

# IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL ASESORAMIENTO GENÉTICO DE FAMILIAS ARGENTINAS CON RETINOBLASTOMA

## THE RELEVANCE OF MOLECULAR BIOLOGY STUDIES IN THE GENETIC COUNSELLING OF ARGENTINE RETINOBLASTOMA FAMILIES

PARMA DL<sup>1</sup>, DALAMON VK<sup>1</sup>, FERNÁNDEZ C<sup>2</sup>, SZIJAN I<sup>1</sup>, DAMEL A<sup>3</sup>

### RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar la importancia de la detección de mutaciones del gen *RBI* en el asesoramiento genético de las familias argentinas con retinoblastoma.

**Métodos:** Se incluyeron en este estudio 34 familias argentinas con Retinoblastoma (Rb) bilateral y unilateral. Se analizaron 130 muestras de ADN de leucocitos, tumores y vellosidades coriónicas, por ensayos de Biología Molecular indirectos y directos, como Southern blot, segregación de los polimorfismos BamHI, Rbi4, XbaI y Rb 1.20 (PCR-RFLP, PCR-STR), PCR-heteroduplex y secuenciación del gen *RBI*.

**Resultados:** El análisis molecular fue informativo en 18 familias de las 34 incluidas en el estudio (53%), el 56% con Rb bilateral y el 44% con Rb unilateral. Se contó con muestras de ADN tumoral de 11 pacientes que se estudiaron para detectar pérdida de heterocigosidad (LOH), que permitió identificar el alelo *RBI* mutado en 9 pacientes (82%). Cuando no se analizaron las muestras tumorales,

### ABSTRACT

**Objective:** Evaluate the relevance of *RBI* mutations detection in the genetic counselling of Argentine retinoblastoma families.

**Methods:** We included in this study 34 Argentine families with bilateral and unilateral Retinoblastoma (Rb). 130 DNA samples from leukocytes, tumors and chorionic villus were analyzed by indirect and direct molecular biology assays like Southern blot, segregation of polymorphisms BamHI, Rbi4, XbaI y Rb 1.20 (PCR-RFLP, PCR-STR), PCR-heteroduplex and sequencing of *RBI* gene.

**Results:** Molecular biology analysis was informative in 18 out of 34 families studied (53%), 56% with bilateral and 44% with unilateral Rb. DNA tumor samples of 11 patients were available and could be studied by loss of heterozygosity (LOH) detection, that allowed us to identify the mutated *RBI* allele in 9 (82%) patients. When tumor samples were not analyzed, the studies were informative only in 9 out of 23 patients (39%); we used direct mutation

Recibido: 5/3/09. Aceptado: 1/12/09.

Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Cátedra de Genética y Biología Molecular. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina.

<sup>1</sup> Doctora de la Universidad de Buenos Aires.

<sup>2</sup> Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

<sup>3</sup> Médica Oftalmóloga de la Universidad de Buenos Aires. Jefe de la Unidad de Oftalmología Pediátrica del Hospital de Niños de Buenos Aires. Estudio financiado por Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT) y Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires (UBACYT).

Correspondencia:

Diana L. Parma

Cátedra de Genética y Biología Molecular

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Universidad de Buenos Aires

Junín 956, (1113) Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Argentina)

E-mail: dlparma@yahoo.com

los estudios fueron informativos solo en 9 de los 23 pacientes (39%); se utilizó la detección directa en 17 pacientes (41% informativo) e indirecta en 20 (60% informativo).

**Conclusiones:** Los resultados demuestran la necesidad de contar con ADN del tumor, cuando el paciente fue enucleado, y acentúan la importancia de la detección directa de la mutación en familias con Rb esporádico temprano sin muestra tumoral. Los estudios de biología molecular contribuyeron con el adecuado asesoramiento genético de pacientes argentinos y sus familiares y el diseño apropiado de su tratamiento temprano.

