran únicamente presentes en las células formadoras del tumor (Fig. 3.2).^(2, 5, 20, 31, 32, 33)

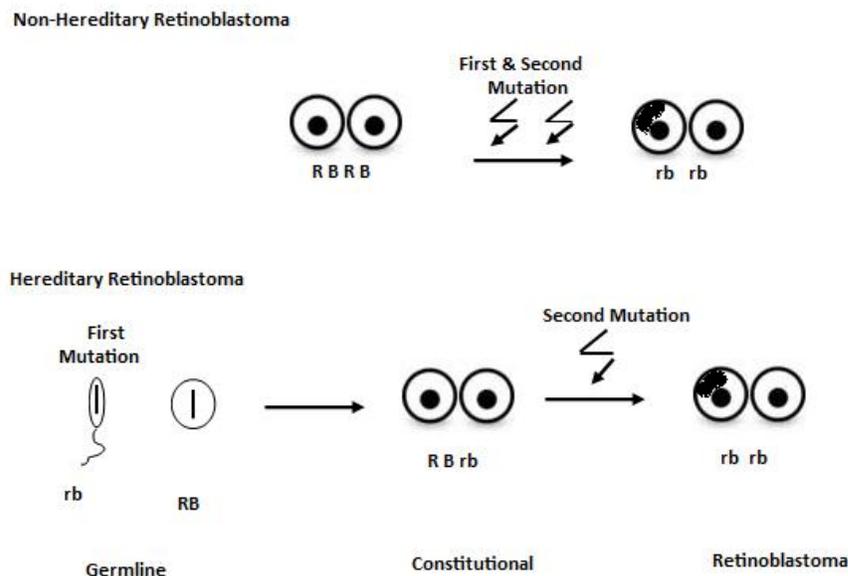


Figura 3.2 Tipos de Retinoblastoma. Fuente: Modificado de [Sede Web]. Seattle: University of Washington; 1993 [actualizada el 10 de junio de 2010; Accedido el 15 de marzo de 2011]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1452/>.

3.6.1 Código Genético

La Operación del Genoma Humano es el proyecto más ambicioso de este siglo. El objetivo que persigue este proyecto ha sido descifrar a través del ADN el mapa genético del ser humano.⁽³⁴⁾ El Genoma Humano esta compuesto por 4 distintos tipos de bases nitrogenadas: Adenina (A), Guanina (G), Citosina (C) y Timina (T). Las bases son complementarias dos a dos (T:A y C:G) dado que cada hebra de ADN viene apareada con otra hebra complementaria.⁽³⁵⁾

El código genético es un sistema mediante el cual la secuencia de nucleótidos de ADN codifica la información para elaborar proteínas. Las palabras del código, o codones; son tripletes de nucleótidos que especifican aminoácidos. El código genético establece la relación existente entre las 4 bases nitrogenadas, presentes en los nucleótidos que constituyen los ácidos nucleicos, y los 20 aminoácidos en que se basan las proteínas. Con cada una de las letras de las bases nitrogenadas, existen cuatro palabras posibles, 16 palabras posibles con dos letras y 64 posibles palabras con tres letras. Debido a que se deben especificar 20 aminoácidos diferentes, los codones deben contener cuando menos 3 nucleótidos sucesivos.⁽³⁶⁾

Un nucleótido solamente forma parte de un triplete y, por consiguiente, no forma parte de varios tripletes, lo que indica que el código genético no presenta superposiciones. Por tanto, el código es no solapado.

Los estudios realizados hasta la fecha indican que el código genético es universal, de manera que un determinado triplete o codón lleva información para el mismo aminoácido en diferentes especies.^(34, 35, 36)

El código genético nos indica que aminoácido corresponde a cada triplete o codón del ARN mensajero. El triplete de iniciación suele ser AUG que codifica para Formil-metionina. También pueden actuar como tripletes de iniciación GUG (Val) y UGG (Leu) aunque con menor eficacia.

Existen tres tripletes sin sentido o codones de terminación (FIN) que no codifican para ningún aminoácido: UAA, UAG y UGA. La mayoría de los aminoácidos están determinados por más de un triplete, excepto la

metionina (AUG) y el triptófano (UGG) que son los únicos que poseen un solo triplete.^(34, 36)

El desciframiento del código genético dio como resultado la siguiente asignación de aminoácidos a los 64 tripletes (Figura 3.3).

		Segunda Letra				
		U	C	A	G	
Primera letra (extremo 5')	U	UUU	UCU	UAU	UGU	U
		UUC } phe	UCC	UAC } tyr	UGC } cys	C
		UUA } leu	UCA	UAA detención	UGA detención	A
		UUG } leu	UCG	UAG detención	UGG trp	G
	C	CUU	CCU	CAU	CGA	U
		CUC } leu	CCC	CAC } his	CGC } arg	C
		CUA } leu	CCA } pro	CAA } gln	CGA } arg	A
		CUG } leu	CCG } pro	CAG } gln	CGG } arg	G
	A	AUU	ACU	AAU	AGU	U
		AUC } ile	ACC	AAC } asn	AGC } ser	C
		AUA } ile	ACA } thr	AAA } lys	AGA } arg	A
		AUG } met	ACG } thr	AAG } lys	AGG } arg	G
	G	GUU	GCU	GAU	GGU	U
		GUC } val	GCC	GAC } asp	GGC } gly	C
		GUA } val	GCA } ala	GAA } glu	GGA } gly	A
		GUG } val	GCG } ala	GAG } glu	GGG } gly	G
						Tercera letra (extremo 3')

Figura 3.3 El Código Genético. Fuente: Modificado de Utilización de la información genética: de la transcripción a la traducción. En Karp G. Biología celular y molecular. México: McGraw-Hill Interamericana; 1998: p. 434-487.

Las abreviaturas de los aminoácidos del código genético, corresponden a los 20 aminoácidos; Fenilalanina (phe), Leucina (leu), Isoleucina (ile), Metionina (met), Valina (val), Serina (ser), Prolina (pro), Treonina (thr), Alanina (ala), Tirosina (tyr), Histidina (his), Glutamina (gln), Asparagina (asp), Lisina (lys), ácido aspártico (asp), ácido glutámico (glu), Cisteína (cys), Triptófano (trp), Arginina (arg), Glicina (gly).⁽³⁶⁾

3.6.2 Gen *RB1*

El gen *RB1* se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 13, región q14.2; (Figura 3.4) fue el primer gen supresor de tumor en ser descubierto, y clonado en 1987. Es uno de los genes más relacionados con el retinoblastoma.^(7, 37) Varios autores coinciden en que entre un 17 a 83% de los pacientes con retinoblastoma presentan alguna alteración en el gen *RB1*.

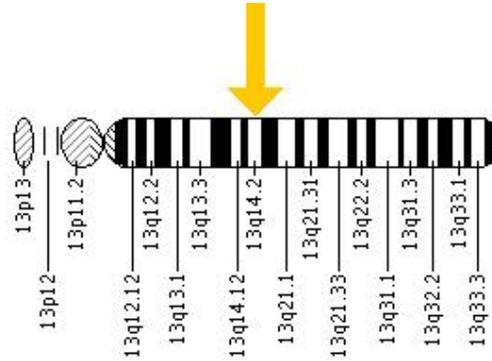


Figura 3.4 Localización del Gen RB1. Fuente: Genetics Home Reference [Sede Web] Maryland; 2009 [fecha de acceso 15/mar/11]. RB1 [6].<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/RB1>

Este gen consiste en aproximadamente 200 kilobases (kb) de ADN dividido en 27 exones y 26 intrones, dos de los intrones en este gen son extremadamente grandes, 35 y 70 kb.

El ARN del gen *RB1* codifica una fosfoproteína, de 4.7 kb, de 928 aminoácidos llamada pRB, (producto del gen del retinoblastoma), localizada en el núcleo,⁽³⁸⁾ la cual funciona como un componente central de los mecanismos reguladores del ciclo celular. Se ha demostrado que la pRb está formado por 6 dominios: 1) el dominio amino terminal, incluye los aminoácidos del 1 al 395 2) el dominio A, este abarca del aminoácido 395 al 579 3) el dominio B, de los aminoácidos 639 al 771, estos dos dominios forman el dominio bolsa A/B. Entre A y B se forma el dominio inserto que incluye los aminoácidos 579 al 639 4) El dominio carboxilo terminal incluye los aminoácidos 771 al 928; 5) una señal de localización nuclear (NSL) y 6) una región que es hidrolizada por la familia de las caspasas durante la respuesta a la muerte celular, pRb, está involucrada tanto en el ciclo celular como en la apoptosis.⁽¹⁸⁾

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 A/B y al extremo carboxilo terminal. La regulación de la fosforilación de pRb es esencial para la replicación celular del ADN y progresión del ciclo celular. Cuando la

pRB no esta fosforilada se une a E2F, y al estar fosforilada libera E2F permitiendo así la activación de la expresión génica.⁽³⁹⁾

El gen *RB1* se encuentra implicado en varios procesos celulares fundamentalmente importantes; el ciclo de división de la célula, respuestas de estrés celulares, diferenciación, y la muerte celular programada, entre otros.^(10, 20, 30, 40, 41)

Las principales enzimas que participa en la fosforilación de pRb son las cinasas dependientes de ciclinas (cdks), las cuales solo son activadas al estar asociadas a la ciclina, debido a que sus niveles oscilan a lo largo del ciclo celular. Cdk4 y ckd6 participan en la transición de fase G1 a fase S y se asocian a ciclinas D1,D2 y D3, las cuales se expresan posterior a recibir estímulos mitogénicos, al asociarse a las cinasas se produce la hiperfosforilación de pRb.⁽³⁹⁾

La función principal de la pRB es regular negativamente la progresión de G0 a G1 y S en el ciclo celular.⁽⁴²⁾ Su habilidad de regular el ciclo celular se correlaciona con su estado de fosforilación, la cual es máxima al inicio de la fase S y más baja luego de la mitosis y a la entrada de G1. La estimulación de células inactivadas con mitógenos induce la fosforilación de pRB, la diferenciación induce hipofosforilación. Es por tanto la forma hipofosforilada de la pRB la que suprime la proliferación celular. La pRB es también uno de los sustratos más significativos de los complejos ciclina-CDK G1 que regula la progresión a través del ciclo celular. La pRB forma un complejo con los factores de transcripción de la familia E2F, lo que resulta en la inactivación de E2F. Cuando la pRB es fosforilada por el complejo ciclina-CDK se libera de E2F lo que permite que E2F active la transcripción de genes. En el contexto del ciclo celular, el E2F incrementa la transcripción de las ciclinas de la fase S así como también lleva al incremento de su propia transcripción (Figura 3.5).^(38, 42)

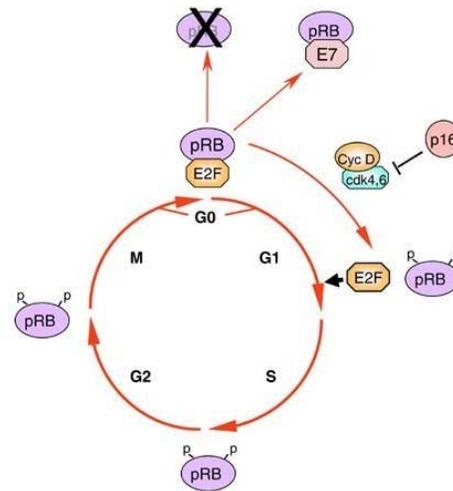


Figura 3.5 Ruta de la Proteína del Retinoblastoma (pRb). Fuente: <http://www.nature.com/onc/journal/v24/n17/full/1208619a.html>

Vale la pena mencionar que *RB1* pertenece a la familia de genes supresores de tumor, los cuales contribuyen a regular el crecimiento normal de la célula, puesto que codifican una proteína que se encarga de regular de forma negativa la proliferación de las células.^(30, 40, 43)

La inactivación del gen *RB1*, lleva a la pérdida de expresión de pRB, lo cual permite una función consecutiva de E2F y una proliferación celular desorganizada.

Aun cuando el retinoblastoma es el cáncer intraocular más frecuente en niños, no existe ningún estudio en nuestro país.

3.6.3 Epigenética:

El método ideal para el diagnóstico de cáncer continúa siendo la observación de los cambios morfológicos en las células tumorales al compararlas con sus equivalentes normales.

Definimos a la epigenética como los cambios reversibles del ADN y las proteínas que se unen a él, y hacen que unos genes se expresen o no en función de condiciones externas.

Estos cambios reversibles generan trastornos genéticos que pueden ser heredados de una generación a otra y contribuir al desarrollo de enfermedades. Asimismo juegan un papel fundamental en el envejecimiento celular y en el cáncer.

De los cambios epigenéticos, la metilación del ADN es el más frecuente e importante hasta ahora estudiado, en tumores.^(11, 44)

3.6.3.1 Metilación del ADN

La disrupción en las vías de señalización celular en la oncogénesis participa tanto cambios genéticos como epigenéticos. En la última década, se ha observado que las alteraciones epigenéticas adquiridas; a) hipometilación del DNA, b) hipermetilación de islas CpG de promotores y c) patrones alterados de modificación de histonas, conjuntamente con las alteraciones genéticas, participan en todas las etapas del desarrollo de un tumor. Dichas alteraciones dan como resultado el silenciamiento de genes reguladores importantes para la proliferación celular normal.^(45, 46)

La metilación es un fenómeno fisiológico importante en la regulación de la expresión de los genes, durante la embriogénesis. Existen en todos los seres vivos y no es más que una reacción química en donde un grupo metilo (CH₃-), se suma a una molécula, gracias a la ADN Metiltransferasa; encargada de catalizar dicha adición a la posición 5' de la citosina del complejo CpG (regiones ricas en citosina y guanina). 50-70% de todos los sitios CpG en humanos se encuentran metilados. La 5-metilcitosina se genera cuando un grupo metilo de S-adenosilmetionina se adhiere en la posición 5 del anillo pirimidínico de citosina. Este proceso es catalizado por la actividad enzimática de las ADN metiltransferasa (DNMTs).

Durante la replicación del ADN, fase S el patrón de metilación de la hebra de ADN parental es copiado a la hebra recién sintetizada por una metiltransferasa de mantención DNMT1, de forma que la metilación se hereda tras la división celular.⁽⁴⁵⁾

Sin embargo, en células madres y cancerosas, la metilación de ADN previamente no metilado puede ocurrir. A esto se le conoce como metilación *de novo* y es mediado por DNMT3a y DNMT3b.⁽⁴⁷⁾ El proceso que inicia este fenómeno aún se desconoce.

