



RIDAA

Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Laurent, Viviana Eunice

Detección prospectiva y sistemática de la enfermedad mínimamente diseminada en pacientes con retinoblastoma de alto riesgo mediante marcadores moleculares y la determinación de su valor pronóstico



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.

Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Laurent, V. E. (2022). *Detección prospectiva y sistemática de la enfermedad mínimamente diseminada en pacientes con retinoblastoma de alto riesgo mediante marcadores moleculares y la determinación de su valor pronóstico. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/3914>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Detección prospectiva y sistemática de la enfermedad mínimamente diseminada en pacientes con retinoblastoma de alto riesgo mediante marcadores moleculares y la determinación de su valor pronóstico

TESIS DOCTORAL

Viviana Eunice Laurent

velaurent@gmail.com

Resumen

El retinoblastoma es la neoplasia intraocular más común en la infancia. Si bien la sobrevida en la Argentina es mayor del 90%, la diseminación extraocular continúa siendo la causante fatal principal en el país y en los países en desarrollo. Una herramienta pronóstica que permitiría determinar la posibilidad de recaer en forma potencialmente más sensible y específica que la histología del globo ocular enucleado (el método usado en la actualidad), sería la evaluación de la enfermedad mínimamente diseminada (EMD) en los pacientes enucleados de alto riesgo. El objetivo final fue poder evaluar la posibilidad de identificar tempranamente a los pacientes en alto riesgo para poder administrarles una terapia más intensiva y dirigida al Sistema Nervioso Central (SNC) donde las recaídas son fatales. Para esto, la parte inicial del trabajo se basó en la búsqueda de biomarcadores para la EMD. Así, se estudió la detección del ARN mensajero (ARNm) de la GD2 sintasa como marcador de la EMD por retrotranscripción seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y Nested-PCR (o anidada), a partir de muestras citológicamente negativas de líquido cefalorraquídeo (LCR) de 26 pacientes con retinoblastoma de alto riesgo. En este trabajo la médula ósea (MO) no fue evaluada, ya que este tejido presenta expresión del gangliósido GD2 y por lo tanto de su sintasa, por lo que se decidió buscar otro biomarcador más específico. De este modo, en la siguiente parte de este trabajo, se diseñó una metodología más específica que permitiera evaluar un biomarcador más sensible y específico. El biomarcador molecular seleccionado es específico de linaje y se corresponde con el factor de transcripción de conos y bastones con caja homeótica (CRX: por su nombre en inglés

Cone-Rod Homeobox-containing gene) cuya expresión por las células de retinoblastoma primario y también por células diseminadas fue reportado por otros grupos por inmunohistoquímica y por el nuestro, por técnicas moleculares.

Una vez seleccionado este biomarcador como el más sensible y específico, se realizó un estudio en pacientes con retinoblastoma metastático, estudiando la MO de los pacientes (n=17) con enfermedad metastásica al diagnóstico (n=9) o a la recaída (n=8) probada mediante biopsia, basada en RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR). El objetivo fue evaluar su utilización como herramienta para la optimización del pronóstico y evaluación de la respuesta al tratamiento mediante la detección de la EMD. En una etapa ulterior, se analizó el uso de CRX para detectar la EMD en muestras de MO y LCR de 96 pacientes prospectivamente estudiados (14 LCR se estudiaron con la GD2 sintasa) con retinoblastoma intraocular (no-metastásico) y factores de riesgo en la histopatología. El objetivo fue evaluar si la EMD era detectable en la enfermedad intraocular, detectar características clínicas o patológicas que predigan la EMD, y evaluar su impacto pronóstico en la sobrevida libre de enfermedad (SLE).

Con los resultados obtenidos en la primera parte del trabajo se demostró que la presencia del ARNm de la GD2 sintasa y, por lo tanto de la EMD, está vinculada directamente al riesgo de recaída extraocular. Se sentaron las bases sobre el concepto de que la EMD está presente en el LCR de pacientes con retinoblastoma sin compromiso del SNC al diagnóstico y, especialmente, en aquellos quienes presentan compromiso masivo del nervio óptico y glaucoma; algunos de los cuales pueden salvarse con terapia intensiva, lo que justificaría un protocolo de toma de muestras más intensivo.

En la segunda parte, se comprobó que el ARNm del gen CRX es un marcador novedoso en el retinoblastoma diseminado, que sirvió como herramienta no sólo para mejorar la identificación de células tumorales en sitios extraoculares sino que permitió dilucidar mecanismos de diseminación de este tumor ya que, la recaída en el LCR no estaría relacionada con la diseminación sistémica del retinoblastoma en vista de la rápida, completa y sostenida respuesta en MO metastásica luego de la quimioterapia de inducción. En todos los pacientes con metástasis secundaria, la recaída en el LCR ocurrió independientemente de los hallazgos en la MO, sugiriendo que el LCR sería como un sitio santuario.

En la última sección, se logró identificar una población de pacientes con “muy alto riesgo” y factores de riesgo en la histopatología quienes presentaban la EMD y en quienes la SLE es significativamente menor a pesar de la terapia adyuvante intensiva. En este subgrupo, se encontró que cerca de un 10% de los pacientes que se presentan con enfermedad clínicamente localizada, tienen diseminación molecular, en especial aquellos que tienen invasión del nervio óptico incompletamente resecado y en los que se presentaron con glaucoma. Por último, se halló que los pacientes con retinoblastoma grupo E y glaucoma

tienen un riesgo mayor de tener la EMD al diagnóstico y no deberían ser considerados para candidatos a la terapia conservativa.

Abstract

Retinoblastoma is the most common intraocular malignancy in childhood. While survival in Argentina is above 90%, extraocular dissemination still remains as the fatal leading cause both in this country and in developing ones. A prognostic tool that would determine in a potentially more sensitive and specific manner than the enucleated-eyeball histology (the method used at present) that a relapse may occur, would be the evaluation of the minimal disseminated disease (MDD) in enucleated patients at high risk. The final objective consisted of being able to evaluate the possibility of the early identification of those patients at high risk who might receive a more intensive and Central Nervous System (CNS)-directed chemotherapy, where relapses are typically more fatal. In this regard, the initial part of this work was addressed to the searching of biomarkers for the MDD. The detection of GD2 synthase mRNA as a marker of MDD by reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR) and Nested-PCR on cytologically negative samples of cerebrospinal fluid (CSF) of 26 patients with high-risk retinoblastoma, was studied. In this work the bone marrow (BM) was not evaluated, since ganglioside GD2 is expressed in this tissue as well as its synthase, reason that resulted in the search of a more specific marker. In the next part of this work, a more specific methodology intended to evaluate a more sensible and specific biomarker was designed. The selected molecular biomarker is a lineage-specific marker which corresponds with the transcription factor of the Cone-Rod homeobox-containing gene whose expression both in cells of primary retinoblastoma and also in disseminated cells was reported by other groups by immunohistochemistry, and ours by molecular techniques.

Once this biomarker was selected as the most sensible and specific one, the next step was to study the detection of the CRX mRNA in the BM from those patients with metastatic retinoblastoma (n=17) who had metastatic disease at diagnosis (n=9) or at relapse (n=8), proven by biopsy, by means of a RT real time PCR (RT-qPCR) with the objective to use it as a tool for optimizing diagnosis and assessing treatment response by detecting the MDD. Subsequently, at a later stage of the study, it was analysed the use of CRX for MDD detection in MO and CSF samples of 96 patients (14 CSF were studied with GD2 synthase) with intraocular retinoblastoma (non-metastatic) and pathology risk factors. The aim was to assess whether the MDD was detectable in intraocular disease, to detect clinical or pathological characteristics that predict the MDD, and to evaluate their prognostic impact on disease-free survival (DFS).

With the results obtained in the first part of the work it was demonstrated that the presence of GD2 synthase mRNA, and therefore of the MDD, is directly related to the risk of extraocular

relapse. The foundations upon the concept of the MDD being present in the CSF of patients with retinoblastoma without CNS involvement at diagnosis were laid, especially in those who have massive involvement of the optic nerve and glaucoma; some of which can be saved with intensive therapy, supporting the need of more intensive protocols of sample collection. In the second part of this work, it was found that the mRNA of the CRX gene is a novel marker for disseminated retinoblastoma, which served as a tool not only to improve the identification of tumor cells at extraocular sites but also to elucidate the dissemination mechanisms of this tumor since CSF relapse would not be related with systemic dissemination of retinoblastoma in the light of the rapid, complete and sustained response of metastatic MO after induction chemotherapy. In all patients with secondary metastasis, relapse in CSF occurred regardless of what had happened in the MO, suggesting that the CSF would be a sanctuary site. In the last section, a sub-population of patients with "very high risk" and pathology risk factors who presented MDD and in whom the DFS is significantly lower despite intensive adjuvant therapy was identified. It was found that 10% of this sub-group of patients, who presents with clinically localized disease, actually already has molecular dissemination, especially those who had invasion of the optic nerve that was incompletely resected, and in those who presented with glaucoma. Finally, it was found that patients with retinoblastoma group E and glaucoma are at higher risk of having the MDD at diagnosis and should not be considered as candidates for conservative therapy.

*Doctorado en Ciencia y Tecnología
Universidad Nacional de Quilmes*

**Detección prospectiva y sistemática de la enfermedad
mínimamente diseminada en pacientes con retinoblastoma de alto
riesgo mediante marcadores moleculares y la determinación de su
valor pronóstico**

Lic. Viviana Eunice Laurent
Tesisista

Dr. Guillermo L. Chantada
Director

Dr. Daniel F. Alonso
Co-Director

*Quilmes, Argentina
Año 2017*



**Detección prospectiva y sistemática de la enfermedad
mínimamente diseminada en pacientes con retinoblastoma de alto
riesgo mediante marcadores moleculares y la determinación de su
valor pronóstico**

MSc. Lic. Viviana Eunice Laurent

Tesista

Dr. Guillermo Luis Chantada

Director

Dr. Daniel Fernando Alonso

Co-Director

Lugar de realización:

Hospital de Pediatría SAMIC Prof. Dr. Juan P. Garrahan

Servicio de Hemato-Oncología y Farmacocinética



Tesis presentada para la obtención del título de Doctor en Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes.

A mi hermosa Sofia...

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis directores Guillermo y Daniel por permitirme desarrollarme profesionalmente, especialmente a Guillermo por el último y necesario empujón; a todo el personal del Banco de Tumores del Servicio de Patología del Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan por almacenar y proveerme las muestras estudiadas en este trabajo, a Pety Dávila, jefa del Servicio por entonces y especialmente a Pochi Vazquez por facilitarme la tarea y ayudarme con ideas. Agradezco también a los chicos del Laboratorio de Oncología Molecular de la UNQ, por aguantar mis visitas repentinas y dejarme todo a disposición. Además, gracias al Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Hemato-Oncología del Hospital por prestarme los equipos, especialmente a Dani Ottaviani, por su predisposición a ayudarme siempre. También gracias a la Dra. Claudia Sampor, por la obtención de muestras de pacientes. A la Dra. Adriana Fandiño, por las enucleaciones; Jorge Rossi, por las inmunocitoquímicas para el GD2; a David Abramson, por el apoyo económico e intelectual en el proyecto; al Dr. Marco Ramirez del Hospital Infantil de México Federico Gomez por las muestras de los controles. Y también a todo el personal de enfermería y anestesia del Hospital Garrahan por la ayuda en la obtención de muestras. Gracias también a la Dra. Andrea Mangano, directora del Laboratorio de Retrovirus, y a los chicos que trabajan ahí por hacerme siempre un lugarcito para usar los equipos que necesitaba. También, gracias a la Dra. Esperanza Berensztein del Área de Endócrino del Hospital por propiciarme la cabina de flujo laminar para trabajar. Y a la Fundación Garrahan muchísimas gracias por las impresiones de esta tesis.

Un agradecimiento enorme a la Unidad de Farmacocinética Clínica del Hospital, especialmente Paula por abrirme las puertas, permitirme pertenecer y darme la oportunidad de aprender cosas nuevas. También, gracias a los chicos del labo: Emi, Pauli, Nati y Ushi, por ser tan buenos compañeros.

Agradezco al CONICET, a la Fundación Natali Dafne Flexer y al Instituto Nacional del Cáncer por haberme apoyado con becas para la investigación.

Unas gracias súper especiales a Tolbi, por su guía, confianza, paciencia y apoyo. Gracias de corazón! No hubiese podido sin tí. Gracias también a Bel, Joa, Gabi y Yadi, porque me han alentado, escuchado y sostenido para que concluyera este trabajo. También agradezco especialmente a Fer, por su complicidad, por compartir su saber y experiencia, por aconsejarme, por su ayuda incondicional.

Mami y papi: millones de gracias por todo, por su confianza en mí, por ser mi ejemplo. Gracias también a mis hermanos, JeSsi y Mau, porque me impulsan todos los días a superarme. Gracias a mi abuela Tita que, sin haberlo sabido, me inspira a seguir “tirando”, como ella decía, a pesar de todo.

Y, finalmente, a Fede y a Sofi, mis amores de la vida, gracias por allanarme el camino en el último tramo, por traerme hasta acá de la mano, cada día de nuestras vidas se los voy a agradecer, “promeZa”!

A todos muchas gracias,

Vivi

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS, FIGURAS Y ECUACIONES	Pág. i
ABREVIATURAS	Pág. iii
INTRODUCCIÓN	Pág. 1
Justificación del trabajo	Pág. 1
Objetivos	Pág. 5
Contenido del trabajo	Pág. 6
Revisión bibliográfica	Pág. 7
CONTEXTO TEÓRICO	Pág. 13
Medicina de precisión	Pág. 13
<i>Medicina de precisión en el cáncer</i>	Pág. 14
Generalidades del cáncer, la progresión tumoral y metastásica y su detección	Pág. 15
Cáncer	Pág. 15
Etapas de la carcinogénesis	Pág. 16
Bases genéticas y moleculares del cáncer	Pág. 17
Oncogenes y Genes supresores de tumor	Pág. 18
Diseminación metastásica	Pág. 19
Pasos de la diseminación metastásica	Pág. 19
Enfermedad mínima y su detección	Pág. 21
Biomarcadores tumorales	Pág. 23
El Retinoblastoma	Pág. 25
Generalidades	Pág. 25
Retina y célula de origen del retinoblastoma	Pág. 26
Genética del retinoblastoma	Pág. 27
Síntomatología y diagnóstico, estadificación y pronóstico	Pág. 32
PROBLEMÁTICA	Pág. 42
El estudio y su contexto	Pág. 42
Los pacientes	Pág. 44
Medicina de precisión en el retinoblastoma	Pág. 45
Metodologías para la detección de la diseminación mínima	Pág. 46
Generalidades de la reacción en cadena de la polimerasa	Pág. 50
Los marcadores moleculares propuestos	Pág. 52
MATERIALES Y MÉTODOS	Pág. 58
Introducción	Pág. 58
Materiales y Métodos generales	Pág. 59

<i>Líneas celulares</i> -----	Pág. 59
<i>Inmunocitología para el gangliósido GD2</i> -----	Pág. 59
<i>Declaración de ética</i> -----	Pág. 60
<i>Almacenamiento y procesamiento de muestras clínicas</i> -----	Pág. 60
<i>Extracción de ARN por la metodología del TRIzol</i> -----	Pág. 62
<i>Selección de potenciales marcadores tumorales para el retinoblastoma</i> -----	Pág. 62
<i>Cálculo de los niveles relativos de expresión</i> -----	Pág. 63
<i>Criterios de positividad y negatividad en los análisis de expresión</i> -----	Pág. 64
A) Detección de la enfermedad mínimamente diseminada en el LCR de pacientes con retinoblastoma de alto riesgo mediante el uso de la GD2 sintasa -----	Pág. 65
<i>Los pacientes</i> -----	Pág. 65
<i>Las muestras</i> -----	Pág. 65
<i>Extracción del ARN</i> -----	Pág. 66
<i>Diseño de primers</i> -----	Pág. 66
<i>RT-PCR y Nested-PCR</i> -----	Pág. 67
<i>Tratamiento recibido por los pacientes</i> -----	Pág. 67
<i>Análisis estadístico</i> -----	Pág. 68
B) Uso del factor de transcripción de conos y bastones (CRX) como marcador molecular en el retinoblastoma metastásico -----	Pág. 69
1-Validación del marcador y del método de detección -----	Pág. 69
<i>Prueba de expresión de la GD2 sintasa en médulas óseas control</i> -----	Pág. 69
<i>Expresión de CRX en líneas celulares y tumor</i> -----	Pág. 70
<i>Controles</i> -----	Pág. 70
<i>Extracción de ARN y síntesis del ADNc</i> -----	Pág. 70
<i>Diseño de primers</i> -----	Pág. 71
<i>qPCR</i> -----	Pág. 73
<i>Límite de detección (LOD) de la qPCR</i> -----	Pág. 74
2- Evaluación de CRX en pacientes -----	Pág. 75
<i>Pacientes</i> -----	Pág. 75
<i>Obtención y preservación de las muestras clínicas</i> -----	Pág. 75
<i>Análisis de los datos de expresión de CRX</i> -----	Pág. 76
C) Uso de CRX como marcador de la enfermedad mínimamente diseminada en el retinoblastoma no metastásico -----	Pág. 78
Criterios de inclusión -----	Pág. 78
<i>Grupo de alto riesgo</i> -----	Pág. 78
<i>Grupo de riesgo medio</i> -----	Pág. 78
Obtención, preservación y procesamiento de las muestras clínicas -----	Pág. 79
Tratamiento recibido por los pacientes -----	Pág. 80
Análisis estadístico de los datos -----	Pág. 81

DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD MÍNIMAMENTE DISEMINADA EN EL LCR DE PACIENTES CON RETINOBLASTOMA DE ALTO RIESGO MEDIANTE EL USO DE LA GD2 SINTASA-----	Pág. 82
Resultados-----	Pág. 84
<i>Datos clínicos-----</i>	Pág. 85
<i>Evaluación de la EMD-----</i>	Pág. 85
<i>Factores clínicos asociados a la EMD-----</i>	Pág. 87
<i>Resultados clínicos según la presencia de la EMD-----</i>	Pág. 87
Discusión-----	Pág. 88
USO DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN DE CONOS Y BASTONES (CRX) COMO MARCADOR MOLECULAR EN EL RETINOBLASTOMA METASTÁSICO-----	Pág. 92
Resultados-----	Pág. 93
<i>Prueba de la expresión de la GD2 sintasa en MO control-----</i>	Pág. 94
<i>Expresión del ARNm del CRX en tumores y líneas celulares de retinoblastoma-----</i>	Pág. 94
<i>Expresión del ARNm del CRX en MO normal-----</i>	Pág. 94
<i>Límite de detección (LOD) del ARNm del CRX-----</i>	Pág. 96
<i>Descripción de los pacientes-----</i>	Pág. 96
<i>CRX como marcador tumoral en pacientes con evidencia histopatológica de invasión en MO-----</i>	Pág. 102
<i>EMD en la MO de pacientes con recaída en el LCR-----</i>	Pág. 102
<i>Enfermedad mínima en de pacientes sin evidencia clínica de compromiso en el LCR---</i>	Pág. 103
Discusión-----	Pág. 103
USO DE CRX COMO MARCADOR DE LA ENFERMEDAD MÍNIMAMENTE DISEMINADA EN EL RETINOBLASTOMA NO METASTÁSICO-----	Pág. 107
Resultados-----	Pág. 109
<i>Datos clínicos-----</i>	Pág. 109
<i>Pacientes con EMD-----</i>	Pág. 111
<i>Análisis de sobrevida-----</i>	Pág. 113
Discusión-----	Pág. 114
CONCLUSIONES GENERALES-----	Pág. 119
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	Pág. 121
ANEXO – Publicaciones derivadas de esta tesis-----	Pág. 134

LISTA DE TABLAS, FIGURAS Y ECUACIONES

Tabla N°1. Clasificación de Reese--Ellsworth-----	Pág. 36
Tabla N°2. Clasificación internacional para el retinoblastoma intraocular-----	Pág. 37
Tabla N°3. IRSS. International Retinoblastoma Staging System-----	Pág. 39
Tabla N°4. Clasificación clínico-patológica de Grabowski-Abramson-----	Pág. 40
Tabla N°4.1. Sistema de clasificación del Retinoblastoma extraocular de Grabowski-Abramson-----	Pág. 40
Tabla N°5. Secuencia de primers para la amplificación del ARNm de la GD2 sintasa y GAPDH-----	Pág. 66
Tabla N°6. Primers para la qPCR de GD2 sintasa (Cheung) -----	Pág. 70
Tabla N°7. Diseño de primers para qPCR de CRX-----	Pág. 72
Tabla N°8. Guías de tratamiento según los factores de riesgo histopatológico-----	Pág. 80
Tabla N°9. Descripción de pacientes con una RT-PCR y/o Nested-PCR positiva para el ARNm de la GD2 sintasa-----	Pág. 85
Tabla N°10. Descripción de pacientes con EMD negativa-----	Pág. 86
Tabla N°11. Análisis comparativo entre pacientes con EMD detectada por RT-PCR del ARNm de la GD2 sintasa seguida de Nested-PCR, y pacientes con un resultado negativo----	Pág. 87
Tabla N°12. Descripción de los pacientes incluidos con enfermedad metastásica al diagnóstico-----	Pág. 98
Tabla N°13. Descripción de los pacientes incluidos tras la recaída metastásica-----	Pág. 100
Tabla N°14. Guías de tratamiento según los factores de riesgo en la patología-----	Pág. 110
Tabla N°15. Descripción clínica y resultado clínico de pacientes con la EMD-----	Pág. 112
Tabla N°16. Enfermedad mínimamente diseminada según factores de riesgo histopatológico-----	Pág. 113
 Figura N°1. Esquema representativo del crecimiento celular normal vs. Crecimiento celular descontrolado (tumor) -----	 Pág. 15
Figura N°2. Proceso Metastásico-----	Pág. 20
Figura N°3. Retinoblastoma-----	Pág. 25
Figura N°4. Diagrama esquemático de un corte del globo ocular con ubicación de sus capas más importantes: la coroides, la esclera y la retina-----	Pág. 27
Figura N°5. Patogenia del retinoblastoma-----	Pág. 29
Figura N°6. La división celular en células de mamífero se desencadena tras un punto de control crítico entre la fase G1 y la síntesis de ADN (fase S) -----	Pág. 31
Figura N°7. Principales síntomas clínicos del Retinoblastoma-----	Pág. 32
Figura N°8. Aspecto del tumor RB en una fundoscopia-----	Pág. 34

Figura N°9. Gestionamiento del tratamiento del retinoblastoma unilateral-----	Pág. 45
Figura N°10. Esquema representativo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ---	Pág. 51
Figura N°11. Esquema resumido de la ruta metabólica de los esfingolípidos-----	Pág. 53
Figura N°12. Expresión del ARNm del gen CRX en tejido humano normal-----	Pág. 56
Figura N°13. Expresión de la proteína del gen CRX en tejido normal y líneas celulares de las bases de datos de ProteomicsDB, PaxDB, y MOPED-----	Pág. 57
Figura N°14. Detección molecular del ARNm de la GD2 sintasa por RT-PCR y Nested-PCR a partir de muestras de LCR de un paciente representativo en estadio IVa-----	Pág. 86
Figura N°15. Probabilidad de recaída en el LCR según la presencia de la EMD determinada por la expresión de la GD2 sintasa vía RT-PCR y Nested-PCR-----	Pág. 88
Figura N°16. Niveles relativos de expresión del ARNm del CRX en tumores de retinoblastoma y en muestras de MO de pacientes metastásicos (al diagnóstico, con recaída metastásica, y sin RB) -----	Pág. 95
Figura N°17. Límite de detección de CRX determinado mediante la dilución de células WERI-Rb1 en células mononucleares normales-----	Pág. 95
Figura N°18. Diagrama de flujo de los pacientes incluidos en el estudio según tratamiento y presencia de la EMD-----	Pág. 111
Figura N°19. Probabilidad de supervivencia libre de enfermedad según la presencia de la EMD	Pág. 114
 Ecuación N°1 – Ecuación N°5. Método Delta-Delta Ct-----	 Pág. 63
Ecuación N°6. Cálculo de eficiencia (Ef) de la reacción de PCR-----	Pág. 72

ABREVIATURAS

AcNa	Acetato de sodio
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico copia
AFP	Alfa-1-fetoproteína
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero, transcripto, mensajero
ASCR	Rescate autólogo de células madre
AS-PCR	PCR alelo-específica
B4GALNT1	Beta-1,4-N-Acetilgalactosaminil Transferasa
CD34	Cúmulo de diferenciación 34 de células madre precursoras de la hematopoyesis
CD45	Cúmulo de diferenciación 45 de leucocitos
CD56	<i>Neural cell adhesion molecule</i>
CEA	Antígeno Carcinoembriónico
CMN	Células mononucleares
CRX	<i>Cone-Rod Homeobox-containing gene</i>
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
DEPC	Dietil pirocarbonato
DM	Diseminación Mínima
EBRT	Radioterapia de haz externo
EE.UU.	Estados Unidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EMD	Enfermedad Mínimamente Diseminada
EMR	Enfermedad Mínima Residual
E-R	Sistema de Estadificación Reese y Ellsworth
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FVIII RA_g	<i>Factor VIII-related antigen</i>
GA2	<i>Asialo-GM2</i>
GalNAC	N-Acetilgalactosamina
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GD2	Gangliósido GD2
GD3/GM3	Precusores de GD2
H&E	<i>Hematoxylin and eosin stain</i>
HEPES	Ácido hidroxietil piperazinetan sulfónico
HIPED	<i>Human Integrated Protein Expression Database</i>
HVA	Ácido Homovalínico
IC	Inmunocitología
ICIR	Clasificación Internacional para el Retinoblastoma Intraocular
IRBP	Proteína de unión al interfosforreceptor retinoide

IRSS	<i>International Retinoblastoma Staging System</i>
IRSWG	<i>International Retinoblastoma Staging Working Group</i>
LacCer	<i>Lactosilceramida</i>
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LOH	Pérdida de Heterocigosis (<i>Lost of Heterocigosity</i>)
MDD	<i>Minimal Disseminated Disease</i>
miARN	<i>Micro ARN</i>
MMLV	<i>Molones murine leukemia virus</i>
MO	Médula Ósea
MRD	<i>Minimal Residual Disease</i>
NE	No evaluable
NO	Nervio óptico
NR	No realizado
NRE	Niveles Relativos de Expresión
MRI	Resonancia Magnética
OPN1MW	Opsin 1 medium wave sensitive
OPN1SW	Opsin 1 short wave sensitive
OTX	Gene encoding homeodomain-containing transcription factors
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la Polimerasa)
PCR-nested	PCR anidada
PGP9.5	Proteína 9.5
PLONI	<i>Post-Laminar Optic Nerve Involvement</i>
PMMA	Polimetilmetacrilato
pRB1	Proteína del gen RB1
pSLE	Probabilidad libre de enfermedad a 3 años
qPCR	PCR cuantitativa en Tiempo Real
RACM	Rescate Autólogo con Células Madre
RB	Retinoblastoma
RB1	Gen supresor de tumor asociado a Retinoblastoma
RC	Remisión Clínica
REMARK	Reporting recommendations for tumor Marker prognostic studies
Rod β-PDE	Subunidad Beta de la GMPc fosfodiesterasa de los bastones
RT	Transcripción Reversa/Retro-transcripción
RT-qPCR	RT-PCR cuantitativa en tiempo real
ROHA	Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino
RPMI 1640	Medio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la Polimerasa

RXR	Receptor X retinoide
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
SELDI	<i>Surface-enhanced laser desorption/ionization</i>
s.f	Sin fecha
SLE	Sobrevida Libre de Enfermedad
SNC	Sistema Nervioso Central
SP	Sangre periférica
SYK	<i>Spleen associated tyrosine kinase</i>
TAC	Tomografía computada
TBE	Tris-Borato-EDTA
TCG	Buffer Tiocianato de Guanidinio
TNM	<i>Tumor, Node, Metastasis</i>
3F8	Anticuerpo anti-GD2
TRB2	Tribble pseudokinase 2 gene
TRVA	Área Vascular Relativa del Tumor
VMA	Ácido Vanililmandélico
WERI-Rb1	Línea celular de retinoblastoma humano
Y79	Línea celular de retinoblastoma humano

INTRODUCCIÓN

Justificación del trabajo

Aunque el cáncer en niños tiene una incidencia muy baja, según el Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino (ROHA), cada año se les diagnostica cáncer en la Argentina a alrededor de 1.270 chicos con una tasa de incidencia de 124 por millón. (Moreno, 2015). En los menores de 15 años, según lo publicado en Alemania, España, Italia y Estados Unidos, en aproximadamente 130-150 casos por millón. Afortunadamente, gracias a la investigación y a la implementación de tratamientos multidisciplinarios efectivos, esta enfermedad es curable, manteniéndose una sobrevida de a 5 años en aproximadamente el 70% - 80% de los casos de cáncer infantil. Esta posibilidad de sobrevida ha ido aumentando hasta este porcentaje principalmente en los países desarrollados, debido al diagnóstico temprano, el acceso a un tratamiento adecuado, el cumplimiento de dicho tratamiento en el tiempo correcto, un buen estado nutricional y el cuidado integral del paciente, incluyendo esto último el apoyo de una red de soporte socio-emocional los cuales son parte de los factores que colaboran con el éxito del tratamiento (Moreno, 2015), además de un abordaje multidisciplinario al cuidado del paciente. Aún así, el cáncer infantil es la enfermedad que causa más muerte en la infancia, adolescencia y en adultos jóvenes (Raynolds, 2014).

Sin embargo, en Argentina la sobrevida promedia el 65%. Este resultado se debe a una variedad de causas; por un lado, en nuestro país se sigue dando que los niños aún lleguen al diagnóstico con tumores avanzados, cuando las posibilidades de curarlos son más difíciles. Además, según cada tumor, estos niños necesitan distintos niveles de complejidad diagnóstica y terapéutica la cual no se encuentra accesible de igual manera en todas las regiones del país (Moreno, 2015).

Las mismas desigualdades que se observan entre los países desarrollados y en desarrollo con respecto al acceso al tratamiento, se repiten entre los países pertenecientes a una misma región y, dentro de cada país, en las distintas ciudades. Y la Argentina no escapa a esta problemática. En estudios de mortalidad infantil, Buenos

Aires muestra los mismos índices que los países desarrollados. Los resultados de estudios realizados en los principales hospitales de Buenos Aires y de las grandes ciudades, arrojan resultados comparables a los de hospitales reconocidos de Europa. Sin embargo, no ocurre lo mismo en el resto de nuestro país. La cantidad y complejidad de los centros existentes en muchos centros del interior argentino, para la atención de niños con cáncer, resulta insuficiente. Como consecuencia de esta situación, el diagnóstico y el acceso al tratamiento en tiempo y forma se ven seriamente dificultados. (Situación del cáncer infantil en la Argentina, (s.f); Canturk et al, 2010).

Este escenario se observa igualmente en el retinoblastoma. El retinoblastoma es la neoplasia intraocular más común en la infancia. Es el cáncer de la retina, la estructura ocular que contiene a las células sensibles a la luz y que permiten la visión. Cuando el diagnóstico de esta patología se da en los estadios tempranos de la enfermedad, escenario usual en los países desarrollados, la probabilidad de sobrevida libre de enfermedad es elevada, y se ha mantenido mayor al 80-90% durante décadas, alcanzando al 95% actualmente (Broaddus et al, 2009). Esta situación no se debe a tratamientos sofisticados, ya que una simple enucleación del ojo afectado generalmente lleva a la curación de la enfermedad en los casos de retinoblastoma intraocular; más bien, los tratamientos conservativos más sofisticados son aplicados en los países desarrollados con el objetivo de preservar el ojo y por lo tanto la visión sin afectar la sobrevida (Shields J.A. et al, 2005; Lumbroso-Le Rouic et al, 2008). Sin embargo, esta tendencia no beneficia a la mayoría de los niños afectados en todo el mundo. En los países en desarrollo, el diagnóstico del retinoblastoma se da en estadios tardíos de la enfermedad cuando la diseminación extraocular ya ha ocurrido; por lo tanto, la sobrevida de los pacientes y la posibilidad de conservación ocular son menores en estos países en comparación a los países desarrollados (Canturk et al, 2010). Si bien, la esta enfermedad tiene una sobrevida es alta, hasta un 18% de los pacientes se presenta con factores de riesgo en el estudio histopatológico del globo ocular enucleado, y poseen un riesgo de recidiva significativamente mayor. (Eagle et al, 2009). Cuando el retinoblastoma se extiende por fuera del ojo, se dificulta la posibilidad de curación, aún contando con tratamientos sofisticados e intensivos (Dunkel et al, 2000; Zhao et al, 2011).