**Palabras claves:** Retinoblastoma, gen *RBI*, mutación, análisis de ADN, asesoramiento genético.

detection in 17 (41% informative) and indirect assays in 20 (60% informative) patients.

**Conclusions:** The results prove the necessity to have DNA tumor, when the patient has been enucleated, and emphasize the importance of direct mutation detection in families with early sporadic Rb without tumor sample.

The *RBI* molecular biology contributed to the adequate genetic counselling of Argentine patients and relatives and their appropriate early treatment planning (*Arch Soc Esp Oftalmol* 2009; 84: 557-562).

**Key words:** Retinoblastoma, *RBI* gene, mutation, DNA analysis, genetic counselling.

## INTRODUCCIÓN

El retinoblastoma (Rb) es un tumor maligno de la niñez, que se inicia cuando ocurren dos eventos mutacionales en el locus 13q14, que inactivan ambos alelos del gen del retinoblastoma (*RBI*) (1). *RBI* forma parte de la familia de genes supresores de tumor, los cuales inhiben normalmente el crecimiento celular y regulan negativamente la proliferación (2). Este gen posee 200 kb y 27 exones y codifica para una proteína reguladora del ciclo celular llamada pRb o p110<sup>RB</sup> (100KDa) (3).

Alfred Knudson propuso que la inactivación de *RBI* ocurre a través del mecanismo del «doble golpe». La primera mutación puede aparecer en la línea germinal (Rb hereditario, 40%) o en las células somáticas (Rb no hereditario, 60%) (4). La segunda mutación es somática en todos los casos (ocurre sólo en retinoblastos) y se presenta con alta frecuencia. En la forma hereditaria, que se presenta como un Rb unilateral multifocal o bilateral, una de las mutaciones está presente en todas las células del individuo, incluidas las células somáticas (retinales) y germinales. En la forma no hereditaria de la enfermedad, que se presenta como un Rb unilateral unifocal, ambas mutaciones deben ocurrir en un solo retinoblasto (5).

En el 70% de los tumores, la segunda mutación involucra la pérdida somática del alelo normal. Estos mecanismos de pérdida alélica pueden ponerse de manifiesto mediante herramientas de biología

molecular, como la pérdida de heterocigocidad (LOH) de loci polimórficos en *RBI*, comparando el genotipo constitucional del paciente y el genotipo tumoral (6,7).

Entonces, debido a la alta frecuencia con la que ocurre la segunda mutación en *RBI*, el Rb se transmite como una enfermedad autosómica dominante con una penetrancia del 90% (8), es decir que sólo un 10% de los que presenten una mutación en dicho gen permanecerían como portadores sanos. En la forma hereditaria, sólo el 25% de los casos presenta historia familiar (Rb hereditario transmitido), el 75% restante se debe a mutaciones nuevas en la línea germinal o durante la gestación, que serán transmitidas hereditariamente por el afectado (hereditario de novo). En los casos no hereditarios, ambas mutaciones se encuentran presentes sólo en el tejido tumoral, por lo que la mutación no será transmisible.

Los tipos de mutaciones descritas en *RBI* son: deleciones microscópicas (5%), deleciones submicroscópicas (15%) y mutaciones pequeñas (80%) (9). Las estrategias de biología molecular para su estudio pueden ser directas o indirectas, en función de si se detecta o no la mutación implicada.

El estudio de las mutaciones es fundamental para el diagnóstico temprano, la detección de la predisposición al Rb y otros cánceres y el asesoramiento genético a las familias afectadas. El momento del diagnóstico es importante para el pronóstico de la visión y la supervivencia.

## SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron en este estudio 34 familias con retinoblastoma (Rb) bilateral y unilateral, de distintos orígenes étnicos y todas las regiones geográficas de la Argentina (tabla I). Los pacientes fueron derivados del Servicio de Oftalmología del Hospital de Niños de la Ciudad de Buenos Aires y el diagnóstico fue establecido utilizando criterios oftalmológicos e histopatológicos. Todos los casos fueron esporádicos, excepto la familia 1, que presentó padre (1) e hija (1') con Rb. En total, se analizaron 130 muestras de ADN de leucocitos de sangre periférica, tumores y vellosidades coriónicas, por ensayos de Biología Molecular indirectos y directos como Sou-

thern blot (10), segregación de polimorfismos (11-13), PCR-heteroduplex y secuenciación (10,14) del gen *RBI*. Los polimorfismos estudiados fueron: *BamHI*: sitio de restricción en el intrón 1 (g.2300 A>G) (15); *Rbi4*: repetición de la secuencia TG en el intrón 4 (g.43218) (16); *XbaI*: sitio de restricción en el intrón 17 (g.99426 T>C) (17); *RBI.20*: repetición de la secuencia CTTT en el intrón 20 (g.156895) (18), que se analizaron por PCR-RFLP y PCR-STR. De esta forma, se conformaron los haplotipos y se identificó el haplotipo de riesgo. Para el análisis de secuenciación presentado en este trabajo, se amplificó por PCR el exón 20 del gen *RBI* y sus secuencias intrónicas flanqueantes y se realizó la técnica de Sanger (14).

Tabla I.

Paciente	Sexo	Edad al diagnóstico (meses)	Presentación	Tumor disponible	LOH	Estudio informativo	Referencia bibliográfica
1	m	3	bilateral	no	ND	sí	10
1'	f	0	bilateral	no	ND	sí	12
3	f	24	unilateral	no	ND	no	10
10	m	1	bilateral	no	ND	sí	10
15	m	6	bilateral	no	ND	sí	10
19	f	10	bilateral	no	ND	sí	10
26	m	2	bilateral	no	ND	no	10
37	f	6	bilateral	no	ND	no	10
41	f	26	unilateral	no	ND	no	10
44	m	4	unilateral	sí	sí	sí	12, 14
47	f	2	unilateral	no	ND	no	11
51	f	10	bilateral	sí	ND	sí	10
54	f	10	unilateral	no	ND	no	11
57	m	12	bilateral	no	ND	no	11
60	m	12	bilateral	no	ND	sí	10
65	m	35	bilateral	no	ND	no	11
68	m	6	unilateral	sí	sí	sí	11
72	f	18	bilateral	sí	sí	sí	11, 12
84	m	8	bilateral	no	ND	no	11
107	m	8	bilateral	sí	sí	sí	11
112	f	11	unilateral	no	ND	no	11
115	m	10	unilateral	sí	sí	sí	11
121	f	20	bilateral	no	ND	no	11
148	m	29	unilateral	sí	sí	sí	
151	m	12	bilateral	sí	sí	sí	11, 12, 14
154	f	35	unilateral	no	ND	no	11
190	f	8	bilateral	sí	sí	sí	12, 14
194	m	2	bilateral	no	ND	sí	
197	m	6	unilateral	sí	sí	sí	12
211	f	16	bilateral	no	ND	no	14
224	m	3	bilateral	no	ND	no	13
265	f	7	unilateral	no	ND	no	14
291	m	7	unilateral	sí	sí	sí	
294	f	2	unilateral	no	ND	no	13
360	m	30	unilateral	no	ND	sí	13

m: masculino; f: femenino; ND: no determinado.

## RESULTADOS

El análisis molecular fue informativo en 18 familias de las 34 incluidas en el estudio (53%) (tabla I), el 56% con Rb bilateral y el 44% con Rb unilateral (10-14). En 15 de ellas fue posible identificar si el alelo mutado era el paterno (en 6) o el materno (en 9).

Se contó con muestras de ADN tumoral de once pacientes que se estudiaron para detectar pérdida de heterocigosidad (LOH), que permitió identificar el alelo *RBI* mutado en 9 pacientes (82%). Cuando no se tuvo acceso a las muestras tumorales, los estudios fueron informativos solo en 9 de los 23 pacientes (39%); se utilizó la detección directa en 17 pacientes (el 41% fue informativo) e indirecta en 20 (el 60% fue informativo).