La metilación del DNA es también la base de la inactivación del cromosoma X y de la impronta génica; modificación epigenética que permite que solo el alelo materno o paterno de un gen se exprese. En ambos procesos está implicado CTCF, un importante organizador de la cromatina y regulador epigenético de genes implicados en cáncer. CTCF aparece desregulado en algunos tumores y participa en la regulación epigenética de genes implicados en cáncer como el *RB1*.⁽⁴⁸⁾

En el caso específico de *Rb1*, se ha observado que la privación de unión de CTCF a una isla CpG del promotor se correlaciona con la integración de proteínas de unión al ADN metilado y de componentes represores de la cromatina, impulsándose su silenciamiento epigenético.⁽⁴⁹⁾ Asimismo se ha sugerido que CTCF resguarda de la hipermetilación anormal del promotor de *RB1* y, posiblemente, de otros genes supresores de tumor.⁽⁴⁸⁾

El silenciamiento epigenético de la transcripción génica, esta mediada por una serie de eventos moleculares que causan la remodelación de la configuración de la cromatina. El nucleosoma es la principal estructura de la cromatina en eucariotas, consiste en más o menos 146 pares de bases de ADN envueltas alrededor de un octómero de histonas, dos de cada tipo; H2A, H2B, H3 y H4.

Una buena parte de la cromatina se encuentra en un estado transcripcionalmente no apto, en el que el nucleosoma esta fuertemente compactado, formando lo que denominamos

heterocromatina, en el caso contrario, la eucromatina es accesible a la maquinaria de la transcripción, son regiones relativamente dispersas poco condensadas que ocupan la mayor parte del núcleo. Las citosinas metiladas de los promotores silenciados se unen a un grupo específico de proteínas represoras, las proteínas que se unen a los dominios de unión de los CpG metilados o *methyl-CpG-binding-domain proteins* (MBDs), en un complejo que incluye la histona desacetilasa (HDAC), quien juega un papel crucial en la regulación de la transcripción debido a su capacidad de remover los grupos acetilo de los aminoácidos en los extremos N-terminal, o colas de las histonas.

Este proceso esta involucrado en la condensación del nucleosoma de la heterocromatina o "cromatina cerrada". Las histonas hipoacetiladas son también características del silenciamiento temporal de los genes en las regiones de eucromatina. En los promotores transcripcionalmente activos con citosinas no metiladas, las histonas son acetiladas por una histona acetiltransferasa (HATs), que forma un complejo activador de la transcripción, con factores de la transcripción y proteínas coactivadoras.⁽⁵⁰⁾ (Fig.3.6)

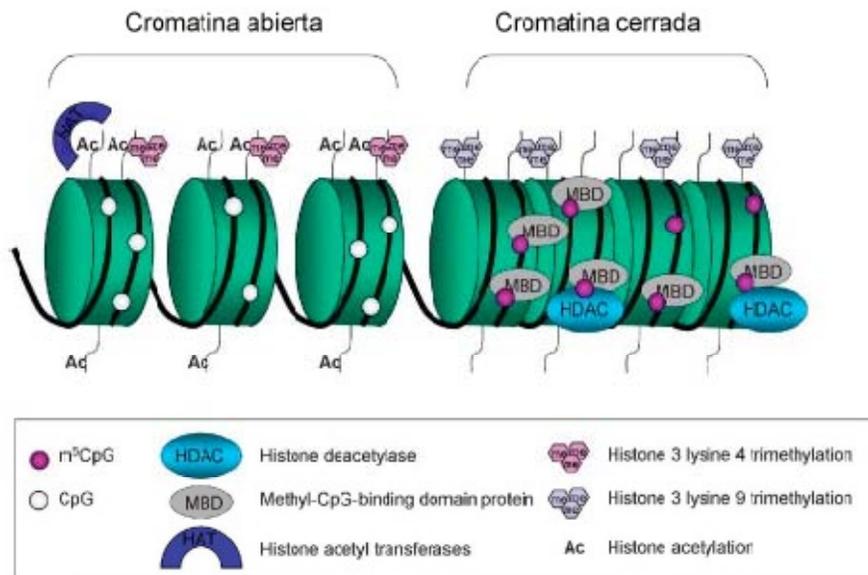


Figura 3.6 Estructura de la cromatina. Fuente: Tomada de Grønbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. APMIS 2007;115:1038-58.

El estado de metilación de las citosinas es fundamental en la formación del cáncer de varias formas:

- ✓ Puede modificar las regiones codificadoras de genes generando puntos de mutación.
- ✓ La disminución generalizada de 5 metilcitosina en el genoma puede causar inestabilidad.
- ✓ Hipermetilación focal de áreas promotoras de los genes puede inactivar su transcripción.
- ✓ Las células cancerosas en general presentan un bajo contenido en 5-metil citosina. Dicha hipometilación se da principalmente en elementos repetitivos del DNA lo que es capaz de propiciar inestabilidad genómica y deleciones o translocaciones cromosómicas.
- ✓ El silenciamiento génico por hipermetilación de CpG en las regiones promotoras de los genes supresores de tumores es uno de los eventos epigenéticos fundamentales en la carcinogénesis, y es probablemente el mecanismo más común de inactivación de genes supresores de tumor.^(51, 52)

Durante el desarrollo de un tumor, el grado de hipometilación del DNA va en aumento conjuntamente con el progreso de la lesión, desde la proliferación celular benigna hasta llegar al cáncer invasivo.⁽⁴⁴⁾ Paralelamente a la hipometilación global, en las células tumorales se realiza la hipermetilación de islas CpG, que regularmente no se encuentran metiladas. Un mecanismo muy frecuente de silenciamiento génico en muchos tipos de cáncer es la hipermetilación de los promotores de genes supresores de tumores; que afecta a genes implicados en la regulación del ciclo celular, reparación del ADN, metabolismo de carcinógenos, interacciones célula-célula, apoptosis, etc., todos ellos implicados

en el desarrollo tumoral. Por citar algunos de los supresores tumorales que son inactivados por este mecanismo; el gen del retinoblastoma (RB), p16, BRCA1, entre otros.^(52, 53)

En la carcinogénesis existen patrones aberrantes de metilación:

- ✓ Hipometilación: sobre-expresión de ciertas proteínas involucradas en los procesos de invasión y metástasis, que provocan inestabilidad genómica. Los niveles disminuidos de metilación del genoma general son hallazgos frecuentes en la tumorigénesis; esta disminución en la metilación global parece comenzar precozmente y antes del desarrollo franco de la formación tumoral.
- ✓ Hipermetilación: presente en el silenciamiento de genes, provoca represión en la transcripción por la hipermetilación de secuencias promotoras, sugiere un medio alternativo para la inactivación de genes supresores de tumores en el cáncer. El gen *RB1* fue el primer gen supresor de tumores en el cual se detectaron las islas CpG hipermetiladas.

Ambos patrones pueden variar como respuesta a diversos factores: la dieta, polimorfismos genéticos y la exposición a agentes químicos, pueden presentarse de manera individual o simultánea.^(10, 11, 12, 13)

En la figura 3.7 podemos apreciar como la alteración en el patrón de metilación puede contribuir al desarrollo del cáncer a través de distintas vías, relacionadas con la hipo e hipermetilación del ADN; induciendo mutaciones puntuales, alteraciones en la expresión de genes gracias a la modificación de la metilación de sus promotores y por inactivación transcripcional por medio de desacetilación de histonas y mecanismo complejos.

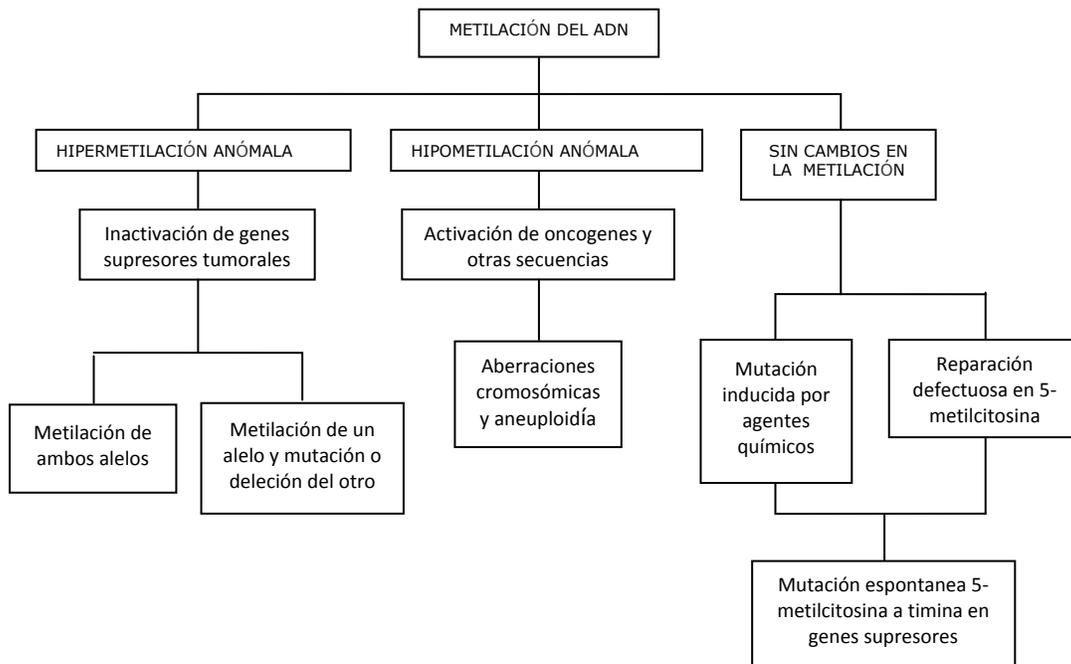


Figura 3.7 Tipos de cambios en el patrón de metilación implicados en el desarrollo de tumores y efectos de los mismos. Fuente: Camargo B, Antoneli CBG. Retinoblastoma. En: Sierrasesumaga L, Antillón F. editores. Tratado de oncología pediátrica enfermedades malignas del niño y del adolescente.

Recientemente se ha estudiado, que las alteraciones epigenéticas adquiridas y las alteraciones genéticas, participan en todas las etapas del desarrollo de un tumor. Un paso para el desarrollo del tratamiento del cáncer, es el poder identificar los procesos epigenéticos y lograr reparar las alteraciones identificadas.⁽⁵⁴⁾ Se han utilizado diversas técnicas para el estudio del patrón de metilación del ADN:

Actualmente las técnicas adecuadas que nos permiten analizar el patrón de metilación del genoma humano, o genes específicos, son las técnicas de biología molecular. Los primeros métodos utilizados para el análisis de metilación fueron el *Southern blot* y

el uso de enzimas de restricción combinado con reacción en cadena de polimerasa (PCR) que son específicas para ADN metilado o no metilado, la MSP (*Methylation Specific PCR*). La hibridación del *Southern blot* está basado en que las enzimas de restricción sensibles a la metilación no son capaces de cortar las secuencias metiladas de las islas CpG. Una de las grandes limitantes de esta técnica es la gran cantidad de ADN que debe ser utilizado; alrededor de 5 µg o más, para poder detectar el patrón de metilación. Asimismo la información únicamente puede ser obtenida de las islas CpG donde existen áreas que sean reconocibles por las enzimas de restricción.

El análisis de enzimas restrictivas combinada con PCR parece ser un método más sensible que el *Southern blot*. Este método, al igual que *Southern blot*, permite la monitorización de la metilación de las islas CpG sólo en las secuencias que contienen sitios de restricción sensible a la metilación y es útil para análisis de muestras con un alto porcentaje de alelos metilados.

Por eso, puede ser aplicado para análisis de impronta génica y la inactivación del cromosoma X. Una limitante de este método son las dificultades en diferenciar ADN no metilado cortado de una baja cantidad de alelos metilados, por esta razón no es útil para determinar hipermetilación de genes supresores de tumores en una pequeña cantidad de material biológico o cuando los alelos metilados constituyen una pequeña fracción de ADN. Una modificación bioquímica del ADN por medio del método de bisulfito, ha sido inventado con el fin de identificar correctamente las islas CpG metiladas y no metilados presentes en el genoma. El bisulfito de sodio deamina las citosinas localizadas en una hebra única de ADN. La 5,6-dihidrocitocian-6-sodio sulfonato, que se forma en un pH ácido, es un producto indirecto de esta reacción. El cambio del medio ácido a alcalino causa la degradación del bisulfito de sodio y la transformación del producto indirecto en uracilo. (Figura 3.8) Se debe tomar en cuenta que una incubación

muy larga, altas temperaturas y una concentración alta de bisulfito degrada alrededor del 84-96% de ADN, mientras que el uso de medios menos agresivos puede limitar la conversión de citosina.^(13, 54, 55) La metilación del DNA es también crucial en la inactivación del cromosoma X y de la impronta génica, alteración epigenética que permite que únicamente se exprese un alelo del gen, ya sea solo el materno o paterno.⁽⁵⁴⁾ Debemos tener en cuenta que existen numerosas técnicas que son útiles para el análisis del patrón de metilación, pero hasta el día de hoy no existe una que sea universal.

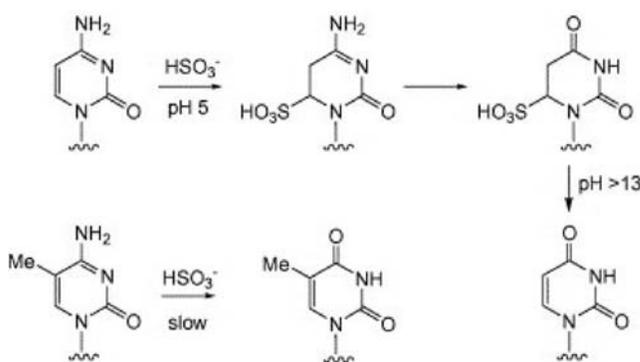


Figura 3.8 Reacciones de bases de ADN con Bisulfito. El bisulfito de sodio deamina las citosinas localizadas en una hebra única de ADN. La 5,6-dihidrocitocian-6-sodio sulfonato, que se forma en un pH ácido, es un producto indirecto de esta reacción. El cambio del medio ácido a alcalino causa la degradación del bisulfito de sodio y la transformación del producto indirecto en uracilo. Fuente: Sulewska A, Niklinska W, Kozłowski M, *et al.* Lech Detection of DNA methylation in eucaryotic cells. *Folia histochemica et cytobiologica* / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society 2007; 45(4):315-24.

3.6.3.2 Mutaciones

El cáncer no es más que el resultado de la acumulación a lo largo de la vida de cambios genéticos en las células que lo forman.⁽⁹⁾

La presencia de una mutación puntual no es más que el resultado entre la fidelidad de la replicación del ADN y la eficiencia de los procesos de reparación. Las polimerasas que tiene a su cargo la replicación son confiables, hablando de una tasa de error alrededor de 10^{-5} a 10^{-6} , y si a eso sumamos que existen

sistemas específicos de reparación que se encargan de revertir los errores que pueden originarse posterior a la replicación, la tasa global de fidelidad de reparaciones ronda 10^{-8} a 10^{-9} .