Aún así, el retinoblastoma es un tumor con una incidencia relativamente baja, que se da aproximadamente en unos 45 casos al año en la República Argentina (Moreno et al, 2014), con una ocurrencia constante de 15000–20000 nacidos vivos a nivel global, lo cual corresponde a cerca de 9000 nuevos casos cada año (Kivela, 2009). De los casos argentinos, un tercio se presenta con factores de alto riesgo en la histopatología del globo ocular enucleado. De estos, hasta el 40% recaerían si no son tratados oportunamente con quimio y/o radioterapia adyuvante. Si bien la supervivencia al año del diagnóstico alcanza el 90% (Moreno, 2015), la diseminación extraocular continúa ocurriendo y sigue siendo la causante principal del fallecimiento de los pacientes en los países en desarrollo como el nuestro (Chantada et al, 2011; Moreno et al, 2014).

Entre las características que se consideran de alto riesgo por la histopatología, encontramos, la invasión del nervio óptico más allá de la lámina cribosa (PLONI por su denominación en inglés), con o sin tumor en el margen de resección quirúrgica, la invasión masiva de coroides y la invasión escleral (Aerts et al, 2013; Chantada et al, 2010; Chantada et al, 2009 A). Otras características tales como la invasión de la cámara anterior, la invasión focalizada de la coroides y la invasión del nervio óptico (previo a la lámina cribosa), generalmente dadas de manera combinada, también son factores considerados de alto riesgo que indican la necesidad de terapia adyuvante según algunos grupos, aunque no existe un consenso general sobre estos factores (Chantada et al, 2008).

De los pacientes considerados de alto riesgo, por poseer alguno de estos factores histopatológicos de riesgo, existe un 60% que no recaería aunque no recibiera tratamiento. Por otro lado, un 5% de los pacientes que son considerados de bajo riesgo por la histopatología, sufrirán recaídas extraoculares. Esto da cuenta de que la valoración del riesgo a través de los factores histopatológicos no es totalmente precisa a la hora de pronosticar potenciales recaídas extraoculares. Esto sucede debido a que, previo a la recaída extraocular, existiría un número reducido de células tumorales ya diseminadas (que constituyen la enfermedad mínimamente diseminada, EMD) que escapan a los límites de sensibilidad y, por lo tanto, de detección de los métodos convencionales tales como las imágenes o la histopatología. El estudio de la existencia de dicha diseminación mínima sería de enorme importancia clínica ya que brindaría información precisa y con un mayor poder pronóstico de la recaída extraocular en los

pacientes, en comparación a lo obtenido a través del estudio de los factores histopatológicos. La detección de la EMD con técnicas moleculares podría ayudar a predecir la progresión metastásica e incluso a definir el requerimiento de conductas terapéuticas más agresivas y personalizadas. Una herramienta que permitiría pronosticar la posibilidad o el riesgo a recaer en forma más sensible y específica que el estudio histopatológico sería la evaluación de la EMD mediante marcadores moleculares y las técnicas basadas en PCR.

Por este motivo, con el objetivo de poder contar con una herramienta que permita determinar el valor pronóstico de la EMD en los pacientes con retinoblastoma, el primer paso en mi tesis fue el de identificar un biomarcador útil para el estudio de la EMD. En una primer instancia del trabajo se utilizó como marcador de la EMD al gangliósido GD2 y la enzima encargada de su síntesis, la GD2 sintasa, ya que se había ya determinado en trabajos previos que este gangliósido está sobre-expresado en células tumorales (Lo Piccolo et al, 2001; Cheung I.Y. et al, 2001; Yuyama et al, 1995; Kuo et al, 1998), entre ellas las del retinoblastoma (Portoukalian et al, 1993; Chantada et al, 2006 A; Laurent et al, 2010). En esta parte del trabajo, se estudió la expresión génica de la GD2 sintasa como marcador de la EMD mediante retrotranscripción (RT) seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y PCR-*nested* o anidada, a partir de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes de alto riesgo.

En la segunda parte del trabajo, debido a que la GD2 sintetasa fue un biomarcador relativamente inespecífico en la médula osea (MO), se diseñó una metodología tal que nos permitiera evaluar la MO de los pacientes con retinoblastoma metastásico probado mediante biopsia. Para esto se utilizó la metodología de RT seguida de PCR en tiempo real (qPCR) y un marcador específico de linaje, propio de la estirpe de los fotorreceptores del tipo conos de la retina, que serían los responsables de originar las células del retinoblastoma, como indicador de EMD. El marcador seleccionado corresponde al factor de transcripción de conos y bastones con caja homeótica (CRX: por su nombre en inglés Cone-Rod Homeobox-containing gene) el cual otros grupos demostraron que es expresado por las células de tumores primarios de retinoblastoma, y también por sus células diseminadas. (Glubrecht et al, 2009; Santagata et al, 2009).

Luego de establecer una metodología con elevados niveles de sensibilidad y especificidad basada en la RT-qPCR en tiempo real para detectar el ARNm de CRX, y con el objetivo de evidenciar la utilidad de la detección de EMD como indicador pronóstico para los pacientes con retinoblastoma no-metastásico, se analizó el uso de CRX en pacientes con retinoblastoma intraocular (no-metastásico) de diversos grupos de riesgo, evaluando la utilidad pronóstica de esta metodología en combinación con las empleadas de forma rutinaria.

Objetivos

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la EMD mediante una estrategia de evaluación prospectiva de una cohorte de más de 100 pacientes ingresados al protocolo del Hospital Garrahan, sin precedentes bibliográficos en el retinoblastoma, el uso del ARNm de la enzima GD2 sintasa y de CRX como marcadores moleculares de la enfermedad mínimamente diseminada utilizando técnicas de detección molecular convencionales (RT-PCR) y en tiempo real (RT-qPCR).

Para cumplir este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Diseñar cebadores y estrategias de amplificación por RT-qPCR.
- Optimizar y validar in vitro el método de detección molecular por RT-qPCR sobre líneas celulares humanas de retinoblastoma.
- Validar clínicamente el marcador y la técnica de detección RT-qPCR sobre muestras seriadas de pacientes con retinoblastoma y sobre muestras de pacientes con patologías no emparentadas como control.
- Evaluar, mediante el estudio secuencial de muestras en LCR y MO, el patrón de diseminación del retinoblastoma de alto riesgo.
- Evaluar la utilidad del uso de la sangre periférica (SP) para el estudio de EMD.
- Contrastar los resultados de la RT-qPCR con los estudios inmunohistoquímicos de los cortes histológicos de los globos oculares de los pacientes enucleados de alto riesgo y con los estudios de la expresión relativa del GD2 por citometría de flujo de los pacientes comprometidos.
- Análisis estadístico.

Contenido del trabajo

Esta tesis está organizada de la siguiente manera:

En primer lugar se describe el marco teórico en el cual se plantean los conceptos fundamentales relacionados con la temática central de esta tesis: medicina de precisión, generalidades del cáncer la tumorigénesis, diseminación metastásica, la enfermedad mínima y su detección, marcadores de tumor, el cáncer en la infancia, las generalidades del retinoblastoma, su genética y su clínica.

En segundo lugar, se describe la problemática que dio origen a este trabajo, dando información sobre la realidad de los pacientes en Argentina y de los marcadores tumorales propuestos.

En tercer lugar, se presenta la sección de Materiales y Métodos donde se describen los materiales y el paso a paso de las metodologías generales que fueron utilizadas en el presente trabajo, como así también los materiales y métodos particulares de cada uno de los abordajes tomados en la tesis.

En cuarto lugar, se detallan los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo, organizado en tres secciones: a) Detección de la enfermedad mínimamente diseminada en el LCR de pacientes con retinoblastoma de alto riesgo mediante el uso de la GD2 sintasa, b) Uso del factor de transcripción de conos y bastones (CRX) como marcador molecular en el retinoblastoma metastásico, y c) Uso del CRX como marcador de la enfermedad mínimamente diseminada en el retinoblastoma no metastásico. Cada una de estas secciones contiene su propia sección de discusión donde se discuten los resultados obtenidos.

En quinto lugar, se incluyen las conclusiones a las que permitió arribar este trabajo y las perspectivas futuras del mismo.

Revisión bibliográfica

Los estudios basados en las técnicas de detección molecular como la PCR y sus variantes han sido ampliamente utilizados en varios tipos de cáncer con objetivos diagnósticos y pronósticos (Mocellin et al, 2003; Bernard et al, 2002; Armakolas et al, 2010). Sin embargo, la complejidad que los mismos presentan se debe no sólo a que requieren la inclusión de estrategias de optimización sino también a que es preciso hallar, en primera instancia, los marcadores moleculares de tumor más apropiados para el estudio. Hasta donde nuestro conocimiento llega, existen muy pocos trabajos anteriores a éste, que se refieran al uso de marcadores moleculares para la evaluación de la enfermedad mínima por RT-PCR o qPCR en el retinoblastoma. En su lugar, han sido utilizada otras técnicas más tradicionales, tales como los estudios citométricos, microscopía óptica (Zubizarreta y Chantada, 1999), inmunohistoquímica/citología y citometría de flujo (Chantada et al, 2006 A); la detección de marcadores oncofetales mediante cuantificación enzimática a partir de orina o suero tales como el antígeno carcinoembrionario (del inglés, CEA) y el alfa-1-fetoproteína (del inglés, AFP) y, con base al origen neuroepitelial del tumor, los metabolitos de las catecolaminas: ácido homovanílico (del inglés, HVA) y el ácido vanililmandélico (del inglés, VMA) (Mul et al, 1999); y la utilización de espectrometría de masas (SELDI – *surface enhanced laser desorption/ionization*) para la determinación de diferencias en los niveles proteicos entre el suero de pacientes y sanos (Yang et al, 2007).

Debido a que es bien conocido que las células tumorales que poseen potencial metastásico cuentan con una acumulación de mutaciones tal que les permite inducir la angiogénesis y que la capacidad de crecimiento de un tumor es dependiente, al menos en cierta medida, de la capacidad de las células neoplásicas de inducir el crecimiento vascular, mientras más agresivo es el clon tumoral, mayor es su capacidad angiogénica (Smith-McCune y Weidner, 1994; O'Byrne et al, 2000; Folkman, 1990; Folkman y Shing, 1992). Por lo tanto, también se han hecho propuestas para estudiar la capacidad angiogénica del tumor como un factor predictivo de la diseminación tumoral en el retinoblastoma. En un estudio retrospectivo de 24 pacientes con retinoblastoma intraocular estadio V de Reese-Ellsworth (RE), enucleados, 5 de los cuales recayeron luego de aproximadamente un año luego del diagnóstico, se evaluó el riesgo a la recidiva a través de la evaluación de dos cortes histológicos: uno fue teñido con H&E

para la evaluación de la invasión de la coroides y nervio óptico, y el otro fue tratado para la inmunorreacción con un marcador específico de endotelio (anticuerpo anti-CD34). Los resultados principales fueron la medida de la invasión de la coroides y nervio óptico y la cuantificación del área vascular relativa del tumor (TRVA, en inglés) (Ferrari Marback et al, 2003). El TRVA demostró ser un factor pronóstico independiente de diseminación de la enfermedad. No obstante, si bien todos los pacientes recaídos tuvieron un TRVA igual o mayor a 4%, cuatro pacientes que no recayeron también tuvieron conteos similares. Por lo que concluyeron que la cuantificación de la angiogénesis a través de la cuantificación del TRVA, podría ayudar en la identificación de pacientes con retinoblastoma con alto riesgo luego de la enucleación y, por lo tanto en su pronóstico, pero que eran necesarios estudios con un mayor número de casos.

En un trabajo similar anterior, Karcioğlu y Huaman estudiaron 38 ojos enucleados derivados de pacientes con retinoblastoma, mediante la inmunohistoquímica con el factor FVIII RAg (del inglés, *Factor Viii - related antigen*) con el objetivo de visualizar los vasos sanguíneos del tumor a través del marcado de las células endoteliales y correlacionar su conteo con indicadores pronósticos como las características clínicas e histopatológicas. Sin embargo, la dificultad de esta metodología fue la identificación de vasos pobremente desarrollados mediante la marcación ya que estarían colapsadas durante los estadios más avanzados del desarrollo tumoral, cuando el tumor presenta un mayor tamaño, el cual se relaciona también con un aumento de necrosis. (Karcioğlu y Huaman, 1996).

Con respecto a la utilización de la RT-PCR, en un trabajo desarrollado por Yamane y colaboradores (Yamane et al, 1999), se evaluó por esta técnica en forma seriada la expresión del gen de la proteína 9.5 (PGP9.5) en células mononucleares de sangre, MO y células madre de SP inmovilizadas de un único paciente con retinoblastoma que ya era metastásico. El objetivo de este estudio consistió en utilizar este marcador para la detección de la enfermedad mínima residual luego de la terapia intensiva y evaluar así los efectos de dicho tratamiento. Sin embargo, respecto a la especificidad del transcripto del gen PGP9.5 para la detección de células circulantes en sangre y micrometástasis en MO, fue también encontrado en muestras control en un estudio sobre el neuroblastoma en otra investigación (Gilbert et al, 1997).

En un trabajo del año 2001, Yamashita y sus colaboradores (Yamashita et al, 2001) presentaron un reporte de caso de un paciente con retinoblastoma diseminado y analizaron tres transcritos génicos diferentes asociados a fotorreceptores: la subunidad α de la GMPc fosfodiesterasa de los conos, la subunidad β de la GMPc fosfodiesterasa de los bastones (Rod β -PDE) y la proteína de unión al interfosforeceptor retinoide (IRBP), a partir de sangre y MO. Concluyeron que la detección molecular de IRBP es útil en casos de retinoblastoma diseminado para la evaluación de la seguridad del autotransplante de médula, y que tanto el IRBP y el Rod β -PDE son más adecuados para el monitoreo de la eficacia del tratamiento.

En otro trabajo, Dimaras y colaboradores evaluaron el estado de remisión completa previo al sometimiento de los pacientes con retinoblastoma metastásico no hereditario al transplante autólogo de células madre periféricas, mediante el estudio de mutaciones paciente-específicas en los alelos del gene supresor tumoral RB1 en LCR y MO. Estudiaron un paciente con LCR metastásico y otro con metástasis en MO. Con una PCR alelo-específica (AS-PCR) lograron detectar mutaciones bialélicas en el RB1 específicas a su tumor. En el primer paciente, la mutación específica R251X fue detectada en mutantes control pero no en el LCR, corroborando la remisión clínica luego de la quimioterapia. En el segundo paciente, la AS-PCR para la mutación R358X fue fuertemente positiva en la detección de la recaída, y las muestras sucesivas de MO demostraron la remisión clínica luego del tratamiento. Ambos pacientes fueron aptos para la quimioterapia de consolidación seguida de rescate autólogo de células madre periféricas dirigidas a curar el retinoblastoma metastásico. Cuando el paciente con LCR metastásico recayó, por esta metodología ya se había detectado la mutación en las células circulantes en el LCR 3.5 meses antes de que el estudio histopatológico lo pudiera hacer. Concluyen que el estudio de las mutaciones del RB1 específica de tumor complementa el estudio citológico y la inmunohistoquímica del retinoblastoma tanto en LCR como en MO, ya que las células tumorales pudieron ser detectadas en un menor número que con las técnicas habituales (Dimaras et al, 2010 B).

Del mismo modo, Chan y col., (Chan et al, 2006) estudiaron las mutaciones alélicas del gen RB1 con el objetivo de que pudiera ser de utilidad para evaluar a nivel molecular si el estado de remisión es completa, o para monitorear la ausencia de células

tumorales contaminantes en las células madres aisladas antes de un trasplante. Para eso desarrollaron un ensayo de PCR alelo-específico para detectar las mutaciones en RB1 en las células tumorales, no presentes en las células normales, en 2 pacientes metastásicos con retinoblastoma no hereditario (1 con infiltración en la órbita y diseminación en el LCR; y el otro con infiltración de tejidos blandos y hueso en la base del cráneo y MO comprometida). Encontraron que tanto los estudios seriados del LCR y de la MO durante y después de la quimioterapia, resultaron negativas para las mutaciones propuestas, lo mismo que las células madre obtenidas por lo que resultaron adecuadas para preceder ambos pacientes a la consolidación con autotransplante de MO. Concluyeron que este estudio sería complementario a la citología convencional y a la evaluación por inmunohistoquímica del compromiso tumoral del retinoblastoma en LCR y MO y que serviría como una herramienta más sensible que las técnicas convencionales para evaluar la enfermedad mínima residual, y que sería promisoría para la evaluación de la eficacia de los tratamientos sistémicos en el retinoblastoma metastásico.