Se muestra el análisis realizado a cuatro familias de este grupo:

El individuo 60 (sin antecedentes, tumor bilateral) portaba la mutación g.156820delA, en el exón 20 del gen *RBI*, evidenciada por heteroduplex y posterior secuenciación (14). Se analizó el ADN de sangre periférica de dos hermanos en edad de riesgo para establecer la probabilidad de desarrollo de Rb. En ambos casos, la secuencia fue comparable a la secuencia obtenida para un control normal, por lo que pudo excluirse a ambos hermanos del riesgo de desarrollar o transmitir Rb a su descendencia (fig. 1).

Los individuos 148 y 291 (sin antecedentes, tumor unilateral, de aparición temprana, sugiriendo carácter hereditario de novo) presentaron pérdida de heterocigosidad (LOH) en el tumor, lo que permitió determinar cuál era la herencia parental del

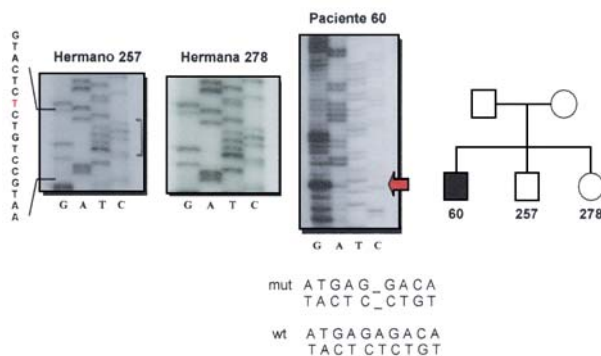


Fig. 1: Secuencias normales (izq. y centro) obtenidas para ambos hermanos del afectado de Rb. La delección puntual en el exón 20, g.156820delA, identificada en el afectado (flecha roja), genera corrimiento del marco de lectura (der.).

alelo afectado en la familia (figs. 2 y 3). Para el polimorfismo *RBI.20*, el paciente 148 conserva el alelo 4 en el tumor y el paciente 291 el alelo 2. Como se pierde el alelo normal, se deduce que el alelo que permanece en el tumor (materno) es el ligado a la mutación. La identificación del cromosoma mutado en el afectado, suponiendo que el Rb era hereditario, permitiría predecir la susceptibilidad al Rb, únicamente por exclusión, en hermanos o descendientes del mismo, formando parte del asesoramiento genético. La hermana del paciente 291 heredó los alelos paterno (NC/158/NC/4) y materno (C/162/C/3) diferentes a los del paciente. De esta forma, se la pudo excluir del riesgo, ya que no heredó el alelo materno ligado a la mutación.

El individuo 194 (sin antecedentes, tumor bilateral) evidenció una delección en la región 3' del gen *RBI* en el ADN constitucional, al realizar la segre-