Los polimorfismos o SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) son otras variaciones que afectan al genoma humano, cuya presencia supone un riesgo a desarrollar determinados tumores. Estas variaciones cobran importancia en el cáncer, cuando afectan a genes implicados en la preparación del ADN o en el metabolismo de drogas antitumorales.⁽⁷⁾

Para interrumpir el control de crecimiento celular deben estar afectados ambos alelos de los genes de supresión tumoral. LOH (*Loss of Heterozygosity*) es un fenómeno frecuente en la etiología de tumores en los que intervienen genes supresores, y es durante este fenómeno que se pierde la función de uno de los dos alelos.

A pesar de ser estudiado y haber sido secuenciado el gen *RB1*, resulta sumamente importante el estudio de las mutaciones, lo cual nos permite realizar un diagnóstico precoz, y la detección oportuna de la predisposición al retinoblastoma y otro tipo de cáncer, para poder brindar asesoramiento genético oportuno.^(5, 20)

Diversos estudios han reportado todo tipo de mutaciones específicamente en el gen *RB1*, que influyen significativamente en el desarrollo del retinoblastoma, entre ellas encontramos: eliminaciones, inserciones, duplicaciones, inversiones, transiciones en regiones CpG y mutaciones puntuales. Hasta un 50% de las alteraciones en el gen *Rb1* corresponden a mutaciones puntuales, asimismo pequeñas deleciones e inserciones, son bastante frecuentes en dicho gen, por lo que el método más eficaz para su detección es, sin duda, la secuenciación directa del gen *RB1*.⁽¹⁸⁾

Para la identificación de mutaciones, resulta útil el empleo de muestras de ADN tumorales, según refiere la literatura en las muestras procedentes de tumores de pacientes con retinoblastoma unilateral o bilateral se han podido identificar

mutaciones en un 80%, comparado con un 30% de muestras de ADN de sangre periférica de pacientes con retinoblastoma hereditario.⁽⁵⁾

Algunos autores concuerdan con que los exones 3, 8, 18, 19 y 20 son las regiones preferenciales de mutación ("hot spots") en el gen *RB1*. En el exón 20 encuentra una de las regiones reguladoras de la pRb.

Gran parte de las mutaciones son cambios de C a T (de citosina a timina), aunque no se ha comprobado, se plantea que estas citosinas se encuentran hipermetiladas, permitiendo de esta manera su desaminación y generando mutaciones. Estas transiciones conducen a la formación de codones UGA (codón de terminación), dando como resultado la terminación prematura de la síntesis de la proteína. 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. Lo que da lugar a pensar que este pudiera ser uno de los principales mecanismos que generan mutaciones en *RB1*.

Otro dato importante que cabe mencionar es que alteraciones germinales (heredadas) C→T, se presentan el doble de veces, en relación con las somáticas. A su vez, en el exón 8 esta alteración es cinco veces más frecuente en el tipo germinal que en el tipo somático. Por otro lado, también se encuentran mutaciones en los exones 11, 18 y 23 para el tipo germinal.⁽¹⁸⁾

Asimismo, es interesante mencionar que en las mutaciones que se presentan en el cuadro 3.1, se observa el cambio simple de base o SNPs C→T y se presenta en más de 95% de las mutaciones puntuales reportadas.

Cuadro 3.1 Frecuencia de mutaciones puntuales en el gen *RB1* en 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
Exón 23	CAA > TAA	V > I		
	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

Fuente: Modificado de Rodríguez-Cruz M. et al. Genómica del retinoblastoma: Gen supresor de tumor *RB1*. Rev Invest Clin 2005; 57 (4): 572-581

Otros autores sugieren que en las secuencias promotoras de *RB1* puede presentarse metilación anormal de secuencias exónicas generando una desaminación, así como nuevos sitios de fosforilación por la ganancia de treonina.⁽¹⁸⁾

Debemos tener presente que la alteración del gen *RB1* no es el único mecanismo que predispone al desarrollo del retinoblastoma. En los casos en que encontramos el gen *RB1* sin ninguna anomalía, es factible que factores de transcripción como la familia E2F, desacetilación de histonas, cinasas, ciclinas, etc., que regulan la función de la proteína pRB, se encuentren alterados favoreciendo de manera indirecta el desarrollo de retinoblastoma.^(18, 20)

Un estudio realizado en el Departamento de Hematología y Oncología en Bélgica, muestra los resultados de un análisis del gen *RB1* realizado a lo largo de cuatro años. La detección de la delección del gen *RB1* o mutación fue realizada por *Southern blot* y análisis de la secuencia en 73 pacientes (incluidas tres familias). En total, las anomalías de línea germinal que se encontraron fueron 11% (4 / 36 pacientes) en pacientes con retinoblastoma unilateral esporádico y el 86% (32/37 pacientes) con retinoblastoma bilateral, e historia familiar positiva. En esta pequeña serie, las mutaciones de empalme se asociaron con enfermedad bilateral, mientras que la mayoría de las mutaciones de cambio se identificaron en los pacientes con una edad temprana al momento del diagnóstico, enfermedad bilateral o formas hereditarias de la enfermedad.

Este estudio confirma que la detección de mutaciones en el gen *RB1* debe ser una parte integral de la gestión actual de los pacientes afectados con retinoblastoma, independientemente de la lateralidad del tumor y antecedentes familiares.⁽⁵⁶⁾

Las mutaciones sin sentido en el gen *RB1* son más frecuentes en países del norte de Europa como Alemania y el Reino Unido que en países del sur de Europa como Francia y España en los que existe mayor incidencia de inserciones y delecciones. Se ha sugerido como posible explicación a estas diferencias mutacionales población-dependiente la existencia de posibles afectaciones subyacentes de los diferentes sistemas de reparación de ADN.⁽⁹⁾

3.6.3.3 Consejo Genético

El retinoblastoma es clasificado en: familiar o no familiar, bilateral o unilateral y hereditario o esporádico. Se considera hereditario, si el paciente presenta una mutación en la línea germinal; estos

pacientes presentan un 50% de probabilidad de heredar a sus hijos una copia del gen *RB1* mutado. Cualquier individuo con antecedentes familiares de retinoblastoma debe solicitar asesoramiento genético para identificar oportunamente los riesgos de transmitir el gen o la enfermedad a sus descendientes. En los cuadros 3.2 y 3.3 se exponen respectivamente los riesgos de que la descendencia desarrolle la enfermedad, cuando existe un historial familiar positivo y negativo.^(1, 7)

Cuadro 3.2 Riesgo de que la descendencia desarrolle la enfermedad, con historial familiar positivo

Paciente con Retinoblastoma	Unilateral	Bilateral
Padre o madre del niño afectado	40%	40%
Niño afectado	8%	40%
Hermanos normales del niño afectado	7%	7%

Fuente: Camargo B, Antoneli CBG. Retinoblastoma. En: Sierrasesumaga L, Antillón F. editores. Tratado de oncología pediátrica enfermedades malignas del niño y del adolescente.

Cuadro 3.3 Riesgo de que la descendencia desarrolle la enfermedad, con historial familiar negativo

Paciente con Retinoblastoma	Unilateral	Bilateral
Padre o madre del niño afectado	1%	6%
Niño afectado	8%	40%
Hermanos normales del niño afectado	1%	<1%

Fuente: Camargo B, Antoneli CBG. Retinoblastoma. En: Sierrasesumaga L, Antillón F. editores. Tratado de oncología pediátrica enfermedades malignas del niño y del adolescente.

3.7 Manifestaciones Clínicas y Diagnóstico

Las manifestaciones varían de acuerdo al tamaño, localización y estadio en que sea diagnosticado. Un gran porcentaje de las manifestaciones clínicas se dan antes de los 3 años. La mayoría de los pacientes con retinoblastoma (70%) debutan con leucocoria, también conocido como reflejo blanco, ojo de gato o pupila blanca. La leucocoria es un reflejo pupilar blanquecino, regularmente detectado por los padres o familiares. Los pacientes que presentan leucocoria

deben ser evaluados por un oftalmólogo. El estrabismo es la segunda forma más frecuente de presentación, representando un 20% de los casos.

Existen otras manifestaciones menos frecuentes en el retinoblastoma; hifema, glaucoma, celulitis preseptal, heterocromía, entre otros. Cuando la presentación del tumor ya se encuentra avanzada, los pacientes pueden cursar con proptosis e inflamación de las órbitas.^(1, 5, 6) Si los pacientes cursan con metástasis a Sistema Nervioso Central (SNC) pueden presentar vómitos, cefaleas, anorexia e irritabilidad.⁽⁸⁾

El retinoblastoma presenta cuatro estadios en cuanto a su evolución clínica:

- a) Estadio precoz o asintomático: se diagnostica únicamente con exploración oftalmoscópica. Dura alrededor de 6 meses a 1 año.
- b) Estadio de primer síntoma clínico: Se puede manifestar como leucocoria o estrabismo convergente en el caso de los tumores afectados en la mácula.
- c) Estadio inflamatorio o hipertensivo: Puede presentar glaucoma secundario con buftalmia (signo oftalmológico cuando el globo ocular esta aumentado de tamaño asociado o no a celulitis orbital), midriasis homolateral, alteraciones cromáticas del iris por neovascularización o necrosis tumoral. Existe aumento del globo ocular con proptosis, la cual es dolorosa y cesa al romperse la esclerótica.
- d) Estadio de extensión: Se produce invasión a la órbita o metástasis vía hemática.

La oftalmoscopia con pupila dilatada, es necesaria para el diagnóstico de retinoblastoma, sin embargo hoy en día contamos con diversos métodos que nos permiten realizar el diagnóstico.⁽¹⁾

Ayudas diagnósticas:

- ✓ Ecografía: la ecografía ocular puede revelar la presencia o ausencia de una masa, útil para determinar el tamaño de la misma y detectar la presencia de calcificaciones.
- ✓ Tomografía Axial Computarizada (TAC): TAC del ojo y órbita muestra la extensión del tumor.

- ✓ Resonancia Nuclear Magnética (RNM): Es la mejor herramienta para la exclusión de invasión del nervio óptico.
- ✓ Paracentesis del humor acuoso: Útil para realizar pruebas citológicas y enzimáticas, como la lactato deshidrogenasa (LDH), si es > a 1.5-2 existe presencia de retinoblastoma. Desventaja: puede diseminar la enfermedad extraocularmente.
- ✓ Biopsia Tumoral: No esta indicada por el riesgo que conlleva, el diseminar la enfermedad extraocularmente, de ser necesaria, debe realizarse por aspiración con aguja fina.

Es causa de controversia la realización de aspirado de medula ósea y punción lumbar en pacientes con neoplasia intraoculares.⁽⁵⁾

3.8 Tratamiento

El tratamiento del retinoblastoma es complejo y requiere un abordaje multidisciplinario, para garantizar una adecuada rehabilitación y evitar fallo en el tratamiento. Los objetivos primordiales del tratamiento persiguen no solo brindar una mejor sobrevida, sino la preservación de la visión y minimizar al máximo las secuelas tardías. Actualmente la quimiorreducción es el nuevo enfoque de la terapéutica del retinoblastoma, con lo cual se persigue disminuir el tamaño de la masa tumoral para posteriormente obtener un control final con métodos conservadores localmente. Los métodos terapéuticos que disponemos para el tratamiento del retinoblastoma son:

- ✓ Enucleación: según datos en la literatura la enucleación primaria cura un 92% de los casos. Durante la técnica quirúrgica debe obtenerse una sección larga del nervio óptico para minimizar el riesgo de extensión del tumor extraocularmente. La enucleación está indicada si se presenta una imposibilidad de la visión e invasión masiva del globo ocular.
- ✓ Radioterapia Externa: este método resulta útil tomando en cuenta que el retinoblastoma principalmente el tipo indiferenciado es un tumor radiosensible. Esta técnica está indicada en pacientes que presentan tumores de 15 mm de base y 10mm de altura, cuando se presentan múltiples tumores, presencia de siembras vítreas y en caso de invasión orbitaria o del nervio óptico posterior a la enucleación. Las dosis totales son de 3500-5000cGy en 3 a 6 semanas. Una desventaja importante de la radioterapia externa es la presencia de segundos

tumores en retinoblastomas bilaterales, la incidencia aumenta después de 30 años de la enucleación.

- ✓ Fotocoagulación laser: recomendada en lesiones pequeñas posteriores, sin evidencia de presencia de siembras vítreas. Utilizada en tumores menores de 4.5mm de base y 2.5mm de altura.
- ✓ Crioterapia: debe utilizarse en tumores < de 3.5mm o menos de diámetro y que no exista evidencia de siembras vítreas.
- ✓ Quimiorreducción: el objetivo primordial es la reducción de la masa tumoral. La finalidad de la quimiorreducción es evitar la enucleación y/o radioterapia externa. No se ha definido cuando debe ser usada, sin embargo cada vez es mayor su utilización y se ha demostrado que la tasa de preservación ocular en los pacientes del grupo V de Reese – Ellsworth es del 78%, se han evitado en un 42% de los casos la enucleación y/o radioterapia externa. En la mayor parte de estudios, los esquemas de quimiorreducción incluyen vincristina, carboplatino y etopósido. Contraindicada en enfermedad avanzada, extraocular, presencia de glaucoma neovascular, invasión tumoral de la cámara anterior y del iris.^(5, 7)

El abordaje del retinoblastoma intraocular y extraocular difiere uno del otro.

3.8.1 Retinoblastoma intraocular

Los pacientes presentan un buen pronóstico, se observan las variantes unilateral y bilateral. Tratamientos locales como termoterapia o fotocoagulación (argón) con láser, crioterapia y braquiterapia (placas radioactivas locales) deben ser administrados por un oftalmólogo experto.