En 2012, nuestro grupo publicó un artículo donde, de forma preliminar, se estudió por una *Nested* RT-PCR optimizada la expresión de la GD2 sintasa en ocho pacientes con retinoblastoma, detectándose la misma en SP y LCR en casos de diseminación extraocular del tumor, no ocurriendo lo mismo en muestras derivadas de pacientes en bajo riesgo o voluntarios sanos, demostrándose que las técnicas basadas en PCR y la utilización de la GD2 sintasa podrían ser una herramienta muy útil para la evaluación de la EMD en pacientes enucleados (Laurent et al, 2010).

En este sentido, en otra publicación reciente de nuestra autoría (Laurent et al, 2013) se mostró el estudio de la expresión de la GD2 sintasa por RT-PCR y *nested*-PCR para la evaluación de la EMD al diagnóstico de muestras de LCR de 26 pacientes con alto riesgo según su histopatología. Se encontró que la EMD estaba presente al diagnóstico en el 23% de los casos, la mitad de los cuales recayeron en el LCR. Como conclusión, se encontró que el 31.7% de los pacientes evaluables con alto riesgo sin compromiso inicial del sistema nervioso central (SNC) presentó la EMD, la cual se asoció significativamente al compromiso del nervio óptico y a la historia de glaucoma, como a un riesgo aumentado de recaída en LCR.

En nuestro siguiente trabajo (Torbidoni et al, 2015), y tal como se detalla en los capítulos siguientes de esta tesis, se diseñó una metodología basada en RT-qPCR en tiempo real con el objetivo de probar la utilidad del factor de transcripción de conos y bastones con caja homeótica (CRX: por su nombre en inglés *Cone-Rod Homeobox-containing gene*), propio de la estirpe de los fotorreceptores, como marcador específico de linaje para la evaluación de la diseminación mínima en pacientes metastásicos. Se estudiaron 17 tumores primarios de retinoblastoma, 2 líneas celulares humanas de retinoblastoma, 47 muestras de MO control, y muestras LCR y MO de 17 pacientes con enfermedad metastásica probada mediante biopsia (9 al diagnóstico, 8 a la recaída). El marcador propuesto se expresó en todos los tumores y líneas celulares de tumor, como también en todos los pacientes metastásicos al diagnóstico (MO), no habiendo expresión en las muestras control. En el LCR de los pacientes recaídos, sin embargo, la detección del ARNm de CRX predijo la recaída en 2 pacientes en los que no se había podido llegar a ningún resultado conclusivo por la técnica de rutina, la inmunocitología para el gangliósido GD2. Por lo que se concluyó que tras la quimioterapia de inducción hay una respuesta total en MO que se sigue manteniendo, mientras que se vio que las recaídas en el LCR ocurrieron de manera independiente a la MO, por lo que serían eventos independientes.

Posteriormente, se analizó el uso de CRX en la detección de la EMD en pacientes con retinoblastoma intraocular (no-metastásico) y con factores de riesgo en la histopatología para evaluar la utilidad pronóstica de esta metodología en combinación con las empleadas de forma rutinaria (Laurent et al, 2016). Para esto, se evaluaron 96 pacientes mediante qPCR en tiempo real, en los cuales se detectó 9 casos con EMD (7 MO, 2 LCR). Se obtuvo que la EMD se asociaba significativamente con la presencia de tumor más allá del margen de resección quirúrgica del nervio óptico y con compromiso escleral. La EMD se dio en el 18.6% de los ojos grupo E con glaucoma. Esto puso en evidencia la utilidad de la detección de EMD como indicador pronóstico para los pacientes con retinoblastoma no-metastásico, siendo el grupo con mayor riesgo de recaída aquel con presencia de EMD. Se identificó a un grupo de pacientes con retinoblastoma de “muy alto riesgo” y factores de riesgo en la histopatología quienes tenían EMD y en quienes la probabilidad de sobrevida libre de enfermedad es significativamente baja a pesar de de la terapia adyuvante intensiva. De estos, los

pacientes con retinoblastoma grupo E y glaucoma tienen un riesgo significativo mayor de tener la EMD al diagnóstico.

A diferencia de estos últimos trabajos, que involucran los resultados presentados en el presente donde se estudian cohortes de pacientes y se valida la utilidad de los marcadores para la detección de la EMD y su correlación con el pronóstico de manera clínica, los dos anteriormente mencionados de Yamane y Yamashita y sus colaboradores, consistían en estudios de casos de un solo paciente, por lo que carecen de un número estadísticamente significativo de pacientes que permita definir fehacientemente la utilidad clínica de los marcadores moleculares que propusieron. Además, estos reportes abordan el estudio de la enfermedad mínima residual, es decir, la enfermedad presente luego del diagnóstico en pacientes con enfermedad metastásica sabida y que ya habían recibido tratamientos intensivos, por lo que su objetivo fue más bien el seguimiento de la eficacia del tratamiento. Por el contrario, el objetivo fundamental de este trabajo fue poder detectar si la enfermedad se halla mínimamente diseminada al momento del diagnóstico y que esta información sea de utilidad a la hora de tomar conductas terapéuticas.

Por su parte, en el trabajo de Dimaras y Chan junto a sus colaboradores, si bien, lograron monitorear la eficacia del tratamiento y certificar también la seguridad del trasplante autólogo de MO antes del mismo, este tipo de estudio requiere el diseño personalizado del sistema de detección ya que estudia las mutaciones específicas de tumor de cada paciente. Por lo tanto, necesita contar con el material de partida, tumor en este caso, de todos los casos. Además, requiere que los pacientes tengan la enfermedad no hereditaria, ya que de otro modo las mutaciones en el gen RB1 serían germinales y, por tanto, estarían presentes en todas las células del paciente; por lo que el estudio estaría restringido a este tipo de pacientes. Por otro lado, la evaluación se dirigió a la detección de la enfermedad mínima residual y en consecuencia a la evaluación de la eficacia del tratamiento en pacientes metastásicos con retinoblastoma, en este tipo de estudio, útil para el tipo no hereditario. Esta metodología no sería aplicable a la población completa de pacientes con retinoblastoma.

CONTEXTO TEÓRICO

Medicina de precisión

Según la *Genetic Home Reference* dependiente del *National Institutes of Health* de los EE.UU., la medicina de precisión o personalizada es una práctica emergente de la medicina que usa el perfil genético de un individuo para guiar las decisiones hechas respecto a la prevención, diagnóstico y tratamiento de una enfermedad. (What is precision medicine?, 2016).

Cuando una adolescente va a comprarse ropa, probablemente no compre el mismo estilo de ropa que se compraría su abuela. Sin embargo, cuando enferman, probablemente reciban el mismo tratamiento médico, a pesar de sus tantas diferencias. Esto se debe a que aún no se conoce completamente cómo las diferentes personas desarrollan enfermedades y responden a tratamientos. El resultado de esto es un enfoque médico de “talla única para todos” (del inglés: *"one-size-fits-all"*) basado en grandes promedios poblacionales. Esta práctica tradicional se saltea tener en consideración la constitución genética de un paciente junto con los biomarcadores de la enfermedad, la historia de tratamientos recibidos previamente y otros factores para ofrecer al paciente el mejor tratamiento en el momento adecuado (What is personalized medicine, (s.f)).

Ya es reconocido a nivel mundial que la manera en que afrontamos el entendimiento del diagnóstico y el tratamiento de una enfermedad está cambiando a pasos agigantados. El advenimiento de tecnologías emergentes dentro de la genómica, la epigenómica, la proteómica, la nanotecnología, el diagnóstico molecular e imágenes, es lo que está permitiendo esta rápida revolución. Es así que se plantea una necesidad creciente de migrar el abordaje reactivo de la medicina generalizada hacia un sistema más personalizado que contemple una asistencia a la salud de tipo predictiva, preventiva, y de precisión hacia una población o individuo. La medicina personalizada está influenciando las decisiones clínicas y ayudando a dar forma a los sistemas provisionales de salud (Bates, 2010). Esta nueva visión consigue mejores logros terapéuticos con menores efectos secundarios.

Ya se ha realizado un montón de trabajo para hacer más personalizado el cuidado del cáncer, en parte debido a que el cáncer es tan complejo que ha obligado al estudio interno del funcionamiento de las células humanas para el entendimiento de las causas del cáncer.

La medicina de precisión, en definitiva, se utiliza para conocer acerca del perfil genético de una persona y de la progresión de su tumor. Utilizando esta información, se espera poder encontrar estrategias de prevención, monitoreo y tratamiento que sean más efectivas, al mismo tiempo que impliquen menos efectos secundarios que los tratamientos tradicionales. Mediante más tests genéticos, se posibilitan los tratamientos ajustados a la necesidad de cada paciente.

La creación de un plan personalizado de monitoreo y tratamiento del cáncer incluye: a) Determinar las chances del paciente de desarrollar cáncer y seleccionar las estrategias de monitoreo para disminuir el riesgo, b) Asignar al paciente el tratamiento que sea probablemente más efectivo y que cause la menor cantidad de efectos adversos, c) Predecir el riesgo a la recurrencia, lo cual implica el regreso de la enfermedad.

Algunos pacientes oncológicos ya se están beneficiando por el nuevo enfoque de mayor precisión: Un análisis de ADN de las células tumorales revela detalles que no son posibles de ser observados a ojo desnudo, bajo un microscopio o con otro método de imágenes, y esto hace que las terapias más efectivas sean posibles. Y el abanico de opciones enfocadas al diagnóstico se está ampliando. Una de las bases más importantes de la medicina personalizada son los biomarcadores, que básicamente son indicadores biológicos que proveen información sobre una persona y su cuerpo, siendo lo más importante que brindan esa información aún previamente a que la persona enferme. Algunos ejemplos familiares son la presión arterial, como también las mediciones de azúcar en hígado y la glucemia. Sin embargo, la biología molecular contribuye con nuevos marcadores: genes, proteínas y productos metabólicos en orina, sangre o tejidos, los cuales hacen posible el delineado del perfil único de un paciente. (Gene analysis and biomarkers support precision diagnostics and new therapies - Personalized medicine against cancer, 2011).

Generalidades del cáncer, la progresión tumoral y metastásica y su detección

Cáncer

El término “cáncer” deriva del latín y significa “cangrejo”, al igual que el término griego equivalente “karkínos καρκίνος”. Habitualmente se lo considera sinónimo de los términos “neoplasia” y “tumor”; sin embargo, el cáncer siempre es una neoplasia o tumor maligno.

El cáncer es una patología compleja que involucra una serie de modificaciones genéticas, dependientes de factores ambientales o de alteraciones intrínsecas heredadas, que conducen a la transformación de una célula normal, proceso el cual se denomina transformación neoplásica. La acumulación de mutaciones en el mecanismo de control del ciclo celular puede originar un clon celular capaz de crecer independientemente de los estímulos del entorno, obviando los patrones de crecimiento del entorno celular circundante y por ende crecer indefinidamente, dando lugar a la formación de un tumor (Figura N°1) (Lodish et al, 2002). Además, muchas de estas células neoplásicas adquieren y acumulan nuevas mutaciones que les confieren la capacidad de invadir tejidos vecinos, pudiéndose diseminar eventualmente a blancos distantes.

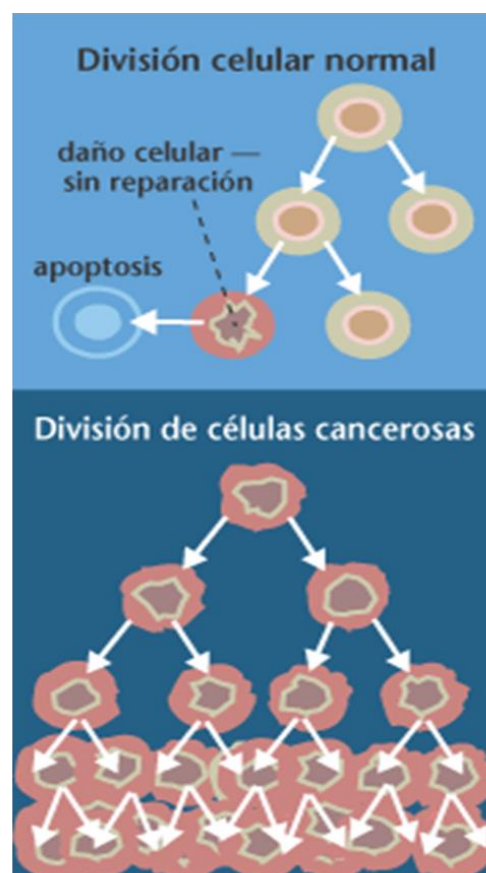


Figura N°1. Esquema representativo del crecimiento celular normal vs. crecimiento celular descontrolado (tumor).

Fuente: Wikimedia Commons, permiso: GFDL (acceso libre). Modificado de: Cáncer1.png

La denominación neoplasia se refiere a un crecimiento descontrolado o “nuevo” de células anormales. De este modo el cáncer implica, específicamente, una neoplasia maligna constituida por células agresivas con capacidad de diseminarse a sitios distantes

del organismo. Por el contrario, una neoplasia benigna se limita a su sitio de origen y, por lo general, la enfermedad no compromete la vida del paciente. Si bien no todos los tumores evolucionan hacia una variante maligna, las neoplasias malignas siempre atraviesan un período inicial de benignidad de duración variable antes de hacerse agresivas (Bal de Bier Joffé et al, 2008).

Los tumores se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo celular a partir del cual se originan. Los que derivan de las células epiteliales se denominan carcinomas y los que derivan del tejido conectivo o músculo, sarcomas. Otros tipos de neoplasias son las diversas formas de leucemia derivadas de células hematopoyéticas y los tumores derivados del sistema nervioso (Alberts et al, 2004).

Etapas de la carcinogénesis

La carcinogénesis puede ser dividida en cuatro etapas: iniciación, promoción, conversión maligna y progresión. Las mutaciones que participan en los pasos iniciales de la transformación neoplásica, en los que las células normales sufren daños irreversibles, se consideran mutaciones primordiales puesto que están involucradas en la disregulación del ciclo celular. Las mutaciones posteriores y las modificaciones fenotípicas subsiguientes son necesarias para dar lugar a la formación de una masa tumoral maligna.

De esta manera, durante la fase de promoción las células tumorales se expanden clonalmente dando masas tumorales visibles preneoplásicas, las cuales, tras sufrir la conversión maligna, se transforman y expresan el fenotipo maligno. Este proceso requiere de más cambios genéticos, incluyendo la activación de oncogenes y/o inactivación de genes supresores de tumor. Finalmente, durante la progresión tumoral las células malignas adquieren un fenotipo cada vez más agresivo. Esta fase se caracteriza por una inestabilidad genómica, amplificación de algunos genes y alteración de la expresión de otros, que les permite a las células tumorales adquirir capacidades de invasión local y diseminación metastásica a distancia (Bal de Bier Joffé et al, 2008).

El cáncer es causado por alteraciones en oncogenes, genes supresores de tumor y genes codificantes para microARNs (miARNs), por lo que es en primera instancia una enfermedad genética. Estas alteraciones generalmente son eventos somáticos; no obstante las mutaciones en la línea germinal pueden provocar que una persona posea mayores probabilidades a desarrollar un tumor. Un solo desorden genético es rara vez suficiente para el desarrollo de un tumor maligno. La evidencia apunta a un proceso de alteraciones secuenciales en muchos oncogenes, genes supresores de tumor y genes codificantes para miARNs (Croce, 2008).

A pesar de que no se comprenden completamente los procesos que ocurren durante la tumorigénesis, es claro que las sucesivas acumulaciones de mutaciones en genes clave son la fuerza impulsora de la misma. Se piensa que cada mutación sucesiva que ocurre en la célula tumoral en desarrollo da importantes ventajas de crecimiento que permiten a los clones celulares crecer más allá que las células normales vecinas. De este modo, el desarrollo tumoral puede ser pensado como una evolución Darwiniana a escala microscópica con cada generación sucesiva de células tumorales cada vez más adaptada a trascender las reglas sociales que regulan el crecimiento de las células normales. A esto se le denomina: evolución clonal (Nowell, 1976). La correlación entre cambios genéticos y progresión tumoral, por supuesto, no prueba causalidad, y varios investigadores consideran que al menos algunos aspectos del proceso evolutivo, como la aparición de nuevos antígenos de superficie y de subpoblaciones resistentes a drogas, representarían cambios más bien epigenéticos que genéticos.