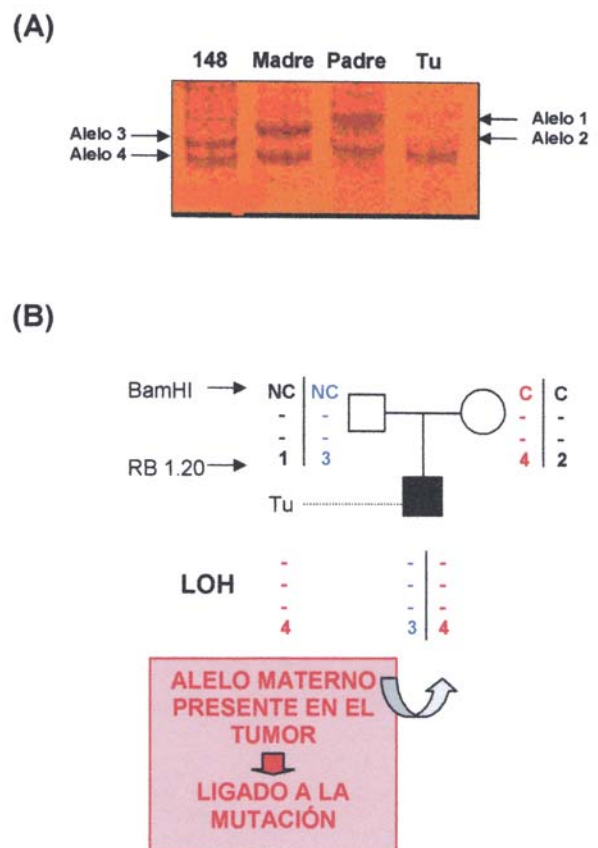


Fig. 2: Segregación de polimorfismos para el paciente 148 y su familia. A. Gel de poliacrilamida para *RBI.20*. Se observa en la muestra tumoral del paciente (Tu) la falta del alelo 3 paterno. B. Genealogía con los haplotipos conformados.

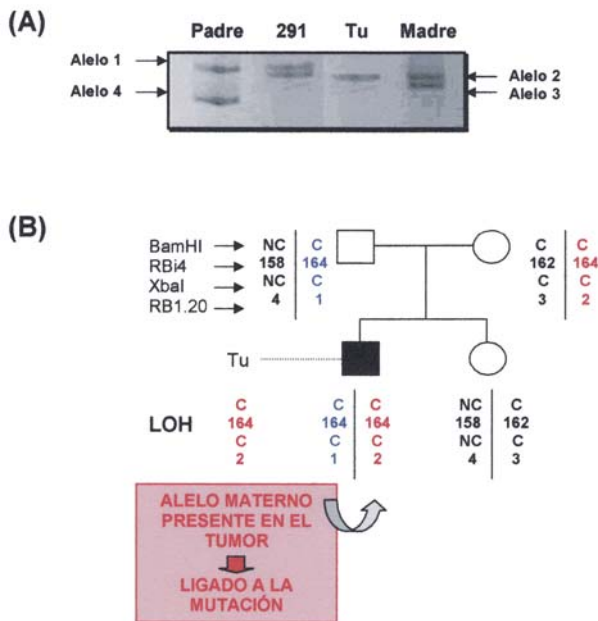


Fig. 3: Segregación de polimorfismos para el paciente 291 y su familia. A. Gel de poliacrilamida para RB1.20. En el tumor (Tu), falta el alelo 1 paterno. B. Genealogía con los haplotipos conformados. La hermana hereda alelos diferentes a los del paciente.

gación de alelos para los 4 polimorfismos intragénicos. La segregación de alelos, para los polimorfismos ubicados en la región 5' y central del gen, resultó en la presencia de ambos alelos, paterno y materno. Por el contrario, el análisis del polimorfismo RB1.20 permitió evidenciar la deleción constitucional mediante la falta de la variante alélica materna para dicho locus (fig. 4). El extremo 5' de la deleción debería encontrarse en el intrón 17, corriente abajo del sitio polimórfico para la enzima de restricción XbaI. En este caso, el estudio de polimorfismos intragénicos se vuelve un estudio directo, es decir que puso en evidencia la mutación inactivante del gen RB1. Mediante este mismo estudio, fue posible excluir a la hermana del paciente 194 como portadora de la mutación predisponente para la patología, ya que heredó el otro alelo materno y no se detectó ausencia del alelo RB1.20.