3.8.2 Retinoblastoma extraocular

Los pacientes presentan un mal pronóstico. Cuando el tumor atraviesa el globo ocular e invade órbita, ganglios y tejidos blandos el tratamiento a utilizar son diversos fármacos quimioterapéuticos y puede asociarse la radioterapia. Un 60% de estos pacientes logran curación, de presentar infiltración a SNC, resulta casi imposible obtener buenos resultados y un 85% fallecen a pesar de utilizar tratamientos intensivos.^(*) El seguimiento en pacientes con retinoblastoma debe ser continuo, debido a que los pacientes que sobreviven al retinoblastoma con regularidad desarrollan

* Luna-Fineman S, Castellanos M, Barnoya M. Retinoblastoma en Guatemala: Diagnóstico Temprano Salva Vidas [Documento no publicado] 2010.

segundas neoplasias. Estos tumores no se presentan como una recaída del retinoblastoma, son tumores primarios de otros órganos, los que generalmente se presentan a los 10 a 13 años en promedio, después de la aparición de la primera neoplasia. La segunda neoplasia más común es el osteosarcoma. No obstante, el retinoblastoma se ha asociado también a otros tumores primarios que se presentan en diferentes etapas de la vida, como el rhabdomyosarcoma, el condrosarcoma, el neuroblastoma, la leucemia, el melanoma maligno, y neoplasias de ovario, mama, pulmón y vejiga urinaria. Estos segundos tumores aumentan su incidencia en pacientes que recibieron como tratamiento la radiación, antes de los 12 años.⁽¹⁾

3.9 Pronóstico

El factor más importante para el pronóstico favorable o no del retinoblastoma es la detección precoz del mismo. A pesar de ser una neoplasia con alto grado de malignidad, el retinoblastoma tiene una supervivencia del 90-95%, con un tratamiento adecuado. Varios autores coinciden en que existen ciertas características histopatológicas, en los ojos de pacientes enucleados que predicen que pacientes presentan mayor riesgo de metástasis:

- a) Margen del nervio óptico afectado por el tumor,
- b) Invasión del tumor, posterior a la lamina cribosa,
- c) Invasión del tumor anterior a la lamina cribosa,
- d) Infiltración coroidea,
- e) Afectación del segmento anterior del ojo,
- f) Tumores bien diferenciados, presentan un mejor pronóstico.

El margen del nervio óptico afectado por el tumor, es considerado un factor pronóstico de diseminación.^(1, 5)

4. METODOLOGÍA

4.1 Tipo y diseño de la investigación

Tipo: Descriptivo

4.2 Unidad de análisis

4.2.1 Unidad primaria de muestreo: Muestras tumorales y de saliva de pacientes de la Unidad Nacional de Oncología Pediátrica.

4.2.2 Unidad de Información: Resultados genéticos de mutaciones y patrón de metilación del gen *RB1* a partir de los bloques de tumor en medio de parafina y muestras de saliva.

4.2.3 Unidad de análisis: Bloques de tumor en medio de parafina y muestras de saliva de pacientes con diagnóstico de retinoblastoma de la Unidad Nacional de Oncología Pediátrica.

4.3 Población y muestra

4.3.1 Población: Muestras tumorales y de saliva obtenidas de pacientes de la Unidad Nacional de Oncología Pediátrica.

4.3.2 Marco muestral: Muestras tumorales y de saliva de pacientes con diagnóstico de retinoblastoma en Unidad Nacional de Oncología Pediátrica.

4.3.3 Muestra: Muestras tumorales en bloques de parafina y de saliva que contengan información genética de retinoblastoma.

4.3.4 Método y técnica de muestreo: No probabilístico, de conveniencia.

4.4 Selección de los sujetos a estudio

4.4.1 Criterios de Inclusión:

- ✓ Pacientes con diagnóstico de retinoblastoma en UNOP entre el año 2000 y 2009.
- ✓ Pacientes con diagnóstico de retinoblastoma menores de 14 años.
- ✓ Muestras viables para identificación de alteraciones genéticas.

4.4.2 Criterios de Exclusión:

- ✓ Muestras no viables para la identificación de alteraciones genéticas.
- ✓ Pacientes con diagnóstico de retinoblastoma mayores de 14 años.
- ✓ Pacientes con diagnóstico de retinoblastoma no realizado en UNOP.
- ✓ Pacientes con diagnóstico de retinoblastoma realizado en UNOP después del año 2009.

4.5 Definición y operacionalización de variables

4.5.1 Variables, tipo, clasificación y escala de medición

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de Variable	Unidad de Medida	Escala de Medición
Metilación	Reacción química en la que una molécula pequeña llamada grupo metilo se agrega a otras moléculas.	Resultado de la prueba de modificación con bisulfito en las islas CpG. El principio de la modificación de ADN con Bisulfito, se basa en su capacidad de convertir a todos los residuos de citosina (C) no metilados en uracilos (U), mediante desaminación, cuando la citosina está metilada es resistente a la reacción y permanece como citosina.	Categórica Dicotómica	Hipometilación - Hipermetilación	Nominal
Mutación	Alteración o cambio en la información genética de un ser vivo.	Resultado de los programas SeqMan y Mutation Surveyor, con los cuales se alinearán las secuencias de pacientes con las secuencias normales para analizar el ADN y buscar las mutaciones en el gen <i>RB1</i>	Categórica Dicotómica	Presente - Ausente	Nominal

4.6 Técnicas, procedimientos e instrumentos a utilizar en la recolección de datos

4.6.1 Técnica: Este estudio fue realizado durante los meses de Abril-Julio de 2011 en el Instituto Nacional de Cáncer, Campus Frederick, Maryland, EEUU. Los datos obtenidos se registraron en la boleta de recolección de datos.

4.6.2 Técnica de Extracción de ADN en muestras tumorales:

Todos los casos fueron analizados en cortes de 30 μm de tejido embebido en parafina por la tinción universal de hematoxilina/eosina, posteriormente escaneados digitalmente en alta resolución por medio del sistema Amperio.

A partir de los cortes obtenidos se realizó la extracción de ADN, utilizando el Protocolo para extracción de ADN de bloques de parafina el cual se basa en:

- **Paso 1:** El día 1 se colocaron los cortes de 30 μm de tejido tumoral en los tubos Eppendorf de 1.5 ml.
- **Paso 2:** Se añadió 1ml de xileno e incubo a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- **Paso 3:** Fueron centrifugadas durante 5 minutos a 13000 rpm y descartado el sobrenadante.
- **Paso 4:** Fue combinado 1 ml de etanol al 100% e incubado a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- **Paso 5:** Se adicionaron 500 μl de proteinasa K y las muestras fueron incubadas toda la noche a 55 ° C en un agitador.
- **Paso 6:** Tras la desparafinación con xileno, los días 2 al 5 se agregaron 20 μl de proteinasa K e incubaron las muestras toda la noche a 55 ° C en un agitador.
- **Paso 7:** El día 6 se combinaron 500 μl de PCI (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico) en el tubo y se dejaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente ser centrifugadas durante 5 minutos a 13000 rpm.

- **Paso 9:** Fue retirada la tapa superior del tubo para mezclar con los 500 μ l de PCI, se agitó suavemente e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- **Paso 10:** Fueron centrifugadas las muestras durante 5 minutos a 13000 rpm, para recoger el sobrenadante en tubos Eppendorf nuevos y combinar con 300 μ l de acetato de amonio de 7.5 M, 1 ml de etanol al 100% y 5 μ l de glucógeno que se encontraba a 20ug/ml.
- **Paso 11:** Se agitó suavemente e incubó a -20 ° C durante toda la noche.
- **Paso 12:** El último paso que se realizó fue centrifugar durante 30 minutos a 13000 rpm y descartar el sobrenadante.

4.6.3 Técnica para Conversión de ADN genómico mediante bisulfito de sodio:

Posterior a la extracción del ADN se realizó la conversión de ADN genómico (g-ADN) mediante bisulfito (b-ADN), utilizando el kit de *Zymo EZ ADN Methylation-Gold™*.

- **Paso 1:** Fueron combinados 130 μ L de CT (*Conversion Reagent*) con 20 μ L de las muestras de ADN en tubos de PCR. Si el volumen de la muestra de ADN era inferior a 20 μ L, se completaba la diferencia con agua.
- **Paso 2:** Se mezclaron las muestras moviendo los tubos o utilizando la pipeta de arriba hacia abajo.
- **Paso 3:** Se colocaron los tubos con la muestra en un termociclador y se utilizó el programa: 98 ° C durante 10 minutos, 64 ° C durante 2.5 horas y 4 ° C de almacenamiento de hasta 1 hora.
- **Paso 4:** Obtenidos los productos de PCR se agregaron 600 μ L de *M-Binding Buffer* en las columnas *Zymo Spin-IC* y colocaron las columnas en tubos de recolección.
- **Paso 5:** Fueron colocadas las muestras (del paso 2) en las columnas *Zymo Spin-IC* que contenían *M-Binding Buffer*. Cerrando la tapa se mezclaron invirtiendo las columnas varias veces.
- **Paso 6:** Fue necesario centrifugar a máxima velocidad (> 10.000 xg) durante 30 segundos, desechar el contenido de los tubos de

recolección, para añadir 100 µL de *M- Wash Buffer* a la columna y centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos.

- **Paso 7:** Se añadieron 200 µL de *M-Desulphonation Buffer* a la columna, dejando reposar a temperatura ambiente (20 ° C y 30 ° C) durante 30 minutos.
- **Paso 8:** Después de la incubación, se centrifugó a toda velocidad durante 30 segundos. Nuevamente se adicionaron 200 µL de *M-Wash Buffer* a la columna y se centrifugó a máxima velocidad durante 30 segundos, este paso se repitió en dos ocasiones.
- **Paso 9:** Para finalizar se colocaron las columnas en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml, donde se añadieron 10 µL de *M-Elution Buffer* directamente a la columna de la matriz y dejó reposar por 5 minutos, para centrifugar durante 30 segundos a toda velocidad, y así poder eludir el ADN.
- **Paso 10:** Nuevamente se agregaron 10 µL de *M-Elution Buffer* directamente a la columna de la matriz y esperaron 5 minutos, luego fueron centrifugadas a toda velocidad durante 30 segundos más.

4.6.4 Técnica de PCR

Obtenido el b-ADN, se procedió a trabajar con el kit *Taq Pre Mix*, de Zymo previo a realizar PCR en tiempo real, para lo cual se utilizó:

<i>Zymo Taq Pre Mix</i>	12.5µl
Cebador sentido	1µl
Cebador contrasentido	1µl
b-ADN	2µl
H2O	<u>8.5µl</u>
Total	25 µl

El cebador en sentido, metilado que se utilizó fue: MET1 (localizado posición,-146~-114):

5'-GCGTTTTAGTTCGCGTATCGATTAGCGTTTTAG-3'

El cebador en sentido, no metilado que se utilizó fue: UNMET1 (localizado en posición, -99~-67):

5'-TGGTGGGTTTGGGAGTTTTGTGGATGTGATGTT-3'

El cebador común utilizado, localizado posición, +49~+21:

5'-CCTACCCCRACCTCCCRTTACAAAAATAATTTCAAC-3'

Tanto el cebador metilado, como él no metilado humanos ADN (*Zymo Research*) fueron utilizados como controles.

El programa utilizado en el termociclador para PCR en tiempo real fue el siguiente:

- | | |
|-------------------------------|-------------|
| a. 95 ° C durante 10 minutos | } 40 ciclos |
| b. 95 ° C durante 30 segundos | |
| c. 72 ° C durante 1 minuto | |
| d. 72 ° C durante 7 minuto | |
| e. 4 ° C durante >4 minutos | |

Finalmente para obtener el resultado del patrón de metilación se utilizó MSP cuantitativa: *SYBR green* método basado en el tiempo real de MSP; *SYBR green* es un agente intercalante utilizado en la tinción de ADN para el análisis por electroforesis de productos de PCR, utilizado como medio de visualización directa de los productos de la PCR en tiempo real. (*Power SYBRGreen PCR Master Mix, ABI*).

4.6.5 Técnica de extracción de ADN muestras de saliva:

Para la identificación de mutaciones puntuales en el gen *RB1*, fueron utilizadas 15 muestras de salivas de pacientes guatemaltecos diagnosticados con retinoblastoma en UNOP durante el período 2000-2009.

Se utilizó el protocolo de laboratorio para la purificación manual de ADN de 0.5 ml de ADN oragene / saliva:

- **Paso 1:** a 500 µl de muestra, se añadieron 20 µl (1/25 parte del volumen), del purificador de ADN *oragene* en el tubo de microcentrífuga y mezclaron por agitación durante unos segundos.
- **Paso 2:** se incubaran en hielo durante 10 minutos.
- **Paso 3:** fueron centrifugadas a temperatura ambiente durante 10 minutos a 13.000 rpm (15.000 xg).

- **Paso 4:** se transfirió cuidadosamente el sobrenadante claro con una punta de la pipeta en un tubo de microcentrífuga nuevo. Se desecharon las impurezas.
- **Paso 5:** A los 500 µl del sobrenadante, se les combinaron 600 µl de etanol al 95% o 100% a temperatura ambiente, luego se mezclaron por inversión 10 veces.
- **Paso 6:** fueron dejadas las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir que el ADN se precipitara por completo.
- **Paso 7:** se colocaron los tubos en la microcentrífuga en una orientación conocida; luego se centrifugaron a temperatura ambiente durante 2 minutos a 13.000 rpm.
- **Paso 8:** fue retirado con cuidado el sobrenadante con la punta de la pipeta y descartado cuidadosamente para no desechar las partículas de ADN. Se centrifugó 1 minuto y descarto el residuo.
- **Paso 9:** Lavado con etanol: Cuidadosamente fue adicionado 250 µl de etanol al 70%. Reposo a temperatura ambiente durante 1 minuto, posteriormente se separó completamente el etanol sin perturbar el precipitado. Fue centrifugado por 3 minutos.
- **Paso 10:** fueron añadidos 100 µl de la solución de 0.1 TE para disolver las partículas de ADN, se agitaron las muestras durante 5 segundos.

Una vez obtenido el ADN se procedió a cuantificar el ADN obtenido en cada una de las muestras, por medio del espectofotómetro Nano Drop. Con las muestras con una concentración de ADN por encima de 80 ng/ µl se prosiguió a trabajar con cebadores sentido y contrasentido de 10 uM, (*Eurofins MWG/Operon*) tanto para la región del promotor como para los 27 exones del gen *RB1*, utilizando: 1.5 µl ADN (20ng/ µl) + 1.0 µl Cebador Sentido + 1.0 µl Cebador contrasentido+8.5 µl H₂O+13 µl *Fast Start* PCR= 25 µl Total. Posterior a realizar la mezcla, se utilizo el programa para PCR:

- a. 95 ° C durante 2 minutos
 - b. 95 ° C durante 30 segundos
 - c. 61 ° C durante 30 segundos
 - d. 68 ° C durante 30 segundos
 - e. 95 ° C durante 30 segundos
 - f. 56 ° C durante 30 segundos
 - g. 68 ° C durante 30 segundos
 - h. 68 ° C durante 5 minutos
 - i. 4 ° C ∞
- } 10 ciclos
- } 30 ciclos

4.6.6 Técnica de Purificación de ADN:

Una vez obtenidos los productos de PCR, se trabajo en la purificación de los productos previos de PCR, para lo cual se colocaron 10 µl de dichos productos en el robot (*Beckman Coulter Genomics*), utilizando *Agencourt AMPure XP*, un sistema sumamente eficiente, el cual fácilmente automatiza el sistema de purificación de PCR, dando como resultado ADN de alta calidad, sin el remanente de sal. No requiriendo ninguna centrifugación o filtración.