Ahora bien, la presencia y acumulación de las mutaciones responsables de la progresión tumoral está favorecida por un estado de inestabilidad genómica en las células tumorales. Esta es una característica común de la gran mayoría de los tumores y que acelera la acumulación de cambios genéticos. Comúnmente, la inestabilidad genómica se manifiesta como grandes aberraciones cromosómicas y cambios en la ploidia, aunque también pueden observarse pequeños cambios a nivel nucleotídico, con inserciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos. Las aberraciones cromosómicas ocurren temprano durante la transformación maligna, mientras que la inestabilidad

genómica promueve la adquisición de capacidades que favorecen la progresión tumoral (Martínez y Blasco, 2011; Sánchez, 2013).

Oncogenes y Genes supresores de tumor

Un oncogén es un gen cuya proteína es capaz de transformar las células de un cultivo celular o de inducir cáncer en un animal. La mayoría de los oncogenes derivan de genes celulares normales denominados protooncogenes, los cuales están involucrados en la regulación de la replicación y la diferenciación celular. Por más pequeñas que sean, las alteraciones en un protooncogén pueden transformarlo en un oncogén. Los distintos oncogenes codifican estructuras proteicas, las cuales están implicadas en la transducción de señales celulares y pueden actuar como factores de crecimiento o receptores de membrana de los mismos, participar en las cadenas de señalización intracitoplasmática o regular la expresión de genes críticos en el núcleo. La conversión de un protooncogén a un oncogén generalmente significa una mutación con ganancia de función. Las mutaciones con ganancia de función son genéticamente dominantes, es decir, que la mutación de un único alelo es suficiente para manifestar el fenotipo (Alberts et al, 2004; Lodish et al, 2002).

Por su parte, los genes supresores de tumor codifican proteínas que actúan en condiciones normales de modo de suprimir la proliferación celular, modulando el ciclo celular a través de diversos mecanismos. Cuando se producen mutaciones que causan la inactivación o delección de estos genes, el resultado es un crecimiento celular descontrolado, ya que las células alteradas pierden la capacidad de regular con eficiencia el ciclo celular. Estos genes se denominan supresores de tumor ya que, cuando se encuentran presentes o activos, impiden la transformación tumoral al promover la detención del ciclo celular cuando la célula presenta daños a nivel genómico. Los genes supresores son recesivos y la pérdida de su función requiere la inactivación secuencial de ambas copias alélicas. La caracterización inicial de los fenotipos heterocigotos y homocigotos ha permitido conocer los mecanismos por los cuales los genes supresores de tumor participan en el desarrollo normal y cómo su pérdida contribuye a la tumorigénesis (Baker et al, 1990; Lodish et al, 2002).

El primer gen supresor tumoral estudiado fue el RB1, que codifica la proteína pRB1 (proteína del retinoblastoma) y regula el ciclo celular, inhibiendo la proliferación. Por ello, el gen Rb1 resulta ser un regulador negativo del ciclo celular, dado que su ausencia o mal funcionamiento da como resultado la continuidad de la actividad proliferativa. Así, las células tumorales que presentan a pRB1 mutada están estimuladas a dividirse constantemente (Bal de Bier Joffé et al, 2008).

Diseminación metastásica

A pesar de los continuos avances en las técnicas quirúrgicas y del desarrollo de terapias adyuvantes, la gran mayoría de las muertes por cáncer están más relacionadas con la diseminación metastásica que con la recurrencia local del tumor. La diseminación metastásica es un proceso secuencial y progresivo que comprende la liberación de las células del tumor primario, el transporte de las mismas hacia sitios distantes y la subsiguiente formación de nuevos focos de crecimiento, llamados metástasis, en otros sitios del organismo. Sin embargo, a pesar de sus importantes implicaciones en la salud de los pacientes, el proceso de metástasis es un fenómeno altamente ineficiente, ya que sólo el 0,01% de las células que se desprenden del tumor y pasan a la circulación dan lugar a la formación de una metástasis. Las células tumorales que eventualmente dan lugar a focos tumorales secundarios deben sobrevivir a una serie de interacciones potencialmente letales con los mecanismos homeostáticos del hospedador (De Vita et al, 1997), la turbulencia de la circulación y los mecanismos de defensa del sistema inmunitario (Liotta y Kohn, 2001).

Pasos de la diseminación metastásica

Los pasos celulares y moleculares requeridos para la formación de metástasis son similares en las distintas variantes tumorales, aunque determinados tipos de cáncer muestran particulares patrones órgano-específicos de metástasis. El proceso metastásico y de invasión a través de la vía hemática, se describe como una serie de cinco etapas secuenciales (Figura N°2).

En primera instancia se produce la angiogénesis, que implica el desarrollo y la organización de nuevas estructuras vasculares sobre la masa tumoral primaria. Esta

neovasculatura es algo más permeable que los vasos preexistentes, y brinda a las células tumorales no sólo la posibilidad de crecimiento y nutrición, sino también una ruta de escape para abandonar el tumor primario, accediendo a la circulación sistémica.

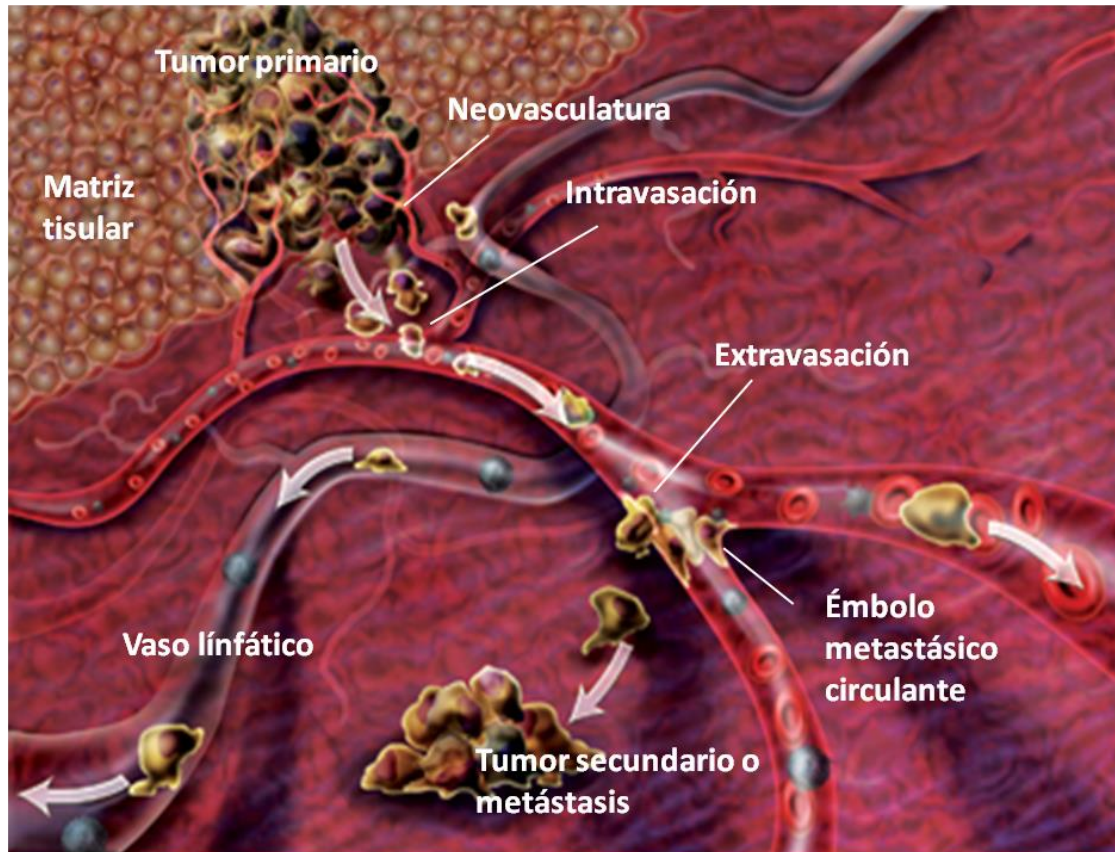


Figura N°2: Proceso metastásico. Luego de que el tumor primario haya propiciado la angiogénesis, las células cancerosas deben ser capaces de degradar las matrices tisulares para alcanzar las paredes de los vasos sanguíneos, donde se adhieren e intravascan. Estando en el torrente sanguíneo, las células tumorales se enfrentan al estrés mecánico, la vigilancia inmunológica y a la ausencia de sustrato (anoikis). Sólo aquellas que superen estas barreras y que posean un perfil molecular invasivo y metastásico, podrán extravasarse y dar lugar al desarrollo de un tumor secundario en un sitio distante.

Fuente: Adaptado de <http://anaximperator.wordpress.com/see-this-images-of-cancer/>

Durante el siguiente paso, luego de la invasión del tejido subyacente a la masa tumoral, tiene lugar la adhesión de las células neoplásicas a la membrana basal del endotelio de los nuevos vasos sanguíneos; la posterior liberación de enzimas con acción proteolítica permite a las células tumorales destruir la arquitectura de las matrices tisulares, logrando así el acceso a la corriente circulatoria. Los vasos linfáticos también posibilitan la circulación de las células tumorales, aunque los tumores no promueven la generación de una red linfática propia.

Una vez en el torrente sanguíneo, las células tumorales deben enfrentarse al estrés mecánico y a la vigilancia inmunológica, como también deben ser capaces de evadir la apoptosis por falta de sustrato, o anoikis. Finalmente, las células tumorales que circulan aisladamente o en forma de émbolo y que pudieron superar las barreras son transportadas pasivamente hacia los sitios secundarios de implantación donde, sólo si poseen un perfil invasivo y metastásico, se detiene, extravasan y comienzan otra vez su proliferación (Gomez y Alonso, 1998).

Enfermedad mínima y su detección

La presencia de células malignas que permanecen ocultas luego del curso de un tratamiento, que finalmente resulta en una remisión clínica, se denomina enfermedad mínima residual (EMR) del inglés *minimal residual disease* (MRD) (Lacroix y von Knebel Doeberitz, 2001). La misma es utilizada ampliamente para el monitoreo de los paciente durante su tratamiento luego de una recaída, con el objetivo de evaluar si el tratamiento ha sido efectivo o no. Sin embargo, la enfermedad mínimamente diseminada (EMD) o del inglés *minimal disseminated disease* (MDD), a diferencia de la primera, es la que se encuentra presente al momento del diagnóstico cuando se considera que la enfermedad está localizada, estando en verdad ya diseminada (Beiske et al, 2009; Stark et al, 2009).

Por tanto, cuando un paciente oncológico no presenta evidencias de diseminación metastásica luego de la resección del tumor, es considerado como un paciente libre de enfermedad clínica o virtualmente libre de cáncer. No obstante, en muchos casos las recidivas se hacen evidentes mediante la aparición de focos metastáticos en uno o varios órganos tiempo después de la primera resección o del tratamiento, luego del subsecuente período de remisión clínica. En ambos casos, estas metástasis son generadas por unos pocos clones celulares malignos remanentes que se han multiplicado y han formado agregados de células cancerosas (micrometástasis). Estas células circulan en los fluidos corporales y no pueden ser detectadas por las técnicas de diagnóstico clínico o histopatológico habituales. La presencia de estas células al diagnóstico, constituye la mencionada EMD, a la cual está abocado este trabajo.

Dado que en la práctica clínica la detección de estas células tumorales residuales tanto en circulación como en sitios micrometastásicos es muy difícil (Lacroix y von Knebel Doeberitz, 2001), consecuentemente no se ha considerado a la enfermedad mínima para la clasificación de "alto riesgo" de los pacientes, quienes requieren terapia adyuvante. Sin embargo, muchos estudios han demostrado que luego de la cirugía las células tumorales remanentes en el margen de resección, en los nódulos linfáticos, SP o en la MO implican un riesgo significativo de recaída metastásica para el paciente (von Knebel Doeberitz y Lacroix, 1999; Wikman et al, 2008).

Debido a que la cirugía continúa siendo la mejor opción de tratamiento para la mayoría de los pacientes oncológicos con tumores sólidos, luego de la misma surge el interrogante sobre si la remoción de la masa tumoral fue completa o quedaron algunas células tumorales remanentes en el sitio primario. Asimismo, una duda semejante acerca de la preexistencia de una enfermedad mínima, aparece en el momento del diagnóstico. Para resolver estos problemas, se han identificado una gran cantidad de alteraciones genéticas asociadas a tumor en varios tipos tumorales. En este sentido, los estudios basados en la PCR han hecho una gran contribución, ya que poseen una mayor sensibilidad y especificidad que los estudios citomorfológicos para la detección de la diseminación hematógena sistémica o linfática de las células tumorales.

Se han detectado células tumorales diseminadas en varios compartimientos biológicos tales como la MO, SP, nódulos linfáticos y LCR, los cuales son considerados como un factor pronóstico relevante. Por lo tanto, la detección de la EMD se halla en evaluación como una herramienta fundamental para la correcta asignación de una terapia adyuvante o para la evaluación de la evolución de los pacientes durante el tratamiento en los protocolos clínicos oncológicos, en base al estudio por técnicas moleculares más sensibles.

No obstante, ya que varios de los estudios para la detección de la EMD son complejos y resultan influenciados por aspectos técnicos, la mayoría de las aplicaciones diagnósticas no han sido lo suficientemente estandarizadas. Es por este motivo que se hace necesaria la presencia de controles adecuados y métodos reproducibles para la detección de la EMD, de manera que puedan ser utilizados y comparados en los estudios colaborativos controlados (Lacroix y von Knebel Doeberitz, 2001).

Además, uno de los obstáculos en la detección de la EMD ha sido la falta de biomarcadores sensibles de la presencia de células tumorales. Tales indicadores son los llamados marcadores moleculares de tumor y guardan relación con ciertas modificaciones fenotípicas características de la célula transformada y constituyen el sello de identificación de la misma.

Biomarcadores tumorales

Toda sustancia producida específicamente por un tumor o que es liberada desde el tejido tumoral hacia el torrente sanguíneo u otros fluidos corporales o en respuesta del organismo frente al crecimiento tumoral, se denomina marcador tumoral, marcador molecular o biomarcador (Tumor Markers, 2015). Así, la detección de un marcador tumoral significaría que un cierto tipo de tumor se encuentra presente en el organismo.

Un marcador de tumor ideal sería aquél que fuera liberado exclusivamente por las células tumorales, que fuera específico para un tipo tumoral en particular, que sea detectable aún a partir de una baja carga de células tumorales, que su nivel de expresión esté relacionado directamente con la carga tumoral y que esté presente en todos los pacientes que presentan la enfermedad. Sin embargo, aunque la mayoría de los tumores liberan macromoléculas detectables al torrente circulatorio, ningún marcador tumoral cumple, hasta el momento, con todos estos requisitos.

De hecho, la mayoría de los marcadores tumorales no son específicos de un tumor; no obstante, los niveles de los marcadores tumorales varía en relación con el estadio tumoral: suele ser baja en los estadios iniciales, y elevada en los estadios más avanzados. Además, los niveles de marcadores no aumentan en todos los pacientes por igual, especialmente en las fases iniciales de la enfermedad, y pueden elevarse en algunas condiciones benignas. Los resultados falsos positivos se deben a la presencia de enfermedades no neoplásicas o a alteraciones en la función de los órganos donde estas sustancias son catabolizadas. Por ello, es imprescindible conocer las causas que pueden producir estos falsos incrementos en la concentración del marcador tumoral para poder descartarlas y complementar los estudios con el uso de otras metodologías, tales como la evaluación histopatológica. Esto sugiere que gran parte de los marcadores tumorales no

son completamente útiles en el diagnóstico, pero sí en el pronóstico, diagnóstico precoz de recidiva y en el control evolutivo del tumor.

La sensibilidad de un marcador tumoral se refiere a su habilidad para identificar a aquellas personas que poseen una enfermedad. Por otro lado, la especificidad tiene que ver con su capacidad para discriminar a aquéllas que no la presentan. La mayoría de los marcadores no son lo suficientemente sensibles o específicos como para ser utilizados en los *screenings* de un cáncer, es decir, en los monitoreos destinados a la detección temprana del cáncer aún antes de que haya cualquier síntoma, pero sí son muy útiles para otras aplicaciones.