### DISCUSIÓN

Los resultados demuestran la necesidad de contar con ADN del tumor, cuando el paciente fue enuclea-

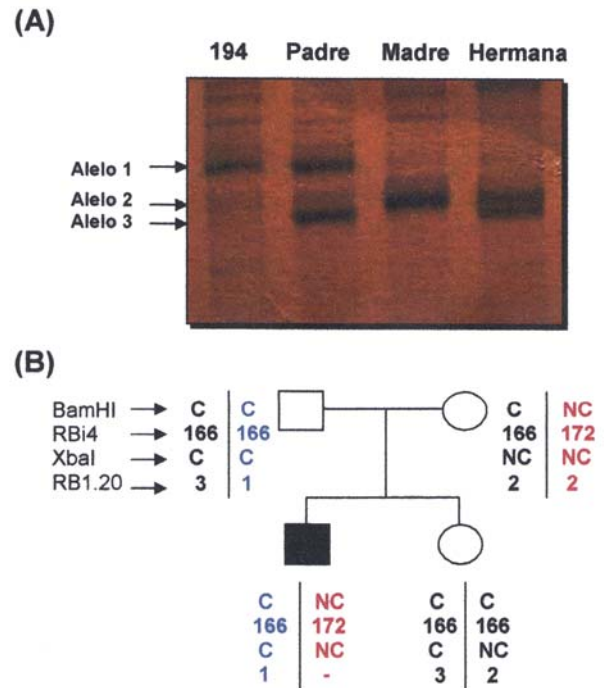


Fig. 4: Segregación de polimorfismos para el paciente 194 y su familia. A. Gel de poliacrilamida para RB1.20. En el paciente falta del alelo 2 materno. La hermana hereda el alelo 3 paterno y 2 materno. B. Genealogía con los haplotipos conformados.

do, y acentúan la importancia de la detección directa de la mutación en familias con Rb esporádico temprano sin muestra tumoral. Sin embargo, como consecuencia de una mejoría sustancial en los métodos de detección y tratamiento, el número de enucleaciones está disminuyendo progresivamente, haciendo cada vez más difícil la obtención de tejido tumoral para este tipo de estudios.

La ausencia de una anomalía, detectable en el ADN de un tejido constitucional (como los leucocitos de sangre periférica) sugiere que se trata de una forma no hereditaria de la enfermedad. De cualquier forma, podrían existir alteraciones estructurales pequeñas 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, la mayoría de los Rb unilaterales (60-75%) no son hereditarios y el 25-40% sí los son.

Una vez que se ha identificado el alelo RB1 mutado, es posible determinar el riesgo para los familiares del paciente. Así, los resultados obteni-



dos permiten establecer varios aspectos del asesoramiento genético para cada familia (19-21). Si se trata de una mutación de origen germinal, es un caso hereditario; la futura progenie tiene un 50% de probabilidad de heredar una copia del gen *RB1* mutado y, con estos estudios, se puede establecer el test presintomático para esta futura progenie. A aquellos niños en los que no se ha detectado un alelo mutado, no es necesario practicar los frecuentes e incómodos exámenes oftalmológicos, ya que tienen un muy bajo riesgo de desarrollar Rb, mientras que puede incrementarse la vigilancia en aquellos que son portadores, aumentando las probabilidades de detección precoz y en consecuencia de conservar la visión. Es importante conocer el estado de portador o no de los padres ya que, de esta forma, se puede evaluar el riesgo de transmitir la predisposición al tumor a otros hijos. Si los padres no son portadores del alelo mutado, sus futuros hijos no tendrán riesgo de desarrollar Rb u otros tumores relacionados; en cambio, si alguno de los padres es portador, sus futuros hijos tendrán un 50% de probabilidad de heredar la misma mutación, con el riesgo de desarrollar la enfermedad. Por otro lado, si no se detecta la mutación en el ADN constitucional del paciente con Rb unilateral, se trata probablemente de un caso esporádico no hereditario y el riesgo es bajo para la futura descendencia (22).