4.6.7 Técnica para la secuenciación:

Al obtenerse los productos de PCR purificados se continuó con el ciclo para secuenciación, donde fue empleado:

<i>Big Dye</i>	0.25 µl
<i>5X Buffer</i>	1.50 µl
H2O	5.25 µl
ADN purificado	2.0 µl
Cebadores (2 uM)	<u>1.0</u> µl
Total	10 µl

Seguidamente se trabajó con *Agencourt CleanSEQ*; un sistema rápido, con un alto rendimiento para eliminar el marcador utilizado en el ciclo para secuenciación, proceso basado en la Tecnología de Fase Sólida de Inmovilización Reversible (SPRI). Al concluir la limpieza posterior al ciclo de secuenciación se empleo el secuenciador Roche 454jr de nueva

generación, con el cual se pueden combinar fragmentos y generar 100,000 secuencias al mismo tiempo. Con lo que se posteriormente se procede a utilizar *SeqMan* y *Mutation Surveyor*, programas con los cuales se alinearon las secuencias de pacientes con las secuencias normales para analizar el ADN e identificar las mutaciones en el gen *RB1*.

4.6.8 Técnica WGA (*Whole Genome Amplification*)

El análisis genético con pequeñas concentraciones de ADN, juega un papel importante en el diagnóstico de enfermedades genéticas, análisis de ligamiento genéticos y diversos estudios genéticos. Con esta técnica es posible amplificar cantidades de ADN genómico en picogramos y aumentar la cantidad de ADN de cifras como 15 pg hasta 400 ng, lo que contribuye a amplificar cientos de veces el genoma completo del ADN genómico humano para el análisis genotípico. Utilizamos esta técnica con las muestras de ADN que tenían concentraciones por debajo de los 80ng/ μ l.

- **Paso 1:** Se debía preparar suficiente buffer D1 (buffer para denaturalización) y buffer N1 (neutralización buffer)

Buffer D1:

Componentes	Cantidad
Buffer Reconstituido DLB	9 μ l
Agua libre de nucleasa	<u>32</u> μ l
Volumen Total	41 μ l

Buffer N1:

Componentes	Cantidad
Solución de parada	12 μ l
Agua libre de nucleasa	<u>68</u> μ l
Volumen Total	80 μ l

- **Paso 2:** Se colocan 2.5 μ l de ADN en un tubo de centrífuga. La cantidad de ADN debe ser mayor a 10 ng.
- **Paso 3:** Se agregan 2.5 μ l de Buffer D1 al ADN y se agita.
- **Paso 4:** Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 3 minutos.
- **Paso 5:** Se agregaron 5 μ l de Buffer N1 a las muestras. Se mezclan por agitación y se centrifugan.

- **Paso 6:** Se prepara la mezcla:

Componentes	Cantidad
Agua libre de nucleasa	10 μ l
REPLI-g Midi	29 μ l
REPLI-g DNA Polimerasa	<u>1 μl</u>
Volumen total	40 μ l

- **Paso 7:** Se agregan 40 μ l de la mezcla preparada en el paso 6 y se mezclan con 10 μ l del ADN desnaturalizado.
- **Paso 8:** Se incuban las muestras a 30 °C por 10 a 16 horas.
- **Paso 9:** Para inactivar REPLI-g Midi ADN polimerasa se deben calentar las muestras durante 3 minutos a 65 °C.

4.6.9 Técnica MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

Con todas las muestras de ADN obtenidas de muestras de saliva, nos apoyamos con MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*); método múltiple de PCR que descubre los números de copias anormales de hasta 50 ADN genómicos diferentes o secuencias de ARN, es capaz de distinguir secuencias que difieren en un sólo nucleótido. Se aplicó el protocolo general MLPA para detección y cuantificación de ADN del *MRC-Holland*:

- **Paso 1:** ADN denaturalización (día 1)
 - 1) Se etiquetaron los platos de 0.2 ml.
 - 2) Se añadieron 5 μ l del ADN.
 - 3) Fueron colocados los tubos en un termociclador e inicio el programa MLPA
 - a. 98 °C por 5 minutos
 - b. 25 °C antes de abrir el termociclador
- **Paso 2:** Reacción de Hibridación (día 1)
 - 1) 1.5 μ l *MLPA buffer* (tapón amarillo)
 - 2) 1.5 μ l *probemix* (tapón negro). Se mezcló bien pipeteando y/o agitando.
 - 3) Cuando el termociclador alcanzo los 25 °C, se añadieron 3 μ l de la mezcla realizada en paso 1 y 2 a cada tubo de la muestra y se mezclaron.

- 4) El programa del termociclador prosiguió, e incubaron durante 1 minuto a 95 °C, luego para 16 - 20 horas a 60 °C.
- **Paso 3:** Reacción de ligación (día 2)
 - 1) Se preparó una mezcla principal para la ligación, que contenía para cada reacción: 3 µl de Ligase-65 Buffer A (tapón transparente) + 3 µl de Ligase-65 buffer B (tapón blanco) + 25 µl de dH₂O. Se mezclaron pipeteando y/o agitando.
 - 2) Se adicionó 1 µl de Ligase-65 (tapón verde) para cada reacción a la mezcla principal para la ligación, fue mezclado bien pipeteando con cuidado hacia arriba y abajo. Las soluciones de enzimas NUNCA se deben agitar.
 - 3) Se dio continuidad al programa del termociclador: pausa en 54 °C.
 - 4) Cuando las muestras se encontraban a 54 °C, fueron añadidos 32.0 µl de la mezcla principal a cada tubo de reacción; se mezclaron cuidadosamente pipeteando de arriba hacia abajo.
 - 5) El termociclador permaneció incubando durante 15 minutos en 54 °C (para ligación), seguido de 5 minutos a 98 °C para inactivar por medio del calor la enzima Ligase-65 y luego pausa a 15 °C.
 - **Paso 4:** Reacción de PCR (día 2)
 - 1) Se preparó la mezcla de PCR *buffer mix* que contenía para cada reacción: 4 µl de SALSA PCR buffer + 26 µl dH₂O. Mezclar agitando.
 - 2) Añadidos 30 µl de la mezcla de PCR *buffer mix* a cada tubo nuevo.
 - 3) A temperatura ambiente, se transfirieron 10 µl de cada producto de ligación a su correspondiente tubo de PCR.
 - 4) Fue preparada una mezcla principal de *polymerase master mix* añadiendo para cada reacción: 2 µl SALSA PCR-*primers* (tapón marrón) + 2 µl SALSA *Enzyme dilution buffer* (tapón azul) + 5.5 µl dH₂O + 0.5 µl SALSA *Polymerase* (tapón naranja). Mezclar bien pipeteando de

arriba hacia abajo; no agitar. Se mantuvieron en hielo hasta su utilización.

- 5) Se continuó el programa del termociclador: pausa a 60 °C y se dejaron los tubos en el termociclador.
- 6) Mientras estos tubos se encontraban en el termociclador a 60 °C, fueron adicionados 10 µl de *polymerase mix* en cada tubo, se mezclaron con la pipeta con cuidado de arriba hacia abajo y se continuó con el programa del termociclador inmediatamente: 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C; 30 segundos a 60 °C; 60 segundos a 72 °C. Para finalizar con 20 minutos de incubación a 72 °C y luego pausa a 15 °C.

Para poder alinear las secuencias de pacientes con las secuencias normales para analizar el ADN y buscar las mutaciones en el gen *RB1*, se procede a utilizar los programas SeqMan y Mutation Surveyor. Para la obtención de datos, fue elaborada la boleta de recolección, en base a las variables que se medirían y de acuerdo a los objetivos que se perseguían alcanzar.

4.7 Plan de procesamiento y análisis de datos

4.7.1 Procesamiento:

Los datos recabados a través del instrumento de medición y los resultados de laboratorio fueron ordenados, tabulados y procesados mediante el programa electrónico Microsoft Excel 2007, con dicho programa se realizaron tablas y gráficas para agrupar los resultados de las variables estudiadas.

4.7.2 Análisis:

El análisis de los resultados fue de tipo analítico a través de los cuadros y gráficas que se obtuvieron mediante el programa Microsoft Excel 2007. Una vez tabulados los datos se realizaron cuadros donde se expresaron localización, tipo de alteración genética en el gen *RB1* de las muestras tumorales y de saliva, fue plasmada la edad de diagnóstico, género, lateralidad del tumor y la etnicidad del paciente; así como el patrón de

metilación de cada una de dichas muestras, de igual forma se realizó un listado con las mutaciones encontradas. Se utilizaron tasas y porcentajes para una mejor comprensión del análisis.

Al realizar el análisis se perseguía obtener una caracterización clínica y molecular de tumores de retinoblastoma diagnosticados en los últimos 10 años en Unidad Nacional de Oncología Pediátrica.

4.8 Alcances y límites de la investigación

4.8.1 Alcances:

Se estableció el patrón de metilación de pacientes diagnosticados con retinoblastoma en UNOP durante el periodo 2000-2009, por medio de muestras tumorales. Asimismo se logró investigar mutaciones puntuales en el gen *RB1* de pacientes con el mismo diagnóstico, por medio de muestras de saliva.

Con la información obtenida se hizo una descripción de las mutaciones, del patrón de metilación y su impacto sobre la evolución clínica y respuesta al tratamiento, lo que nos permite a futuro brindar diagnósticos, pronósticos y planes de seguimiento, basados en el genotipo tumoral y el fenotipo esperado.

4.8.2 Límites:

No se logró estudiar la totalidad de los casos diagnosticados con retinoblastoma en UNOP, debido a que un buen porcentaje de las muestras tumorales no poseían material viable para la identificación de alteraciones genéticas. En lo referente a las muestras de saliva, se utilizaron el total de muestras con las que se contaba, sin embargo un buen porcentaje de los pacientes diagnosticados durante el periodo 2000-2009 en UNOP no han proporcionado muestras de saliva, por diferentes razones; quizás la más importante que cabe resaltar es el mal pronóstico que presentan un buen número de pacientes debido al retraso en su diagnóstico, por lo que muchos pacientes han fallecido.

Únicamente se tomaron en cuenta las muestras que pudieron ser procesadas durante el tiempo que corresponde al trabajo de campo de dicho trabajo de investigación.

4.9 Aspecto ético de la investigación

La Unidad Nacional de Oncología Pediátrica constantemente se encuentra realizando investigaciones con el fin de generar conocimiento; el estudio de retinoblastoma no es la excepción. Se ha desarrollado un protocolo para realizar un estudio multi-institucional de los tumores de retinoblastoma de pacientes guatemaltecos, con una Universidad privada del país, el cual fue avalado por el Comité de Ética de la misma Universidad, para realizar diferentes estudios que ayuden a dilucidar el paradigma que representa el retinoblastoma. Cada paciente diagnosticado en dicha Unidad, cuenta con un consentimiento informado, en el cual autoriza tanto el responsable del paciente, como el paciente mismo, que parte de su muestra tumoral y/o saliva sea utilizada para diversos estudios genéticos. El objetivo principal es poder ayudar en un futuro a personas que padecen dicha enfermedad, a través de la caracterización de los patrones de metilación como parte de la oncogénesis y la identificación de nuevas mutaciones nos permitirá comparar nuestros hallazgos con los descritos para otras poblaciones respecto al diagnóstico, pronóstico, evolución clínica como a la respuesta a la terapia.

5. RESULTADOS

Los resultados obtenidos de este estudio son producto de la colaboración binacional entre Unidad Nacional de Oncología Pediátrica, (UNOP, Guatemala), Universidad de San Carlos de Guatemala y *National Cancer Institute*, (NCI, Campus Frederick, Maryland EEUU), quienes facilitaron los medios para la realización de este trabajo de tesis.

Los resultados serán expuestos en 2 secciones, organizadas de la siguiente manera:

- Sección I: Caracterización del patrón de metilación
- Sección II: Identificación de mutaciones puntuales

5.1. Sección I: Caracterización del patrón de metilación en el gen *RB1*

Para caracterizar el patrón de metilación en el gen *RB1* se trabajó con 18 muestras tumorales fijadas en medio de parafina, que presentaban material viable. Todas las muestras fueron analizadas por medio de cortes de 30 μm de tejido tumoral embebido en parafina, teñidos con la técnica universal de hematoxilina/eosina, posteriormente escaneados digitalmente en alta resolución a través del sistema Amperio (Figura 5.1).

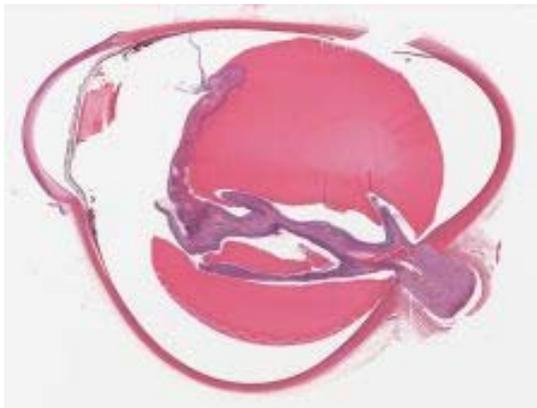


Figura 5.1 Corte realizado a una de las muestras de tejido tumoral fijadas en medio de parafina a estudio, teñida con hematoxilina/eosina y digitalizada por el sistema Amperio. Fuente: Cortesía Instituto Nacional de Cáncer, *Frederick, MD, EEUU*.

Secundario a la necesidad de trabajar con métodos lo suficientemente eficientes para la caracterización del patrón de metilación en el gen *RB1*, fue necesario un entrenamiento en el método de extracción de ADN, modificación con bisulfito y análisis de metilación Q-MSP.

Posterior a la extracción de ADN, éste fue modificado químicamente con bisulfito de sodio, convirtiendo los residuos citosina no metilados en uracilo, los cuales posteriormente fueron replicados como timina durante la PCR; mientras que las citosinas metiladas permanecieron sin cambio alguno.

Después de extraer el ADN de las muestras y proceder a la subsecuente modificación química se procedió al análisis por Q-MSP, para lo cual se realizó una PCR cuantitativa con el fin de detectar cantidades mínimas como 1ng en el posterior análisis de metilación por PCR en tiempo real. Tras correr los productos de la PCR en un gel de agarosa al 2% se estimó a simple vista, como se ejemplifica en la figura 5.2, el factor de dilución necesario de las muestras de ADN previo al análisis por PCR en tiempo real.