De esta manera, los marcadores tumorales pueden proveer distintas informaciones según el objetivo de su utilización. Si el objetivo es aplicarlos a la búsqueda de nuevos casos de cáncer, principalmente cuando existe una historia familiar de cáncer, se denominan *marcadores de detección temprana*; los *marcadores de riesgo*, son los destinados a la identificación de mutaciones germinales heredadas en genes involucrados en la tumorigénesis, en su mayoría genes supresores de tumor o genes involucrados en el mantenimiento de la estabilidad genómica; los *marcadores diagnósticos*, permiten establecer el origen tisular del tumor indiferenciado en los casos de pacientes sintomáticos; los que permiten definir si la enfermedad ha avanzado o si ha invadido otros tejidos son los *marcadores de estadificación*; por otro lado, los *marcadores pronósticos*, son los que ayudan a la valoración de la agresividad tumoral o a la determinación el comportamiento del tumor, por lo que son capaces en el momento del diagnóstico (o cirugía) de dar información sobre la futura evolución clínica del paciente; los *marcadores predictivos*, establecen la probabilidad de respuesta a algún tipo de tratamiento, permitiendo monitorear su efectividad; y finalmente, los *marcadores de recurrencia* son los que permiten monitorear la recurrencia de la enfermedad; generalmente, si los niveles del marcador han disminuido, su aumento posterior denota la recurrencia, o si permanece elevado luego de la cirugía probablemente implique que el tumor no se haya removido completamente (Tumor Markers, 2015). En particular, para la detección de la EMD en el retinoblastoma el marcador tumoral propuesto para este trabajo es de tipo pronóstico y de recurrencia, de manera de que permita establecer la presencia de células cancerosas diseminadas para

dar información sobre la futura evolución clínica del paciente y, en forma anticipada, permitir el monitoreo la recurrencia de la enfermedad durante el tratamiento.

El Retinoblastoma

Generalidades

Este trabajo basó su desarrollo sobre la neoplasia intraocular más frecuente en la infancia, el retinoblastoma. El retinoblastoma es un tumor que se desarrolla sobre la retina como una masa de células blanquecinas, cuya apariencia puede observarse en el esquema y las fotografías de la Figura N°3.

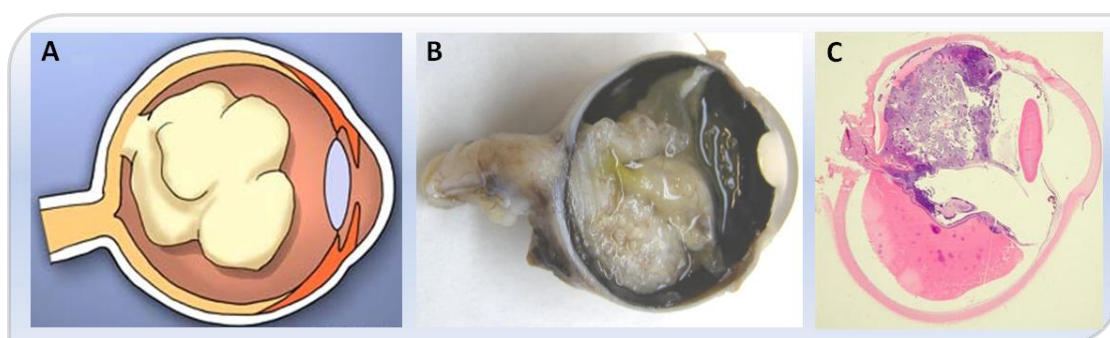


Figura N°3: Retinoblastoma. **(A)** Esquema de un corte ecuatorial del globo ocular con retinoblastoma. **(B)** Corte ecuatorial de un globo ocular enucleado. **(C)** Corte histológico del globo ocular, tinción H&E, en violeta se ve la tinción con hematoxilina del tumor.

Fuente: (A y C) <http://www.opthobook.com/>
(B) <http://www.cure4kids.org/ums/onclopedia/>

El retinoblastoma es la neoplasia intraocular más común en pediatría. Aún así, es un tumor poco incidente que presenta unos 40 casos al año en la República Argentina, con una ocurrencia constante de 15000–20000 nacidos vivos a nivel global, lo cual corresponde con cerca de 9000 nuevos casos cada año (Kivela, 2009).

El retinoblastoma tiene una incidencia de un caso cada 15.000 a 20.000 nacidos vivos (Abramson et al, 2000), lo cual representa el 4% del total del cáncer infantil, y el 11% de los tumores en los menores de 1 año (Abramson, 2005) en promedio a nivel mundial. Es causado por la acumulación de mutaciones en ambos alelos del gen RB1, el

primer gen supresor tumoral identificado y que fue clonado en 1986 (Friend et al, 1986) y se piensa que posiblemente también de otros genes (Indovina et al, 2010; Corson y Gallie, 2007; Croce, 2008).

La edad promedio de presentación es de 24 meses; aunque es menor (en promedio de 10 meses) para los casos bilaterales de retinoblastoma que para los casos unilaterales (27 meses). Aunque es curable por tratamiento combinado incluyendo crioterapia focal, láser, radioterapia o quimioterapia cuando es diagnosticada tempranamente, el tratamiento más común a nivel internacional para el retinoblastoma es la enucleación (Balmer, 2006).

Retina y célula de origen del retinoblastoma

Recientemente, tras varios estudios de diversos grupos de investigación sobre el tipo celular que da origen a esta neoplasia, finalmente el grupo de Xu y colaboradores demostró que las células precursoras del retinoblastoma son los conos de la retina (Xu et al, 2009), sin embargo, estudios ulteriores ponen en duda que una sola célula de origen explique todos los casos de retinoblastoma. En la Figura N°4 pueden verse un diagrama esquemático de un ojo humano donde se ubican las capas más reconocidas del mismo: la coroides, la esclera y la retina; y un zoom de la retina con los tipos celulares que la componen (Figura N°4). La retina es un tejido sensible a la luz situado en la superficie interior del ojo. La luz que incide en la retina desencadena una serie de fenómenos químicos y eléctricos que finalmente se traducen en impulsos nerviosos que son enviados hacia el cerebro a través del nervio óptico. Posee una estructura compleja formada básicamente por varias capas de neuronas interconectadas mediante sinapsis que forman una red, de ahí su denominación “retina”. Las únicas células sensibles directamente a la luz son los conos y los bastones. Los bastones funcionan principalmente en condiciones de baja luminosidad y proporcionan la visión en blanco y negro; por su parte, los conos están adaptados a las situaciones de mucha luminosidad y proporcionan la visión en color. Ambos tipos celulares constituyen las únicas neuronas fotorreceptoras de la retina.

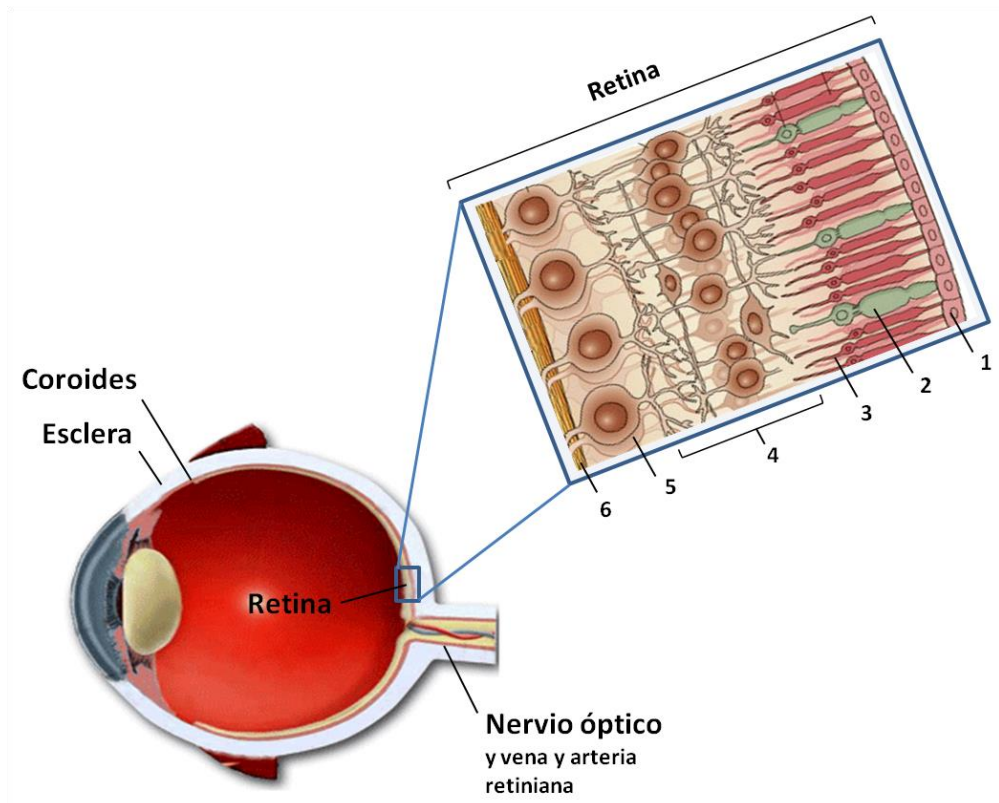


Figura N°4: Diagrama esquemático de un corte del globo ocular con ubicación de sus capas más importantes: la coroides, la esclera y la retina. También se muestra el nervio óptico y la vena y arteria de la retina que lo atraviesan. Se muestra un zoom de la retina para mostrar sus componentes celulares principales. 1) Epitelio pigmentado (coroides), 2) Cono, 3) Bastón, 4) Células horizontales, bipolares y amácrinas, 5) Células ganglionares, 6) nervio óptico.

Fuente: Modificado de: <http://hamwaves.com/antennas/diel-rod.html>

Genética del retinoblastoma

El retinoblastoma puede darse de dos maneras: hereditaria o esporádica. El retinoblastoma hereditario implica la adquisición de una mutación en uno de los alelos del gen RB1, situado en el cromosoma 13, por la vía germinal y otra mutación en el restante alelo, adquirida a través de mutaciones somáticas en células de la retina. Por otro lado, el retinoblastoma no hereditario ocurre por la acumulación de mutaciones esporádicas en ambos alelos del gen RB1 en las células retinianas, según la “hipótesis del doble golpe” (o *two hit hypothesis*) propuesta por primera vez en el año 1953 por el estadístico finlandés Carl O. Nordling (Nordling, 1953), como la teoría de la multi-mutación en cáncer. Posteriormente, esta teoría fue



formulada y popularizada por el genetista estadounidense Alfred George Knudson en 1971 (Knudson, 1971), quien dio las bases del modelo de funcionamiento de los genes supresores de tumor para explicar, precisamente, el mecanismo hereditario del



retinoblastoma, una enfermedad autosómica dominante, a través de una doble mutación en el gen RB1. Esta característica del retinoblastoma es paradójica, ya que, aunque la transmisión de la predisposición a desarrollar un tumor es dominante (ya que sólo se necesita un alelo mutado para transmitir la predisposición), el desarrollo del tumor en sí mismo es recesivo (porque hacen falta dos alelos mutados para que el tumor ocurra).

El conocimiento actual del proceso mutacional que da origen a la concepción del cáncer está basada en las teorías anteriormente mencionadas; se sabe que todos los cánceres humanos despliegan un abanico de modificaciones genéticas y epigenéticas y que se requiere un cierto número de estas alteraciones, seguramente más que sólo dos, para que la progresión tumoral tenga lugar. Sin embargo, esto no descalifica a la teoría de Knudson ni Nordling, simplemente agrega que una vez que el RB1 es inactivado por mutaciones van ocurriendo aceleradamente una serie de lesiones genéticas a través de la inestabilidad genómica (Dyer y Abramson, 2009; Corson y Gallie; 2007; Tucker y Friedman, 2002).

Siguiente la teoría del “doble *hit*”, el retinoblastoma puede generarse de dos maneras: de forma esporádica o de forma hereditaria. Los casos esporádicos y hereditarios de la enfermedad son clínica e histológicamente indiferenciables, si bien los casos hereditarios aparecen generalmente antes que los casos esporádicos y suelen ser de múltiples focos, a diferencia de los esporádicos que suelen presentarse como foco único.

En el retinoblastoma hereditario una de las mutaciones se hereda de las células germinales de un progenitor por lo que estaría presente en todas y cada una de las células que conforman los tejidos del individuo hijo y, por lo tanto, de la retina. En este caso, la probabilidad de mutación en el segundo alelo del gen es alta en una o más células por lo que se desarrollarían uno o más tumores. Sin embargo, en los casos

esporádicos, las dos mutaciones o “hits” en los dos alelos del gen RB1 deben ocurrir al azar en una misma célula (mutaciones somáticas). Dicha coincidencia sería rara y por lo tanto los tumores esporádicos son infrecuentes (aproximadamente 1 en 100.000 para el retinoblastoma) y aparecerán a edades más tardías. La aparición de tumores múltiples en un mismo paciente sería tan poco probable que sería diagnóstico de una predisposición genética (Rodríguez-Cruz et al, 2005).

En la Figura N°5 de la página siguiente, se presenta el esquema explicativo de las formas en las que puede darse el retinoblastoma en base a la teoría del “doble hit”, en este caso sobre el gen RB1, cuyas mutaciones predisponen a la enfermedad: Forma esporádica y forma hereditaria.

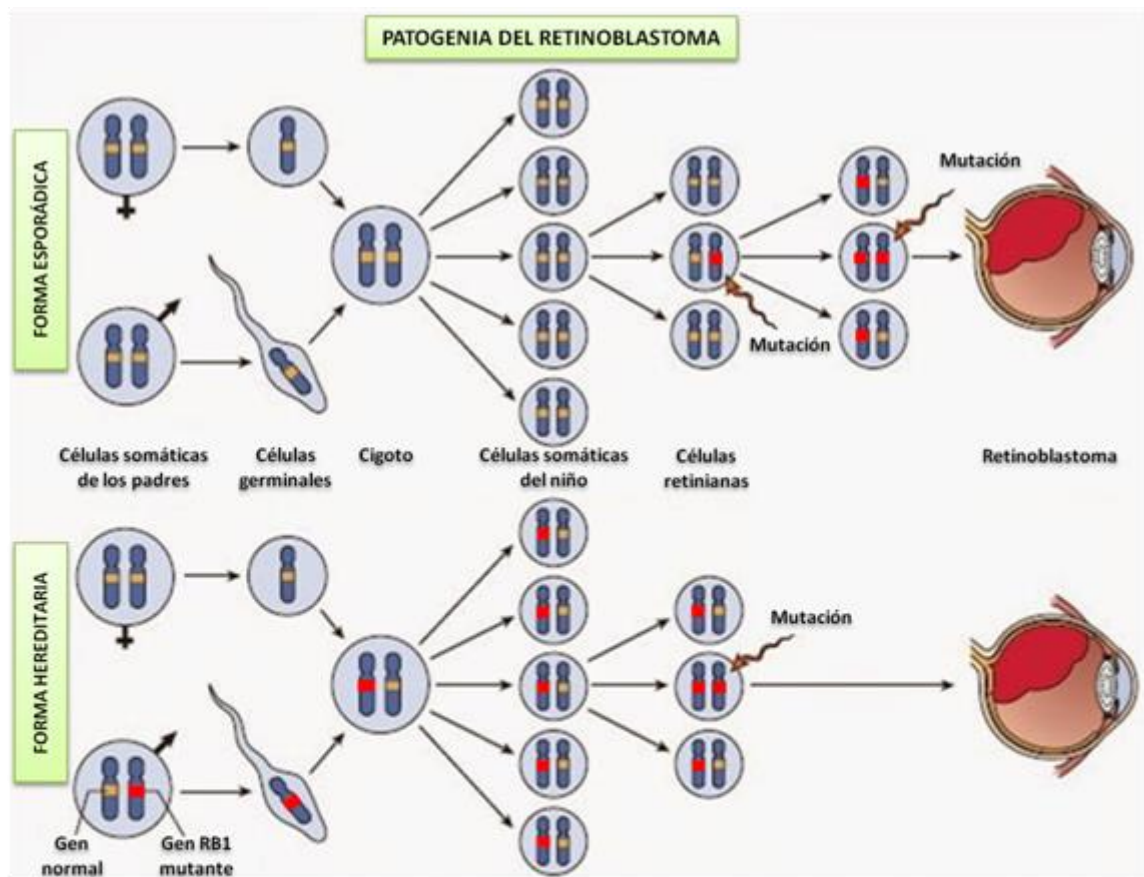


Figura N°5. Patogénesis del Retinoblastoma. Dos mutaciones (o doble “hit”) del locus RB1 en el cromosoma 13q14 conducen a la proliferación neoplásica de las células retinianas. En la forma esporádica, ambas mutaciones son adquiridas por las células retinianas después del nacimiento. En la forma hereditaria, todas las células somáticas heredan un gen RB1 mutante de un padre portador. La segunda mutación afecta al locus RB1 en una de las células retinianas después del nacimiento.