En este grupo de familias, los estudios de biología molecular contribuyeron con el adecuado asesoramiento genético y el diseño apropiado de su tratamiento temprano.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Corson TW, Gallie BL. One hit, two hits, three hits, more? Genomic changes in the development of retinoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; 46: 617-634.
2. Burkhart DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 671-682.
3. Horsthemke B. Genetics and cytogenetics of retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 63: 1-7.
4. Leiderman YI, Kiss S, Mukai S. Molecular genetics of *RB1*-the retinoblastoma gene. *Semin Ophthalmol* 2007; 22: 247-254.
5. Knudson AG. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 1985; 45: 1437-1443.
6. Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, et al. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 1983; 305: 779-784.
7. Dryja TP, Cavenee W, White R, Rapaport JM, Petersen R, Albert DM, et al. Homozygosity of chromosome 13 in retinoblastoma. *N Engl J Med* 1984; 310: 550-553.
8. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-823.
9. Lohmann DR. *RB1* gene mutations in retinoblastoma. *Hum Mut* 1999; 14: 283-288.
10. Szijan I, Lohmann DR, Parma DL, Brandt B, Horsthemke B. Identification of *RB1* germline mutations in Argentinian families with sporadic bilateral retinoblastoma. *J Med Genet* 1995; 32: 475-479.
11. Arbetman A, Abdala M, Fandiño A, Herrera J, Baranzini S, Borelina D, et al. Clinical, cytogenetic, and molecular testing of Argentine patients with retinoblastoma. *Journal of AAPOS* 1998; 2: 102-107.
12. Dalamon V, Surace E, Borelina D, Ziembar M, Esperante S, Francipane L, et al. Detection of mutations in Argentine patients by segregation of polymorphisms, exon analysis and cytogenetic test. *Ophthalmic Res* 2001; 33: 336-339.
13. Dalamon V, Surace E, Giliberto F, Ferreiro V, Fernández C, Szijan I. Detection of germline mutations in Argentine retinoblastoma patients: low and full penetrance retinoblastoma caused by the same germline truncating mutation. *J Biochem Mol Biol* 2004; 37: 246-253.
14. Fernández C, Repetto K, Dalamon V, Bergonzi F, Ferreiro V, Szijan I. *RB1* germ-line deletions in Argentine retinoblastoma patients. *Mol Diag Ther* 2007; 11: 55-61.
15. Bookstein R, Lee WH. Molecular genetics of the retinoblastoma suppressor gene. *Crit Rev Oncogen*. 1990; 2: 211-227.
16. Toguchida J, McGee TL, Paterson JC, Eagle JR, Tucker S, Yandell DW, et al. Complete genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. *Genomics* 1993; 17: 535-543.
17. McGee TL, Cowley GS, Yandell DW, Dryja TP. Detection of the *XbaI* RFLP within the retinoblastoma locus by PCR. *Nucleic Acids Res*. 1990; 18: 207.
18. Brandt B, Greger V, Yandell D, Passarge E, Horsthemke B. A simple and nonradioactive method for detecting the *Rb1.20* DNA polymorphism in the retinoblastoma gene. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 1450-1451.
19. Yandell DW, Campbell TA, Dayton SH, Petersen R, Walton D, Little JB, et al. Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene: their application to genetic counselling. *N Engl J Med* 1989; 321: 1689-1695.
20. Richter S, Vanderzande K, Chen N, Zhang K, Sutherland J, Anderson J, et al. Sensitive and efficient detection of *RB1* gene mutations enhances care for families with retinoblastoma. *Am J Hum Genet*. 2003; 72: 253-269.
21. Kontic M, Palacios I, Gámez A, Camino I, Latkovic Z, Rasic D, et al. New *RB1* oncogenic mutations and intronic polymorphisms in Serbian retinoblastoma patients: genetic counseling implications. *J Hum Genet* 2006; 51: 909-913.
22. Draper GJ, Sanders BM, Brownbill PA, Hawkins MM. Patterns of risk of hereditary retinoblastoma and applications to genetic counselling. *Br J Cancer* 1992; 66: 211-219.