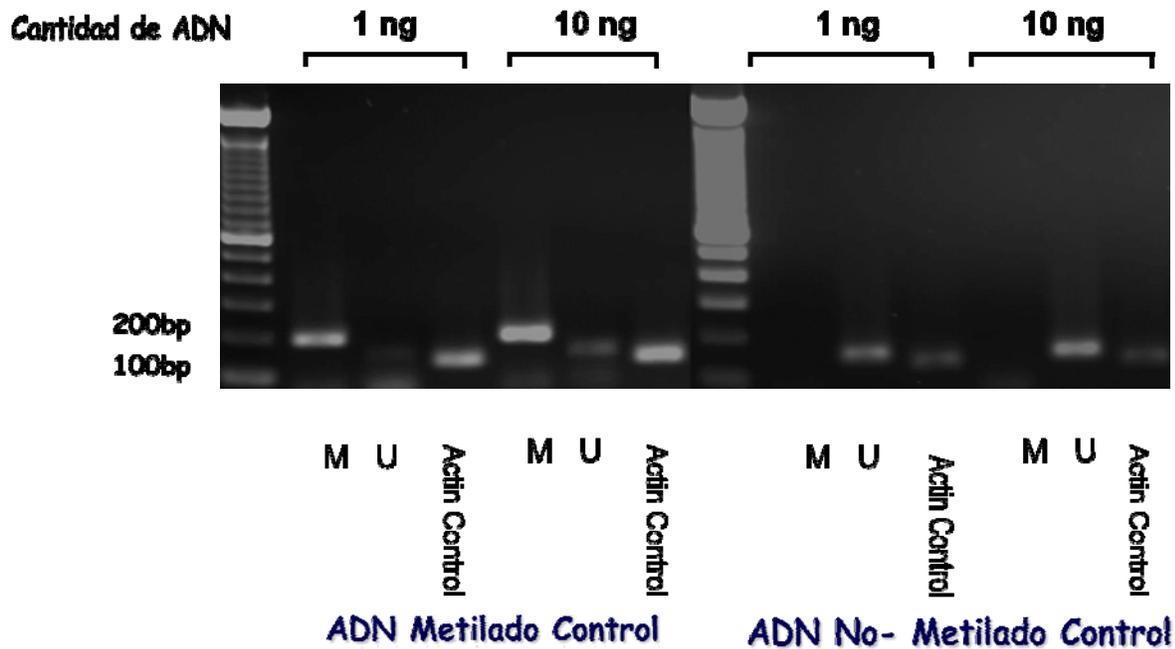


Figura 5.2 Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR cuantitativa. Fuente: Cortesía Instituto Nacional de Cáncer, *Frederick, MD, EEUU*.

Con el fin de realizar una cuantificación correcta fue necesario discernir el inicio de la amplificación, seleccionando el umbral (línea verde en Figura 5.3) y ajustar la concentración de los ADN Control metilado y no-metilado de manera que se obtenga la concentración óptima; utilizando SYBR- PCR en tiempo real MSP.

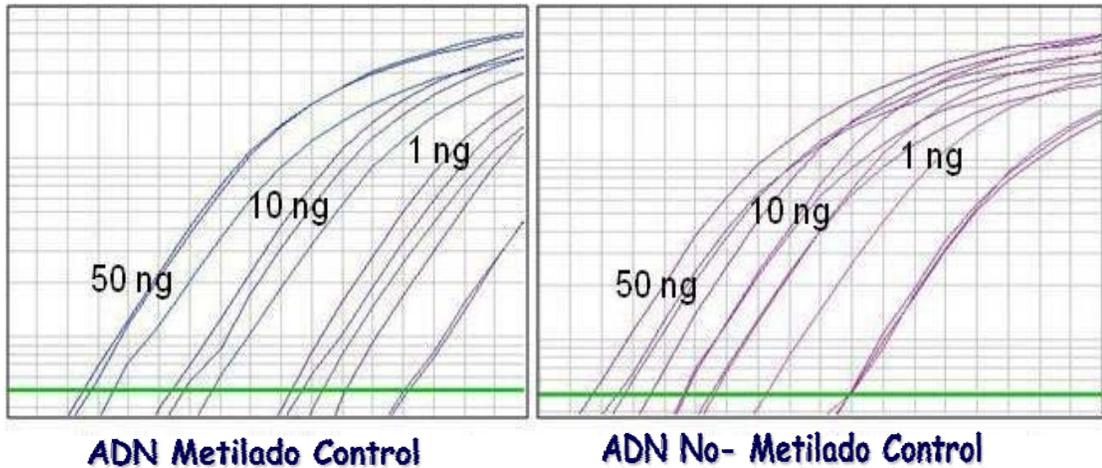


Figura 5.3 Curvas de los controles de ADN metilado y no- metilado. Para ambas curvas se utilizaron una serie de 3 diluciones, con una concentración máxima de 50 ng, de la cantidad de ADN utilizada en cada par de cebadores, para identificar la concentración óptima. La línea verde corresponde en ambos casos al umbral de amplificación. Fuente: Cortesía Instituto Nacional de Cáncer, Frederick, MD, EEUU.

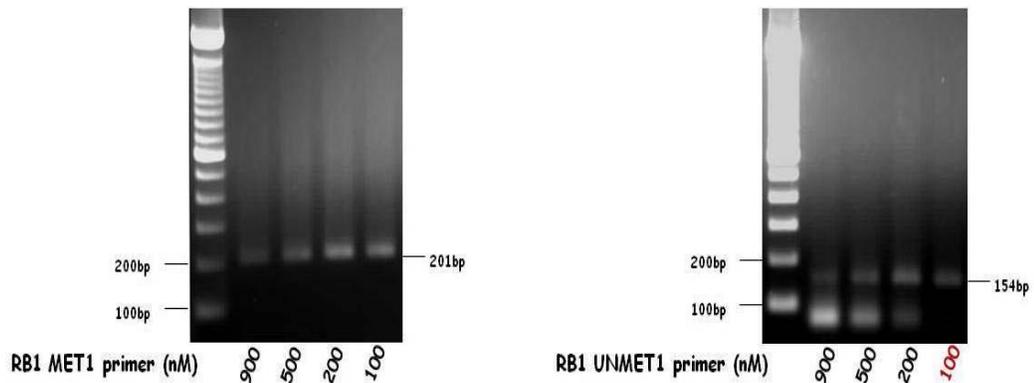


Figura 5.4 Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de SYBR- tiempo real de MSP de los cebadores *RB1 MET1* y *RB1 UNMET1*. La concentración óptima para *RB1 MET1* es de 100-200 nM (nano molas), en tanto para *RB1 UNMET1* es de 50-100nM. Utilizando como marcador de peso molecular 201 bp (pares de bases) para *RB1 MET1* y 154 bp en el caso de *RB1 UNMET1*. Fuente: Cortesía Instituto Nacional de Cáncer, Frederick, MD, EEUU.

Una vez obtenidas las concentraciones ideales de ADN y de los cebadores, se procedió a trabajar de manera individualizada con cada una de muestras de ADN de acuerdo a la concentración específica de cada una de ellas (Cuadro 5.1). Una vez listo el material genético, se analizó por el método MSP en tiempo real, utilizando SYBR GREEN para su detección.

La fluorescencia resultante de la incorporación de SYBR GREEN en la doble hebra de ADN producida durante la reacción de PCR fue registrada y los datos emitidos fueron cuantificados utilizando el valor de ciclo umbral (*Threshold Cycle, Ct*). En Cuadro 5.1 vemos de una manera clara el porcentaje de metilación de cada una de las muestras de ADN obtenidas de los bloques de tumor, como resultado del análisis de PCR en tiempo real.

Cuadro 5.1 MSP Tiempo Real del gen *RB1*

Muestras	MSP Cebadores	Cantidad ADN (ng)	Ct	Frecuencia de Metilación (%)
EO-07-2584	Metilado	10	40.0	0.04
	No Metilado		28.7	
EO-10-2778	Metilado	13	40.0	0.43
	No Metilado		32.2	
2475	Metilado	14	40.0	0.05
	No Metilado		29.1	
3304	Metilado	18	40.0	0.06
	No Metilado		29.2	
EO-07-1624	Metilado	19	40.0	0.01
	No Metilado		27.2	
EO-07-3700	Metilado	22	40.0	0.03
	No Metilado		28.4	
EO-08-2510	Metilado	28	40.0	0.02
	No Metilado		28.0	
EO-10-2108	Metilado	56	28.1	81.51
	No Metilado		30.2	
EO-08-447	Metilado	6.8	40.0	0.3
	No Metilado		31.5	
1042	Metilado	6.9	40.0	0.4
	No Metilado		32.1	
EO-07-1518	Metilado	7.2	40.0	0.2
	No Metilado		30.9	
EO-08-576	Metilado	9.4	40.0	No determinado
	No Metilado		38.1	
EO-08-1413	Metilado	9.7	36.4	37.7
	No Metilado		35.7	
EO-07-2550	Metilado	9.8	37.6	0.5
	No Metilado		29.9	
3340	Metilado	10.2	40.0	No determinado
	No Metilado		35.2	
EO-07-2769	Metilado	10.9	40.0	0.3
	No Metilado		31.6	
EO-07-3639	Metilado	11.3	40.0	0.1
	No Metilado		30.2	
EO-10-2917	Metilado	11.7	40.0	No determinado
	No Metilado		36.1	

Cuadro 5.2 Características clínicas de los pacientes con diagnóstico de retinoblastoma, de las muestras tumorales que caracterizaron el patrón de metilación en el gen *RB1*, abril-julio 2011

Muestras	Género	Edad de Diagnóstico	Etnia	Lateralidad del tumor
EO-07-2584	M	1a 2m	Ladino	Unilateral
EO-10-2778	M	2a 6m	Ladino	Unilateral
2475	M	1a 6m	Ladino	Bilateral
3304	F	2m	Ladino	Bilateral
EO-07-1624	F	3a 11m	Ladino	Unilateral
EO-07-3700	F	3a 10m	Indígena	Unilateral
EO-08-2510	F	2a 2m	Ladino	Unilateral
EO-10-2108	M	2a 2m	Ladino	Unilateral
EO-08-447	F	1a 1m	Ladino	Unilateral
1042	M	1a 9m	Ladino	Unilateral
EO-07-1518	M	2a 10m	Ladino	Bilateral
EO-08-576	M	3a 3m	Ladino	Unilateral
EO-08-1413	F	1a 8m	Ladino	Unilateral
EO-07-2550	M	7a 9m	Indígena	Unilateral
3340	M	5a 1m	Ladino	Bilateral
EO-07-2769	F	2a 0m	Ladino	Unilateral
EO-07-3639	F	4a 3m	Ladino	Unilateral
EO-10-2917	M	1a 10m	Ladino	Unilateral

Fuente: Datos obtenidos de POND (*Pediatric Oncology Network Database*), Julio 2011.

5.2 Sección II: Identificación de mutaciones puntuales en el gen *RB1*

Las 15 muestras de saliva de pacientes con diagnóstico de retinoblastoma fueron analizadas bidireccionalmente; sentido y contrasentido, secuenciando los 27 exones y la región del promotor del gen *RB1* para detectar mutaciones puntuales. (Cuadro 5.3)

Cuadro 5.3 Cebadores utilizados para PCR de cada uno de los exones del gen *RB1*

NOMBRE	F/R	Secuencia 5' a 3'
RB1 Pro	Pro F	CTGGACCCACGCCAGGTTTC
	Pro R	GTTTTGGGCGGCATGACGCCTT
RB1 Exón 1	Exón 1F	TTTTGTAACGGAGTCGGG
	Exón 1R	CATTCTGCAGACGCTCCG
RB1 Exón 2	Exón 2F	CTATTGAAACAAGTATGTA CTG
	Exón 2R	GGGTAATGGAATTATTATTAGC
RB1 Exón 3	Exón 3F	TGCCATCAGAAGGATGTGTTAC
	Exón 3R	TGGCAGTTCACTATTTGGTCC
RB1 Exón 4	Exón 4F	GTAGTGATTTGATGTAGAGC
	Exón 4R	CCCAGAATCTAATTGTGAAC
RB1 Exón 5	Exón 5F	TTGGGAAAATCTACTTGA ACTTG
	Exón 5R	CACAGGACTTAAATCTATGGGC
RB1 Exón 6	Exón 6F	TCTGGAAA ACTTTCTTT CAGTGATAC
	Exón 6R	TGGGGAATTTAGTCCA AAGG
RB1 Exón 7	Exón 7F	CCTGCATTTTCTCTC ATAC
	Exón 7R	ATGTTTGGTACCCACTAGAC
RB1 Exón 8	Exón 8F	GCAGAGTAGAAGAGGGATGGC
	Exón 8R	TGATTCCAGAGTGAGGGAGC
RB1 Exón 9	Exón 9F	TGCATTGTTCAAGAGTCAAG
	Exón 9R	AGTTAGACAATTATCCTCCC
RB1 Exón 10	Exón 10F	ATCTGTGCCTCTGTGTGCTG
	Exón 10R	GGTAACTGTTATAGGACACACAATTC
RB1 Exón 11	Exón 11F	GAGACAACAGAAGCATTATAC
	Exón 11R	CGTGAACAAATCTGAAACAC
RB1 Exón 12	Exón 12F	GGCAGTGTATTTGAAGATAC
	Exón 12R	AACTACATGTTAGATAGGAG
RB1 Exón 13	Exón 13F	TGCTTATGTT CAGTAGTTGTGGTTAC
	Exón 13R	TAGCAGCATACACAGGCAGC
RB1 Exón 14	Exón 14F	GTGATTTTCTAAAATAGCAGG
	Exón 14R	TGCCTTGACCTCCTGATCTG
RB1 Exón 15	Exón 15-6F	CAATGCTGACACAAATAAGG
	Exón 15-6R	AGCATTCTTCTCCTTAACC
RB1 Exón 17	Exón 17F	TCAAAAATTGGAAGGCTATTTCC
	Exón 17R	TTAGATGGTTTAGGGTGCTCG

NOMBRE	F/R	Secuencia 5' a 3'
RB1 Exón 18	Exón 18F	ATTGTCAATTGGGAATTTTCG
	Exón 18R	TGCAAATCCTAGGTGATTCAG
RB1 Exón 19	Exón 19F	ATAATCTGTGATTCTTAGCC
	Exón 19R	AAGAAACATGATTTGAACCC
RB1 Exón 20	Exón 20F	AAAGAGTGGTAGAAAAGAGG
	Exón 20R	CAGTTAACAAGTAAGTAGGG
RB1 Exón 21	Exón 21F	TTTGTTCCTTTAAACACACTTTGGG
	Exón 21R	CATAATTACCCTTATCTTTCCAATTC
RB1 Exón 22	Exón 22F	TAATATGTGCTTCTTACCAGTC
	Exón 22R	TTTAATGTTTTGGTGGACCC
RB1 Exón 23	Exón 23F	ATCTAATGTAATGGGTCCAC
	Exón 23R	CTTGGATCAAATAATCCCC
RB1 Exón 24	Exón 24F	TGTCAGTGGTTCTAGGGTAGAGG
	Exón 24R	ATGCCTGGATGAGGTGTTTG
RB1 Exón 25	Exón 25F	TTGCTAACTATGAAACACTGGC
	Exón 25R	CTCTGGATTCCCCAGATGAC
RB1 Exón 26	Exón 26F	GCATAAAGTAAGTCATCGAAAGC
	Exón 26R	AACGAAAAGACTTCTTGCAGTG
RB1 Exón 27	Exón 27F	CCACTTGCCAACTTACCCAG
	Exón 27R	TCTGTGAGAGACAATGAATCCAG

Cuadro 5.4 Mutaciones puntuales identificadas en el gen *RB1*, abril-julio 2011

Muestras	Región	Mutación	Aminoácido Alterado
AP700603	Exón 19	S648X	Codón de parada
AP700480	Exón 25	V858M	Metionina
AP700815	Exón 6	c.607+1G/C	Primera base del intrón
AP700069	Exón 6	c.602_3insT	Fenilalanina
AP700826	Exón 17	H549L	Leucina
AP700763	Exón 1	Delección GA	Codón de Parada

Fuente: Datos obtenidos de Boleta de Recolección de Datos: "Alteraciones genéticas en el gen *RB1* de pacientes con diagnóstico de retinoblastoma de UNOP durante el periodo 2000-2009", abril-julio 2011.