Fuente: Adaptación de: Mitchell R, Kumar V, Abbas A, Fausto N y Aster J. Patología Estructural y Funcional (2010). 8th ed. Pag: 288. Barcelona, España: Editorial Elsevier.

Recuperado de: <http://basesmolecularesdelcancer2015d5group1.blogspot.com.ar/2015/04/7-patogenia-del-retinoblastoma.html>

Como se mencionó, la patogenia del retinoblastoma (forma esporádica o hereditaria), tiene incidencia en su lateralidad: unilateral o bilateral, pudiendo afectar sólo uno o ambos ojos, respectivamente. La clínica de esta enfermedad ha demostrado que el 60% de los casos se presenta de forma unilateral (y generalmente unifocal, es decir, un solo tumor en uno de los dos ojos, que se da entre los 2 y los 3 años de edad) con el primer y segundo evento mutacional sólo en los retinoblastos, por lo que la mutación no es heredable a la descendencia. La mayoría de estos (90%) se da esporádicamente (no hereditario), y el 10% de manera hereditaria (6% en Argentina). Por otro lado, el restante 40% del total de casos con retinoblastoma se da de manera bilateral (habitualmente multifocal, se da en forma de tumores independientes en ambos ojos, con edad promedio al momento del diagnóstico de 1 año) y siempre es hereditario ya que los individuos heredan un alelo mutado (primer evento o *hit*) en el gen RB1 a través de las células germinales; siendo además heredable, ya que los individuos portadores de la mutación podrán transmitirla a su progenie (Draper et al, 1992; Rodríguez-Cruz et al, 2005). Por lo tanto, del total de casos con retinoblastoma hereditario que incluye al 10% de los unilaterales y la totalidad de los bilaterales, sólo el 25% presenta historia familiar (retinoblastoma 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) (Manzitti y Mansilla, 2010).

Con respecto a la penetrancia de la enfermedad, aproximadamente el 90% de los niños que acarrean la mutación germinal, desarrollarán retinoblastoma durante su infancia temprana, permaneciendo el restante 10% como portadores sanos (Parma et al, 2009). Además, los afectados con el tipo hereditario tienen una mayor probabilidad de desarrollar otros tipos de cáncer durante su vida, (Kleinerman et al, 2005; Lohmann, 1999), que en conjunto se denominan segundos tumores primarios, algunos de los cuales incluyen sarcomas óseos o de tejidos blandos, melanoma maligno, neoplasias del cerebro o meninges, pulmón y posiblemente vejiga. (Eng et al, 1993; Yu et al, 2009). En consecuencia, los exámenes de seguimiento sistemáticos en este sentido, tanto del paciente como de los parientes cercanos, son muy importantes (Parma et al, 2009). Esto se debe a que en las formas familiares, todos los tejidos somáticos presentan un alelo mutado, por lo que sólo necesitan una segunda mutación para provocar la pérdida de función, mientras que en los casos esporádicos hacen falta dos eventos limitados al ojo, lo cual ocurre con menor frecuencia.

Entonces si durante el desarrollo del ojo, en el caso del retinoblastoma hereditario, la copia restante del gen RB1 es delecionada o mutada no habrá ningún RB1 funcional que produzca la proteína reguladora, por lo que el control del ciclo celular se verá alterado (Figura N°6, página siguiente).

La pérdida del segundo alelo del gen RB1 en el cromosoma 13 puede producirse de diversas maneras (Plon, 2006): Por pérdida o deleción de una porción del cromosoma 13, pérdida completa del cromosoma 13; pérdida y duplicación del cromosoma 13 mutado; recombinación homóloga entre los dos cromosomas 13 durante la mitosis o adquisición de una mutación independiente en el segundo alelo del RB1. Esta situación se denomina pérdida de heterocigosis (o LOH, según sus siglas en inglés), y se da en

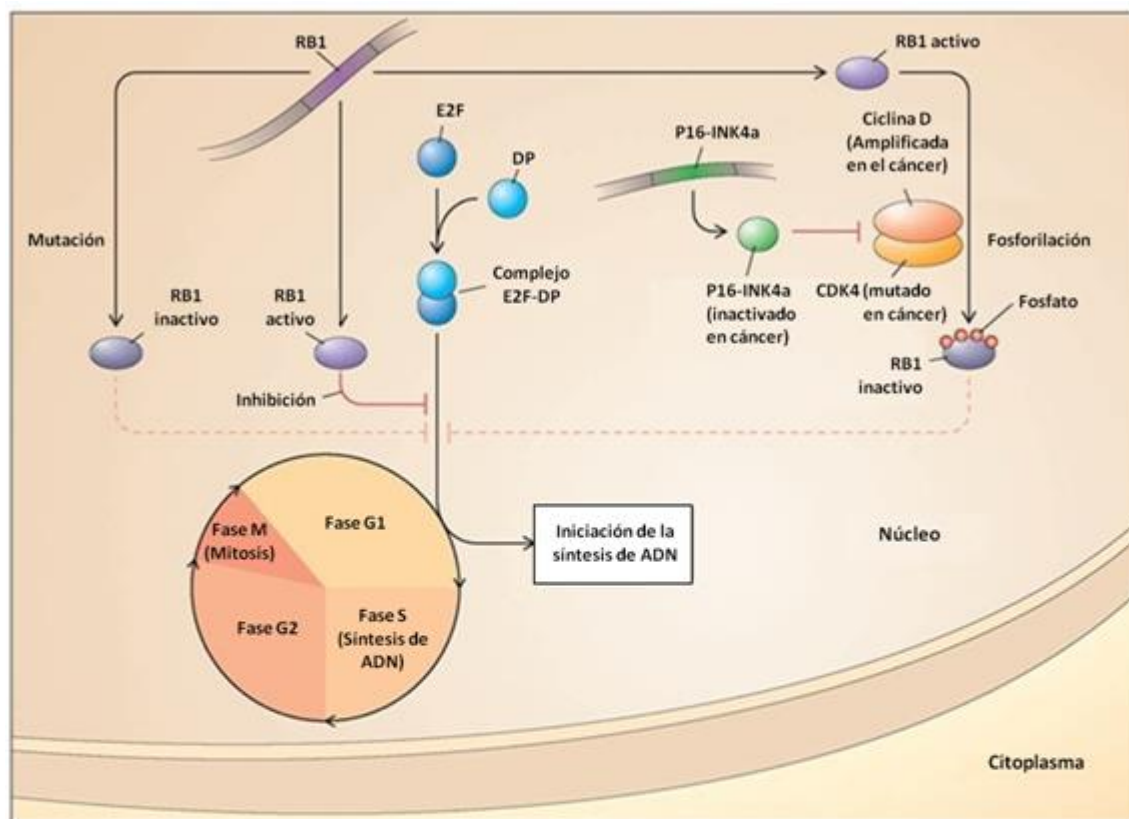


Figura N°6. La división celular en células de mamífero se desencadena tras un punto de control crítico entre la fase G1 y la síntesis de ADN (fase S). El complejo de proteína E2F-DP, que activa los genes necesarios para la síntesis de ADN, se inhibe directamente por el producto del gen supresor de tumor RB1. La progresión del ciclo celular normal requiere la inactivación reversible de la proteína RB1 por la fosforilación inducida por la ciclina D y CDK4. Las mutaciones en RB1 impiden su actividad de inhibición normal de la progresión del ciclo celular, contribuyendo a la división celular desregulada. La amplificación de la ciclina D, la activación de mutaciones en CDK4, y la inactivación del inhibidor de CDK4 p16-INK4a son otros mecanismos por los que la vía de RB1 se interrumpe en distintos tipo de cáncer humano.

Fuente: Modificado de: <http://what-when-how.com/acp-medicine/molecular-genetics-of-cancer-part-2/>

todos los casos anteriores, exceptuando al último. La condición de LOH es frecuentemente observada en cáncer (Lohmann, 1999).

Además, a la hora de determinar las mejores opciones de tratamiento, el retinoblastoma es dividido en dos grandes grupos: retinoblastoma intraocular o extraocular. Cuando es intraocular, el tumor se encuentra aún contenido dentro del globo ocular, mientras que cuando es extraocular, se encuentra el retinoblastoma orbital (las células tumorales han invadido sólo la órbita del ojo), o retinoblastoma metastásico (el cual ha alcanzado partes distantes del cuerpo, tales como los nódulos linfáticos cercanos, SNC y órganos distantes, generalmente hueso y MO) (Gündüz et al, 2006).

Sintomatología y diagnóstico, estadificación y pronóstico

El retinoblastoma se puede detectar mediante una exploración oftalmológica de rutina. Usualmente, el primer síntoma clínico evidente de retinoblastoma es la leucocoria. El término leucocoria, también denominada “ojo de gato”, literalmente significa “pupila blanca” del griego “leucos” (blanco) y “koré” (pupila), y es producida por el reflejo de la luz incidente sobre el tumor intraocular en vez de en la retina (Figura N°7A) (Balmer y Munier, 2007). Generalmente sólo puede verse en una determinada dirección de la mirada o bajo luz tenue, cuando la pupila está muy abierta, o habitualmente en una fotografía realizada con *flash*. Sin embargo, no siempre puede ser fácilmente observada en la exploración rutinaria del recién nacido o de un niño sano. En estos casos, cuando el tumor está visible, la enfermedad ya se encuentra en un estadio intraocular pero lo suficientemente avanzado como para que, generalmente, el tratamiento conservador no sea posible.

El segundo signo clínico más común de retinoblastoma es el estrabismo, una desalineación de los ojos que está asociada a un compromiso inicial de este tumor (Chantada et al, 1999 A) (Figura N°7B). Este fenómeno se da debido a que a medida que el tumor crece en el ojo del niño o de la niña, puede interferir con la visión, por lo que no hay un estímulo hacia el cerebro de mantener los ojos alineados. En consecuencia, el ojo enfermo se desvía hacia adentro (esotropía) o hacia fuera (exotropía). Sin embargo, cuando la enfermedad progresa, pueden aparecer otros síntomas como inflamación orbitaria, hifema o irregularidades en el iris o la pupila.

Los pacientes con retinoblastoma no suelen referir dolor, salvo que presenten un glaucoma secundario. Algunos niños con retinoblastoma no presentan ningún síntoma

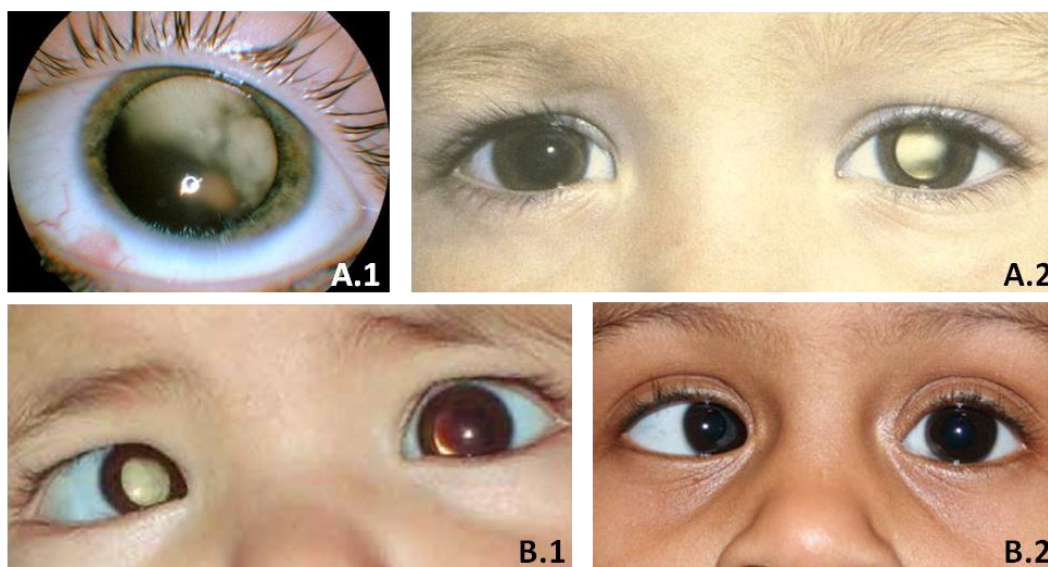


Figura N°7: Principales síntomas clínicos del Retinoblastoma

(A.1) Leucocoria (pupila dilatada). Puede verse la masa tumoral intraocular que da el reflejo blanco característico del retinoblastoma.

Fuente: Chantada y Rodríguez-Galindo, (2013), Chapter: *Retinoblastoma*. Memphis, TN, Estados Unidos: St. Jude Children's Research Hospital (Oncopedia – Cur4kids). Recuperado de: https://www.cure4kids.org/private/oncochap/ocrev_20/Onco_re4_chapter.pdf

(A.2) Leucocoria (foto con flash)

Fuente: Aerts et al. (2006). Review: Retinoblastoma. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 1(31).

(B.1) Estrabismo con leucocoria en ojo derecho.

Fuente: Manzitti J. y Mansilla M.C. (2010). Descripción del caso presentado en el número anterior: Retinoblastoma. *Arch Argent Pediatr*, 108(3):255-257.

(B.2) Estrabismo.

Fuente: American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus, (2014), *Strabismus*. San Francisco, CA, Estados Unidos: AAPOS HEADQUARTERS. Recuperado de <https://www.aapos.org/terms/conditions/100>.

El proceso diagnóstico no requiere de la realización de una biopsia, ya que los datos oftalmológicos son suficientemente específicos en la mayoría de los casos. La exploración es realizada bajo anestesia general por un oftalmólogo experimentado para poder valorar en profundidad ambos ojos y fotografiar y mapear los tumores; mediante una fundoscopia o fondo de ojo (Figura N°8). Generalmente, la fundoscopia bajo anestesia general sola hace posible el diagnóstico. En caso de retinoblastoma, la lesión aparece como un tumor blanquecino, con calcificaciones con una marcada dilatación angiomatosa de los vasos, como puede observarse en Figura N°8.

La ecografía orbitaria, la tomografía computarizada (TAC) o la resonancia magnética (MRI) también permiten valorar la extensión de la enfermedad intraocular y su posible diseminación extraocular (Apushkin et al, 2005). En algunas ocasiones, estas técnicas permiten detectar un tumor en la pineal o en la línea media intracraneal, fenómeno que se denomina retinoblastoma “trilateral”, el cual se presenta en 5 a 15% de los pacientes con la forma hereditaria del retinoblastoma. Esta forma, por lo general se presenta entre los 20 y 36 meses de vida (Kivelä, 1999; De Jong et al, 2014).

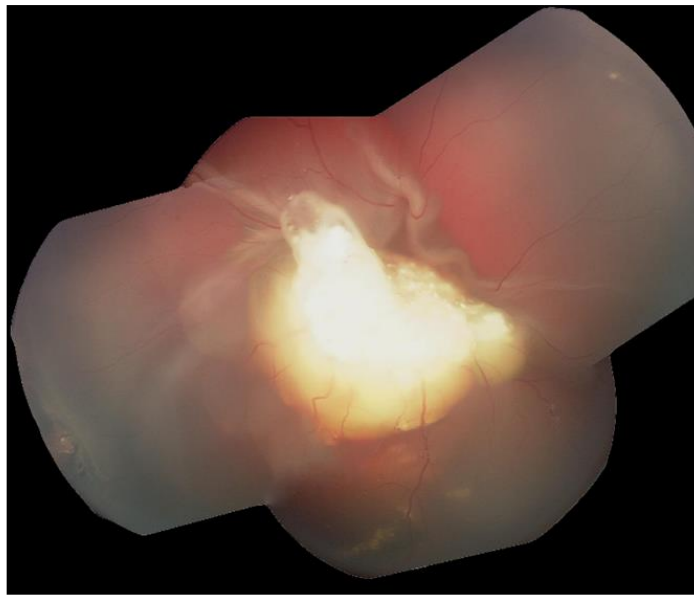


Figura N°8. Aspecto del tumor RB en una fundoscopia

Fuente: Gordon, William. Retinoblastoma with a stalk-like recurrence pattern, Oncopedia #317. Released on Oncopedia 08/18/2009.