Cuadro 5.5 Otras variaciones genéticas identificadas en el gen RB1, abril-julio 2011

Muestras	Región	Otras Variaciones	Base Nitrogenada Modificada
AP700230	Exón 10	+52 G>C	G>C
AP700826	Exón 13	+68T>A	T>A
AP700878	Exón 19	+11,12,13 GAT>TTA	G>T
AP700759	Exón 20	-19T>A	T>A
AP700826	Exón 25	+11 G>T	G>T
AP700495	Exón 26	-10 T/A	T>A
AP700495	Exón 17	+81 insAA homocigota	
AP700956	Exón 22	-2A>G	

Fuente: Datos obtenidos de Boleta de Recolección de Datos: "Alteraciones genéticas en el gen *RB1* de pacientes con diagnóstico de retinoblastoma de UNOP durante el periodo 2000-2009", abril-julio 2011.

Cuadro 5.6 Características clínicas de los pacientes con diagnóstico de retinoblastoma, de las muestras de saliva que identificaron mutaciones puntuales en el gen *RB1*, abril-julio 2011

Muestra	Género	Método	Etnia	Lateralidad	Edad de Diagnóstico	Antecedente familiar
AP700502	M	Secuenciación	Ladino	unilateral	4 a 1m	No
AP701012	M	Secuenciación	Ladino	unilateral	0.7 m	No
AP700328	F	Secuenciación	Ladino	unilateral	2 a 7m	No
AP700501	F	Secuenciación	Ladino	unilateral	2 a 4m	No
AP700603	M	Secuenciación	Indígena	bilateral	2 a 6m	No
AP700069	F	WGA	Ladino	unilateral	2 a 2m	No
AP700230	M	WGA	Indígena	unilateral	2 a 8m	No
AP700470	F	Secuenciación	Indígena	bilateral	3 a 8m	No
AP700480	F	WGA	Ladino	unilateral	11 a 7m	No
AP700361	F	WGA	Ladino	unilateral	3 a 1m	No
AP700495	F	Secuenciación	Ladino	unilateral	1 a 6m	No
AP700759	F	WGA	Indígena	unilateral	1 a 9m	No
AP700815	M	WGA	Indígena	unilateral	1 a 9m	No
AP700826	M	WGA	Indígena	unilateral	1 a 8m	No
AP700878	M	Secuenciación	Ladino	unilateral	2 a 5m	No
AP700956	F	Secuenciación	Indígena	unilateral	1 a 5m	No
AP700763	M	Secuenciación	Ladino	unilateral	1 a 6m	Si

6. DISCUSIÓN

De acuerdo a datos obtenidos en UNOP, el 10% de los casos atendidos en dicho hospital, corresponden a retinoblastoma, una cifra superior al 3-4% que se observa en los hospitales en Europa y Estados Unidos. De los datos del censo poblacional en Guatemala del 2002, se calculó la incidencia de retinoblastoma en Guatemala; obteniendo como resultado 5 casos por millón, en niños menores de 14 años; mayor a la contemplada en Estados Unidos y Europa (4 casos/millón/año), y similar a la observada en Chiapas, México, (5 casos/millón/año) región fronteriza con Guatemala. Esta incidencia es superior en el departamento de Guatemala; 8 casos por millón al año, dos veces más elevada en comparación con la que presentan Europa y Estados Unidos. La incidencia es similar en la ciudad de Guatemala entre pacientes ladinos e indígenas. ⁽²²⁾

En este contexto, además del interés implícito de la producción de conocimiento, este trabajo es pionero en la caracterización genética de los pacientes guatemaltecos con diagnóstico de retinoblastoma.

La edad media de diagnóstico del retinoblastoma es a los 18 meses; en el caso de los tumores bilaterales (12 meses) y en quienes padecen tumores unilaterales (24 meses). Este patrón epidemiológico difiere en el grupo de pacientes con retinoblastoma en Guatemala. En este estudio, los pacientes con tumores unilaterales diagnosticados antes o durante los 24 meses fueron 13/29 (45%), en tanto los casos bilaterales captados antes de los 12 meses fue únicamente 1/6 (17%). ^(1, 2, 3, 5, 10, 11)

Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por Macías, M, et al., en población Mexicana, vemos que el diagnóstico en <1 año de edad fue de 14/27 (52%) de los casos bilaterales y <6 meses en 10/27 (37%) de los casos unilaterales, muy similar a la edad promedio de diagnóstico en general. La edad temprana en el diagnóstico de pacientes con retinoblastoma unilateral no es única en México, de acuerdo con estudios recientes, otras poblaciones latinas, como Argentina (12.5 meses), España, Colombia y Cuba (12.2 meses), también diagnostican de manera oportuna y precoz dichos casos. ⁽²³⁾

Por diversos factores Guatemala realiza diagnósticos tardíamente, entre ellos el poco acceso a servicios de salud en regiones del área rural, la extrema pobreza y el bajo nivel educativo; sumado a eso, en todo el país únicamente se cuenta con un centro especializado de referencia, el cual no se da abasto para diagnosticar y captar todos los casos. Según lo reportado por Macías, M, et al., la edad de diagnóstico no es útil para establecer un diagnóstico diferencial entre tumores hereditarios y no hereditarios (unilateral), sin embargo la detección molecular sí influye en el manejo clínico y consejo genético en las familias afectadas. ⁽²³⁾

El retinoblastoma no presenta preferencia alguna por género ni etnia. ^(1, 2, 3,5) Sin embargo de acuerdo a datos obtenidos en UNOP, en Guatemala la incidencia en ladinos es mayor (6 casos por millón al año), mientras que en indígenas es de 3 casos. En el Departamento de Guatemala la incidencia para ambas etnias; ladina e indígena, es alta; 8 y 7 casos respectivamente. Nuestro estudio muestra claramente un predominio por la etnia ladina 26/35 (74%), y en cuanto al género, ninguno presentó mayoría absoluta, masculinos 18/35 (51%) y femenino 17 (49%), de los 35 pacientes. Esto hallazgo nos hace pensar que existe una pobre captación de casos de etnia indígena que habitan en regiones lejanas al área urbana, explicando de cierta manera la baja incidencia de dicha etnia.

En las últimas dos décadas se ha demostrado que la hipermetilación de islas CpG en regiones promotoras de genes es un evento común y temprano en carcinogénesis, incluyendo al retinoblastoma, además de estar asociado frecuentemente con supresión de la expresión genética mediante la silenciamiento epigenético. ^(44, 53)

Ohtani-Fujita, et al., han demostrado que la metilación *in vitro* e *in vivo* de la región promotora del *RB1* reduce drásticamente la expresión de pRB. 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. ^(18,19)

El estado de metilación de las islas CpG, en la región promotora del gen *RB1*, de nuestro estudio ha sido evaluada por SYBR basada en PCR específica para metilación (MSP) en tiempo real, con el propósito de estudiar el mecanismo molecular responsable de retinoblastoma en pacientes de Guatemala. La metilación del promotor de *RB1* se detectó en 2 de los 18 pacientes con retinoblastoma, constituyen el 11% de los cambios que contribuyen al silenciamiento del gen *RB1*. Este estudio muestra que la metilación del promotor del gen *RB1* es un mecanismo importante para los pacientes con retinoblastoma en Guatemala.

Si comparamos nuestros resultados con la población de la India, según lo descrito por Joshep B, et al., 3 (6%) de los 45 pacientes analizados presentaron hipermetilación, de los cuales dos, fueron tumores bilaterales. ⁽¹⁹⁾ Nuestro estudio nos dio resultados opuestos, el 100% de nuestras muestras hipermetiladas fueron tumores unilaterales. Datos de estudios ya publicados y lo observado en nuestro trabajo muestra que metilación del alelo *RB1* se asocia con una reducción del nivel de transcripción en *RB1* en tumores esporádicos; la hipermetilación ocurre en los tumores unilaterales y pueden reducir la actividad del gen. ⁽¹⁹⁾

Se utilizó WGA y secuenciación para identificar mutaciones puntuales en los 27 exones del gen *RB1*. El objetivo de trabajar con MLPA fue que el método múltiple de PCR descubre los números de copias anormales de hasta 50 ADN genómicos diferentes o secuencias de ARN, y es capaz de distinguir secuencias que difieren en un sólo nucleótido. El análisis genético con pequeñas concentraciones de ADN, juega un papel importante en el diagnóstico de enfermedades genéticas, análisis de ligamiento genéticos y diversos estudios genéticos. Utilizamos WGA en las muestras de ADN que tenían concentraciones por debajo de los 80 ng/ μ l, 7/17 muestras (41.18%), para amplificar cientos de veces el genoma completo del ADN genómico humano para el análisis genotípico.

En el gen *RB1* en la entidad del retinoblastoma, han sido reportadas todo tipo de mutaciones; 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), 12-14 en este último se encuentra una de las regiones reguladoras de la pRB. ⁽²⁰⁾

En nuestro estudio en la muestra AP700603, identificamos la mutación S648X TCA>TAA, localizada en el exón 19. Podemos observar una modificación de la base nitrogenada C por A, en el codón TCA a TAA, un codón de parada. Es la primera vez que ocurre esta mutación, no había sido descrita con anterioridad y ocurrió en un paciente guatemalteco, con retinoblastoma bilateral, de etnia indígena, sin antecedentes familiares de la enfermedad, quien fue diagnosticado tardíamente, a los 2 años 6 meses (30 meses). Este codón de parada identificado influye de forma negativa en la terminación prematura de la síntesis de la proteína.

De igual manera en la muestra AP700480 identificamos la mutación V858M TGT>TGA, localizada en el exón 25. La modificación se da entre el codón TGT a TGA, también un codón de parada. El paciente es guatemalteco, ladino, con tumor unilateral, femenino, con una edad de diagnóstico a los 11 años y 7 meses y sin antecedentes familiares. De igual forma esta mutación se presenta por primera vez en una paciente, nunca antes había sido reportada en ningún otro estudio, y nosotros lo reportamos en el nuestro.

En la muestra AP700815, en el exón 6 localizamos la mutación c.607+1G/C, que corresponde a la primera base del intrón, siempre corresponde a G que se modifica por C y destruye el *splicing* o sitio de empalme, esta alteración la observamos en un paciente que presentaba tumor unilateral, de etnia indígena, masculino, con una edad de diagnóstico al año y nueve meses, sin antecedentes familiares de retinoblastoma.

Las muestras AP700069 y AP700826 también presentaron mutaciones puntuales. AP700069; c.602_3insT localizada en el exón 6, la modificación se dio en los codones ATT >TTT, que corresponden al aminoácido Fenilalanina; el paciente presentaba retinoblastoma unilateral, correspondía a la etnia ladina, era del género femenino, no antecedentes familiares del tumor y la edad de diagnóstico también fue tardíamente. Un efecto de la alteración producida por el cambio, se da en la traducción que posteriormente repercute causando la

formación de una mala proteína. En tanto AP700826 presentó la mutación H549L en el exón 17, observándose un cambio en los codones CAT por CTT correspondientes a Histidina por Leucina. Las características clínicas de dicho paciente eran indígena, masculino, tumor unilateral, edad de diagnóstico al año y 8 meses, sin antecedentes familiares.

Otras variaciones genéticas fueron identificadas (Cuadro 5. 5), sin embargo en la muestra AP700763 es interesante mencionar, debido a que se identificó una deleción de GA en el exón 1, lo realmente curioso es que dicho paciente fue el único en todo el estudio con antecedentes familiares de retinoblastoma. Dicha deleción corresponde a un codón de parada, lo que interrumpe la síntesis de la correcta de la proteína de Rb.

Por tanto el 100% (1/1) de pacientes con antecedentes familiares analizados en el estudio de mutaciones puntuales y/o variaciones genéticas presentó una deleción localizada en el exón 1. De los pacientes con tumores bilaterales 1 de las 2 muestras (50%) presentó una mutación genética y en alrededor del 20% de los retinoblastomas unilaterales también se identificaron mutaciones. Dos de las mutaciones identificadas en este estudio no habían sido reportadas con anterioridad.

Nuestro trabajo muestra que existen mutaciones en línea germinal en los casos de retinoblastoma familiar, y sugiere que los casos con tumores bilaterales son típicos con mutaciones germinales 1/2 (50%). En tanto el segundo caso bilateral puede presentar mutación, la cual pudo no haber sido detectada con las técnicas utilizadas en este estudio.

No debemos pasar por alto 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. Este estudio mostró la presencia de 14 alteraciones genéticas en 11 pacientes (64.71%), de los 17 a estudio. Estos resultados muestran que en cierta medida debe existir otro tipo de alteraciones más finas, las cuales no pueden ser detectadas con la tecnología utilizada.

7. CONCLUSIONES

- a) La alteración del gen *RB1* no es el único mecanismo que predispone al desarrollo del retinoblastoma. De manera que en los casos en que el gen *RB1* se encuentra normal, es probable que otros factores o proteínas; como los factores de transcripción E2F, desacetilasas de histonas, desaminasas, cinasas, ciclinas, etc., que regulan la función de la proteína (pRB), sean los que se encuentren alterados favoreciendo de manera indirecta el desarrollo de retinoblastoma.
- b) La metilación del promotor del gen *RB1* se detectó en 2 de los 18 pacientes con retinoblastoma; lo que constituye el 11% de los cambios que contribuyen al silenciamiento del mismo gen. La metilación del promotor del gen *RB1* es un mecanismo importante para los pacientes con retinoblastoma en Guatemala.
- c) Podrían existir mutaciones puntuales no detectables con los métodos utilizados. Por lo tanto, no existe un 100% de probabilidad de que sea un caso esporádico, sin riesgo para la futura progenie del paciente. No obstante, este estudio identificó 14 alteraciones genéticas en 11 pacientes (64.71%), de los 17 a estudio. El 100% (1/1) de pacientes con antecedentes familiares analizados en el estudio presentó una delección localizada en el exón 1. De los pacientes con tumores bilaterales 1 de las 2 muestras (50%) presentó una mutación genética y en alrededor del 20% de los retinoblastomas unilaterales también se identificaron mutaciones. Dos de las mutaciones identificadas en este estudio no habían sido reportadas con anterioridad.

8. RECOMENDACIONES

- a) Los estudios de biología molecular contribuyen con el adecuado asesoramiento genético y el diseño apropiado de tratamiento temprano. Es necesario llevar a cabo estudios moleculares de la enfermedad a nivel asistencial con el fin de proporcionar un adecuado consejo genético y diagnóstico prenatal en familias afectadas de retinoblastoma, especialmente en casos familiares y bilaterales esporádicos.
- b) Las muestras tumorales embebidas en parafina representan una importante fuente de ADN y proporcionan información valiosa para el consejo genético. Por tanto es importante conservar en óptimas condiciones las muestras tumorales de los pacientes a quienes se les realiza enucleación para su posterior análisis.
- c) La identificación de mutaciones puntuales en el gen *RB1* proporciona una oportunidad para la predicción precisa de los riesgos en los familiares de los pacientes con retinoblastoma. Para convertir los logros científicos en beneficios para las personas en riesgo, un protocolo para el análisis de las mutaciones de forma rutinaria debiera ser establecido.
- d) Es necesario reducir la edad de diagnóstico de los pacientes con retinoblastoma en Guatemala. Un programa educativo sobre la enfermedad en áreas rurales podría ser valioso para la detección y captación temprana de casos, y así mejorar la sobrevida y ofrecer un tratamiento oportuno.
- e) Un estudio epidemiológico detallado, con datos como la ocupación del padre, hábitos alimenticios, lugar de origen de sus antecesores, etnia, entre otros, podría contribuir a esclarecer el mecanismo responsable del desarrollo de retinoblastoma en pacientes guatemaltecos.
- f) La incidencia de retinoblastoma en el departamento de Guatemala es dos veces mayor a la observada en Europa y Estados Unidos. Los cálculos de la tasa de incidencia fueron realizados en base a datos del censo poblacional del 2002, por tanto los cálculos podrían ser incorrectos, por lo que valdría la pena realizar nuevamente las tasas con datos actualizados de las edades que competen a esta patología.

9. APORTES

Además del interés implícito de la producción de conocimiento, este trabajo es pionero en la caracterización genética de los pacientes guatemaltecos con diagnóstico de retinoblastoma. La caracterización de los patrones de metilación como parte de la oncogénesis y la identificación de nuevas mutaciones nos permitió comparar nuestros hallazgos con los descritos para otras poblaciones respecto al diagnóstico, pronóstico, evolución clínica como la respuesta a la terapia.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fontenla JR, Massana A, Pelegrín L, Aranda A, Burés A, Ferran M, Ribas E. Retinoblastoma. JANO (España). 2005 may; 68(1564): 33-44.
2. Kandalam M, Mitra M, Subramanian K, Biswas J. Molecular pathology of retinoblastoma. Middle East Afr J Ophthalmol (India). 2010 Jul-Sep; 17(3): 217-223.
3. Aerts I, Rouic LL, Gauthier-Villars M, Brisse H, Doz F, Desjardins L. Retinoblastoma. Orphanet J Rare Dis(Reino Unido) 2006, 1:31.
4. Mastrangelo D, De Francesco S, Di Una L, Lentini L, Hadjistilianou T. The retinoblastoma paradigm revisited. Med Sci Monit [revista en línea] 2008 dic [accesado el 09 Febrero 2011] 14 (12): RA231-40. Disponible en: http://www.medscimonit.com/fulltxt_free.php?ICID=869470.
5. Martín N, García J, Sánchez J, Triviño E, Guitart M, Gil JJ. Retinoblastoma. Annals d´Oftalmologia (España). 2001; 9(2): 74-92.
6. Chintagumpala M, Chevez-Barrios P, Paysse EA, Plon SE, Hurwitz R. Retinoblastoma: review of current management. The Oncologist (Durham, North Carolina). 2007 Oct; 12(10): 1237-1246.
7. Camargo B, Antoneli CBG. Retinoblastoma. En: Sierrasesumaga L, Antillón F. editores. Tratado de oncología pediátrica enfermedades malignas del niño y del adolescente. Madrid: Prentice Hall; 2006: p. 495-505.
8. Cerecedo Díaz F, López Aguilar A, Rivera Márquez H, Arias Gómez J, Ramírez Santarita F, Rodríguez Cruz M. Supervivencia y aspectos clínicos del retinoblastoma. An Pediatr (España). 2003; 58(1): 3-9.
9. Menéndez I, Puig M, Ruisánchez N. El Retinoblastoma: Paradigma del cáncer hereditario. Rev Cubana Med (Cuba). 2002; 41(1): 35-8.

10. Stiller CA, Parkin DM. Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer. *British Medical Bulletin* (Reino Unido). 1996; (52)2: 682-703.
11. Iastrebner M, Flores A, Benasayag S. Tratamiento hipometilante de los Síndromes Mielodisplásicos. De la fisiopatogenia y la farmacología a la práctica clínica. *Hematología* (Argentina). 2009; 13(1): 1-13.
12. Melamud A, Palekar R, Singh A. Retinoblastoma. *Am Fam Physician* (Leawood, Kansas). 2006 Mar; 73(6): 1039-1044.
13. Rodríguez M, Téllez N, Cerbón MA, López M, Cervantes A. Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Rev Invest Clín* (México). 2004; 56(1): 56-71.
14. nci.nih.gov [Sede Web]. Estados Unidos: Instituto Nacional del Cáncer; [actualizado 27 de octubre de 2010; accesado 16 de marzo de 2011]. Disponible en: <http://nci.nih.gov/espanol/instituto/hojasinformativas/descripcion>.
15. web.ncifcrf.gov [Sede Web]. Maryland: NCI-Frederick; [accesado 16 de marzo de 2011]. Disponible en: <http://web.ncifcrf.gov/about/default.asp>.
16. Higueros García A. Estudio clínico-genético del retinoblastoma. [tesis Médico y Cirujano] Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Médicas, 1994.
17. Quiñones Tello A. Características epidemiológicas y clínicas de retinoblastoma. [tesis Médico y Cirujano] Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Médicas, 1997.
18. Rodríguez-Cruz M, del Prado M, Salcedo M. Perspectivas en la genómica del retinoblastoma: Implicaciones del gen supresor de tumor RB1. *Rev Invest Clín* (México) 2005 Jul - Ago; 57(4): 572 - 581.
19. Joseph B, Mamatha G, Raman G, Shanmugam MP, Kumaramanickavel G. Methylation status of RB1 promoter in Indian retinoblastoma patients. *CBT* 2004 Feb; 3(2): 184-187.

20. Parma DL, Dalamon VK, Fernández C, Szijan I, Damel A. Importancia de los estudios de biología molecular en el asesoramiento genético de familias argentinas con Retinoblastoma. *Arch Soc Esp Oftalmol (España)* 2009; 84: 557-562.
21. Abramson DH. Retinoblastoma in the 20th Century: past success and future challenges the weisenfeld lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci (Rockville, Maryland)*. 2005 Ago; 46(8): 2684-2691.
22. Fajardo Gutiérrez A, Juárez Ocaña, S, González Miranda, G, Palma Padilla, V, Carreón Cruz, R, Ortega Álvarez, M, et al. Incidence of cancer in children residing in ten jurisdictions of the Mexican Republic: importance of the Cancer registry (a population-based study). *BMC Cancer* 2007; 7 (68): 1-15.
23. Macías M, Dean M, Atkinson A, Jiménez-Morales S, García-Vázquez FJ, Saldaña-Álvarez Y, et al. Spectrum of RB1 gene mutations and loss of heterozygosity in Mexican patients with retinoblastoma: identification of six novel mutations. *Cancer Biomark* 2008; 4(2): 93-9.
24. Orjuela M, Castañeda VP, Ridaura C, Lecona E, Leal C, Abramson DH, et al. Presence of human papilloma virus in tumor tissue from children with retinoblastoma: an alternative mechanism for tumor development. *Clin Cancer Res* 2000; 6(10): 4010-6.
25. Orjuela MA, Titievsky L, Liu X, Ramírez-Ortiz M, Ponce-Castañeda V, Lecona E, et al. Fruit and vegetable intake during pregnancy and risk for development of sporadic retinoblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(6): 1433-40.
26. de Lima EL, da Silva VC, da Silva HD, Bezerra AM, de Morais VL, Cruz RV, et al. MTR polymorphic variant A2756G and retinoblastoma risk in Brazilian children. *Pediatr Blood Cancer* 2010 Jul; 54(7): 904-8.
27. Aung LL, Chan YH, Yeoh EJ, Tan PL, Quah TC. Retinoblastoma: a recent experience at the national university hospital, Singapore. *Ann Acad Med Singapore*. 2009; 38 (8):693-8.
28. Meza Junco J, Montañón Loza A, Aguayo González A. Bases moleculares del cáncer. *Rev Invest Clin* 2006; 58(1): 56-70.

29. Cáncer. En: Karp G. Biología celular y molecular. México: McGraw-Hill Interamericana; 1998: p. 671-700.
30. Du W, Pogoriler J. Retinoblastoma family genes. *Oncogene* (Chicago, IL). 2006; 25: 5190–5200.
31. Moll AC, Imhof SM, Schouten-Van Meeteren AYN, Boers M. At what age could screening for familial retinoblastoma be stopped? A register based study 1945–98. *Br J Ophthalmol* (Reino Unido). 2000; 84:1170–1172.
32. Mastrangelo D, Hadjistilianou T, De Francesco S, Loré C. Retinoblastoma and the genetic theory of cancer: an old paradigm trying to survive to the evidence. *J Cancer Epidemiol* (Philadelphia) 2009; 2009: 301973.
33. Gene Reviews [Sede Web]. Seattle: University of Washington; 1993 [actualizada el 10 de junio de 2010; accesado el 15 de marzo de 2011]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1452/>.
34. Rivera Williams C. El Genoma humano. *Rev Med Hond* 2002; 70 (3): 132-137.
35. Oliva R. Genoma humano y estructura y evolución de los genes. En: Oliva Virgili R, Vidal Taboada JM editores. *Genoma humano: nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento*. Barcelona: Edicions Universitat; 2006: p. 13-20.
36. Utilización de la información genética: de la transcripción a la traducción. En: Karp G. *Biología celular y molecular*. México: McGraw-Hill Interamericana; 1998: p. 434-487.
37. Kandalam M, Mitra M, Subramanian K, Biswas J. Molecular pathology of retinoblastoma. *MEAJO* [revista en línea] 2010 jul [accesado el 09 Febrero 2011] 17 (3): 217-23. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2934713/?tool=pubmed>.
38. Helt AM, Galloway DA. Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins. *Carcinogenesis*. 2003; 24(2): 159–169.
39. Real Arribas FX. Mecanismos de la oncogénesis. En: Díaz-Rubio E, García-Conde J. editores. *Oncología Clínica Básica*. España: Arán; 2000: p.51-52.

40. Lipinski MM, Jacks T. The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene* (Chicago, Ill). 1999 Dec; 18(55): 7873-7882.
41. Goodrich DW. The retinoblastoma tumor suppressor gene, the exception that proves the rule. *Oncogene* (Chicago, Ill). 2006 Ago; 25(38): 5233-5243
42. King MW. Supresores de tumores y cáncer. [Monografía en línea]. The Medical Biochemistry Page; 2011 [accesado 14 marzo 2011]. Disponible en: <http://themedicalbiochemistrypage.org/spanish/tumor-suppressors-sp.html>.
43. Wiman KG. The retinoblastoma gene: roll in cell cycle control and cell differentiation. *The FASEB Journal* (Bethesda, Maryland). 1993 Jul; 7(10): 841-845.
44. Esteller M. Epigenetics in Cancer. *N Engl J Med* 2008 Mar; 358:1148-1159.
45. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000;9:2395- 402.
46. Gal Yam E, Saito Y, Egger G, Jones PA. Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annu Rev Med*. 2008; 59: 267-280.
47. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99 (3): 247-57.
48. De La Rosa Velázquez I, Rincón- Arano H, Benítez-Bribiesca L, Recillas-Targa F. Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Res*. 2007; 67 (6): 2577-2585.
49. Recillas-Targa F, De La Rosa Velázquez I, Soto Reyes E, Benítez-Bribiesca L. Epigenetic boundaries of tumour suppressor gene promoters: the CTCF connection and its role in carcinogenesis. *J Cell Mol Med*. 2006; 10 (3): 554-568.
50. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 415-28.

51. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev cancer* 2001; 1: 157-62.
52. Gronbaek K, Hother C, Jones P. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 2007; 115: 1038-58.
53. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet.* 2007; 16(1): 50-59.
54. Delgado MD. Modificaciones de la cromatina, regulación génica y cáncer. [monografía en línea]. España: Real Academia Nacional de Farmacia; 2010 [accesado 28 Febrero 2011]. Disponible en: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/813/783>.
55. Sulewska A, Niklinska W, Kozlowski M, Minarowski L, Niklinski J, Dabrowska K, *et al.* Lech detection of DNA methylation in eucaryotic cells. *Folia Histochem Cytobiol.* 2007;45(4):315-24.
56. Brichard B, Heusterspreute M, De Potter P, Chantrain C, Vermeylen C, Sibille C, *et al.* Unilateral retinoblastoma, lack of familial history and older age does not exclude germline RB1 gene mutation. *Eur J Cancer* 2006 Jan; 42(1): 65-72.

11. ANEXOS

No.

BOLETA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

"ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL GEN RB1 DE PACIENTES
CON DIAGNÓSTICO DE RETINOBLASTOMA DE LA UNIDAD NACIONAL
DE ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA ENTRE EL AÑO 2000 Y 2009"

Identificación de la muestra: _____

Patrón de Metilación:

Hipometilación

Hipermetilación

Porcentaje: _____

Mutación:

Ausente

Presente

Tipo: _____

Localización: _____