URL: https://www.cure4kids.org/ums/oncopedia/case_detail/?id=317

Luego de que el retinoblastoma ha sido diagnosticado, se realizan estudios para determinar si ha habido diseminación tumoral dentro del ojo o hacia partes distantes del cuerpo. Para esto, suelen utilizarse las metodologías mencionadas anteriormente o, habitualmente la punción lumbar, la cual es utilizada para recoger LCR para comprobar si las células cancerosas se han diseminado fuera del ojo. Este proceso se denomina estadificación e indica el estadio en que se encuentra la enfermedad, lo cual es sumamente importante para planear el tratamiento más adecuado para el paciente.

El retinoblastoma puede ser intraocular, es decir que el tumor aún está contenido en el globo ocular, limitado a la retina o afectando al globo ocular completo, por lo que

no se ha extendido a la órbita o a zonas distantes del cuerpo. También cabe la posibilidad de que el tumor se haya diseminado fuera del ojo, constituyendo un retinoblastoma extraocular. En este caso, las células tumorales pueden estar confinadas en los tejidos que rodean al ojo, en la órbita; o puede que el retinoblastoma sea metastásico, es decir que se haya diseminado fuera del ojo, probablemente encontrándose en los tejidos circundantes; o afectando de modo típico al sistema nervioso central (cerebro o LCR), la MO y huesos o más raramente los ganglios linfáticos, como se mencionó más arriba (Gündüz et al, 2006).

Una vez que se tiene el diagnóstico de retinoblastoma, que se conoce el tamaño tumoral, la presencia de calcificaciones y el grado de diseminación, se procede a la indicación de los posibles tratamientos con el objetivo de disminuir el volumen tumoral intraocular, según sea el caso, como un intento de salvar la visión y el ojo. A este proceso se lo denomina terapia conservadora.

En caso de que el tratamiento conservador no tenga éxito o se considere que cuenta con muy bajas probabilidades de éxito debido a que el paciente se ha presentado al diagnóstico con un estadio muy avanzado de la enfermedad, con glaucoma o invasión del segmento anterior del ojo, el procedimiento obligado es la enucleación, cirugía mediante la cual el globo ocular y parte del nervio óptico son removidos. De esta manera, cuando no se ha podido controlar el crecimiento del tumor utilizando otras formas de tratamiento, la enucleación previene que el tumor se disemine fuera del ojo.

Cuando el globo ocular es removido, se coloca en su lugar un implante esférico hecho de polimetilmetacrilato (PMMA), a través del cual los vasos sanguíneos pueden desarrollarse dentro y alrededor del mismo, manteniéndolo en su lugar. Los músculos que ayudan a dar movimiento al ojo se suturan a este implante, permitiendo que la prótesis pueda tener movimiento. Luego de la cicatrización, se coloca una prótesis ocular, temporal, que posee la forma de un lente de contacto de mayor tamaño la cual se pinta para igualar al otro ojo. Después de la colocación final de la prótesis la mayoría de los pacientes se sienten satisfechos en cuanto a la manera en cómo se ven y refieren que, en ocasiones, otras personas no notan la presencia de la misma.

Luego de la enucleación, se procede a realizar un estudio patológico minucioso de la extensión o el grado de diseminación del tumor dentro del globo ocular. Para esto, han surgido distintos tipos de sistemas de estadificación que permiten hacerlo. Del mismo modo, también existen sistemas para la estadificación del retinoblastoma intraocular que se describen a continuación:

En caso de que el tumor sea intraocular y se intente una terapia conservadora, el sistema de estadificación clásico de referencia es el que formularon Reese y Ellsworth en el año 1969, el cual recibió el mismo nombre que sus creadores (R-E) (Ellsworth, 1969). Este sistema de clasificación se utiliza sólo cuando se desea preservar el ojo afectado y agrupa a los pacientes según el riesgo a perder la visión (a través de la pérdida del globo ocular), brindado por el estudio de la fundoscopia cuando reciben tratamiento con radioterapia externa. Por tal razón, en la actualidad ha sido sustituido por otro sistema de grupos, conocido como Sistema Internacional de Retinoblastoma Intraocular. La evaluación de la severidad de la enfermedad mediante este sistema está basada en el estudio de los siguientes parámetros: tamaño tumoral, número y localización de las lesiones y diseminación en vítreo (ver Tabla N°1). En caso de que el retinoblastoma sea bilateral, la evaluación se efectúa en cada ojo por separado.

Tabla N°1: Clasificación de Reese-Ellsworth

Grupo I – Conservación de la vista Muy favorable
• Ia Tumor único, < 4 DD* en o posterior al ecuador • Ib Tumores múltiples, ninguno > 4DD, todos en o posteriores al ecuador
Grupo II – Conservación de la vista Favorable
• IIa Tumor único, 4 – 10 DD, en o posterior al ecuador • IIb Tumores múltiples, 4 – 10 DD posteriores al ecuador
Grupo III – Conservación de la vista Posible/Dudoso
• IIIa Cualquier lesión anterior al ecuador • IIIb Tumores solitarios > 10 DD por detrás del ecuador
Grupo IV – Conservación de la vista Desfavorable
• IVa Tumores múltiples, algunos > 10 DD • IVb Cualquier lesión que se extienda anterior a la ora serrata
Grupo V – Conservación de la vista Muy desfavorable
• Va Tumores masivos que afecten a más de la mitad de la retina • Vb Siembras vítreas

*DD: Diámetros de Disco

El R-E demostró tener importancia pronóstica en el mantenimiento de la vista (preservación del ojo) y el control de la enfermedad local en un momento en que la

cirugía y la radioterapia externa eran las únicas opciones de tratamiento. Actualmente este sistema se considera importante para las decisiones que conciernen al uso de modalidades locales de tratamiento, por lo que ha sido el *gold standard* para el proceso de estadificación durante décadas (Ellsworth, 1969). Sin embargo, no ofrece un pronóstico preciso tras la estratificación de los riesgos asociados a los tratamientos más nuevos, como la quimiorreducción. Este motivo ha promovido el surgimiento de otros sistemas que utilizan la acumulación de datos para determinar la probabilidad de la sobrevida ocular luego de modalidades locales de tratamiento y quimiorreducción (Murphree, 2005; Ellsworth, 1969; Shields et al, 2004), intentando complementar la estadificación brindada por el sistema R-E.

Así, por ejemplo, se encuentra la clasificación internacional para el retinoblastoma intraocular (*International Intraocular Retinoblastoma Classification IIRC*) (Murphree, 2005). Este sistema de clasificación es más actual, está basado en la historia natural del retinoblastoma intraocular y divide lo en 5 grupos, nombrados de la A a la E (Tabla N°2), según las chances de salvar el ojo afectado utilizando las opciones actuales de tratamiento.

Tabla N°2: Clasificación internacional para el retinoblastoma intraocular

Grupos	Riesgo	Descripción
A	Muy Bajo	Ojos con tumores pequeños, delimitados y alejados de las estructuras críticas. RB tamaño ≤ 3 mm*, distancia ≥ 3 mm de la fovea y $\geq 1,5$ mm del nervio óptico. Sin siembras vítreas ni subretinianas.
B	Bajo	Ojos con tumores delimitados, de cualquier tamaño y localización sin siembras vítreas ni subretinianas. Retinoblastoma de cualquier tamaño o localización que no pertenezcan al grupo A. Sin siembras vítreas ni subretinianas. Se admite un pequeño manguito de líquido subretiniano de < 5 mm
C	Moderado	Ojos con siembras vítreas o subretinianas <u>focales</u>. Tumores delimitados, de cualquier tamaño y localización. Las siembras deben ser finas y localizadas de forma que sean susceptibles de ser tratadas con placas de braquiterapia. Se admite hasta un cuadrante de líquido subretiniano.
D	Alto	Ojos con siembras vítreas o subretinianas <u>difusas</u> o tumores masivos, no delimitados, endofíticos o exofíticos.
E	Muy Alto	Ojos destruidos por el tumor. Glaucoma neovascular irreversible. Hemorragia intraocular masiva. Celulitis orbitaria aséptica. Tumor anterior al límite anterior del vítreo. Tumor en contacto con el cristalino. Retinoblastoma infiltrante difuso. Ptisis o preptisis bulbi.

Todos estos sistemas son necesarios para la estadificación oftalmológica, no obstante no son muy útiles para la descripción del grado de extensión de la enfermedad extraocular, como base para la indicación de terapia adyuvante y la evaluación del impacto del tratamiento en la supervivencia del paciente.

Se han propuesto por lo menos cinco sistemas de estadificación para el retinoblastoma extraocular (Grabowski y Abramson, 1987; Abramson et al, 2000; Howarth et al, 1980; Pratt et al, 1997; Greene et al, 2002; Wolff et al, 1978), los cuales difieren muy poco en cuanto a los criterios de caracterización de las células tumorales que permanecen dentro del globo ocular enucleado o de las que se han diseminado fuera de él. No obstante, dos de estas clasificaciones (la de St. Jude y la *Tumor, Node, Metastasis* (TNM)) varían con respecto a los otros sistemas, ya que además tienen en consideración el grado de extensión de la enfermedad confinada a la retina y la posibilidad de salvar el ojo (Howarth et al, 1980; Pratt et al, 1997; Greene et al, 2002). Sin embargo las más ampliamente utilizadas son las propuestas por Grabowski-Abramson (la empleada en este trabajo) y la clasificación del Hospital St. Jude. Aún así, continúan existiendo muchas diferencias entre los distintos grupos en cuanto, por ejemplo, al modo de procesamiento de los ojos enucleados y especialmente en el número de cortes histológicos que deben realizarse.

Por este motivo, otro sistema de clasificación del retinoblastoma ha ido evolucionando para ofrecer una mayor precisión en la estadificación de esta neoplasia cuando se ha extendido fuera de la retina, incorporando el espectro completo de la enfermedad, tanto intra como extraocular. Es el llamado Sistema Internacional de Clasificación del Retinoblastoma (*International Retinoblastoma Staging System*) (Chantada et al, 2006 B), y fue propuesto en el año 2006 por un grupo de profesionales de diferentes países del mundo que conformaron el *International Retinoblastoma Staging Working Group* (IRSWG), en búsqueda de un sistema consensuado que pudiera ser ampliamente aceptado para su utilización en la clasificación de los pacientes con enfermedad avanzada intraocular que requieren enucleación y para aquéllos con retinoblastoma extraocular, debido a que ninguna de las clasificaciones que han sido propuestas han logrado aceptación internacional. Los criterios que conforman el Sistema Internacional de Estadificación clasifican a los pacientes según la extensión de la resección y la presencia de enfermedad clínicamente aparente (ver Tabla N°3).

Además, con el objetivo de determinar si la extensión de la invasión de las capas del ojo y el nervio óptico posee alguna implicancia pronóstica y terapéutica, este sistema también incluye un subsistema de estadificación que tiene en consideración a los factores pronósticos más comunes.

De esta manera, el pronóstico para la vista está basado en los nuevos sistemas de clasificación o el R-E, quedando el pronóstico para la sobrevida basado en el estudio de la extensión histológica de la enfermedad dentro de las capas del ojo o fuera de él. La información pronóstica requerida para la toma de decisiones terapéuticas estará disponible luego de que este sistema sea validado con su mayor uso.

Tabla N°3: IRSS. International Retinoblastoma Staging System

Estadio 0: Pacientes tratados de forma conservadora
Estadio I*: Ojo enucleado, resección histológicamente completa
Estadio II**: Ojo enucleado, restos tumorales microscópicos
Estadio III: Diseminación regional a. Órbita b. Ganglios preauriculares o cervicales
Estadio IV: Enfermedad Metastásica a. Metástasis Hematógenas 1. Única lesión 2. Múltiples lesiones b. Extensión a SNC (Con o sin otras metástasis) 1. Lesión prequiasmática 2. Masa en SNC 3. Enfermedad en LCR y/o leptomenígea

***, **Subclasificación extensión extrarretinal para retinoblastomas estadios I y II**

N0	Nervio Óptico (NO): libre
N1	NO: Invasión pre o intralaminar
N2	NO: Invasión más allá de la lámina criboides, margen quirúrgico libre
N3	Afectación del margen de resección y/o invasión subaracnoidea.
NX	Desconocido
C0	Coroides: Negativa
C1	Coroides: Afectación menor
C2	Coroides: Afectación masiva
S0	Esclera: No afecta
S1	Esclera: Invasión microscópica
S2	Esclera: Invasión que atraviesa y llega al espacio orbitario

En el presente trabajo se utilizó la clasificación clinicopatológica de Grabowski, Abramson (Tabla N°4 y N°4.1) para el retinoblastoma extraocular (Grabowski y Abramson, 1987). Para resumir, éste asigna el estadio I a aquellos pacientes con enfermedad intraocular, estadio II a los que presentan extensión orbital de la enfermedad, estadio III a los que presentan algún grado de invasión en el nervio óptico, estadio IV a los que poseen enfermedad metastásica (en sistema nervioso central) y estadio V a los que se presentan con metástasis hematológica.

Tabla N°4: Clasificación clínico-patológica de Grabowski-Abramson

I	Enfermedad Intraocular
A	Tumor de retina
B	Extensión al interior de la lámina cribosa
C	Extensión uveal
II	Enfermedad Orbitaria
A	Tumor orbitario
1	Células epiesclerales dispersas
2	Invasión orbitaria
B	Nervio óptico
1	Tumor más allá de la lámina pero no arriba del corte
2	Tumor que alcanza el corte del nervio óptico
III	Metástasis intracraneal
A	Solamente LCR positivo
B	Masa en SNC
IV	Metástasis hematológica
A	Sólo MO positiva
B	Lesiones focales de hueso con o sin MO positiva
C	Compromiso de otros órganos

Tabla 4.1 – Sistema de clasificación del Retinoblastoma extraocular de Grabowski-Abramson

I. Enfermedad Intraocular
a. Tumor en la retina.
b. Invasión de la coroides.
c. Invasión de la lámina cribosa.
d. Invasión de la esclera.
II. Enfermedad Orbitaria
a. Tumor orbital
Sospechoso (histopatología de células tumorales epiesclerales dispersas).
Confirmado (tumor orbital confirmado por biopsia).
b. Nódulos regionales positivos.
III. Enfermedad en Nervio Óptico
a. Extensión del tumor a través de la lámina pero no sobrepasa el límite de la sección quirúrgica del nervio óptico.
b. Tumor en el margen de la sección quirúrgica del nervio óptico.

IV. Metástasis intracranial

- a. Sólo líquido cefalorraquídeo positivo.
- b. Masa de células de retinoblastoma en cerebro.

V. Metástasis hematológica

- a. Lesiones positivas en médula ósea/hueso.
- b. Compromiso de otros órganos.

Hasta el momento, las distintas opciones de tratamiento dependen del estadio de la enfermedad, de la posibilidad de salvar la visión en uno o ambos ojos, el tamaño y la cantidad de tumor y si el retinoblastoma es trilateral. Sin embargo, como ya se comentó, no existe un marcador molecular que brinde sensibilidad y precisión en el pronóstico y, por lo tanto, que permita la asignación del verdadero riesgo individualizado, información de suma importancia a la hora de establecer un tratamiento. Es por este motivo, que se propone en este trabajo el estudio de la expresión de la GD2 sintasa como marcador de la presencia de la EMD en el LCR y del CRX en MO de pacientes con retinoblastoma.

PROBLEMÁTICA

El estudio y su contexto

El retinoblastoma es una enfermedad curable cuando su diagnóstico es temprano y es adecuadamente tratada. Sin embargo, cuando se ha diseminado fuera del ojo, el pronóstico es desalentador. En los países en desarrollo, principalmente América Latina, África, China e India (Vandhana et al, 2011) donde los sistemas educativos, socioeconómicos y de salud son limitados, el diagnóstico tardío y el cuidado subóptimo constituyen el escenario más común en cuanto a esta enfermedad (Chantada et al, 2009 B; 1999 A). Así, mientras en los países más desarrollados la preservación del globo ocular y la visión son prioritarios, la muerte debida al retinoblastoma sigue siendo un problema en los países en vías de desarrollo (Dimaras et al, 2010 A; Rodriguez-Galindo et al, 2008; Atchaneeyasakul et al, 2009; Ozdemir et al, 2007; Naseripour et al, 2009).

En la Argentina y otros países con similar grado de desarrollo socioeconómico, la sobrevida supera el 90% (Chantada et al, 2010); aún así los casos con invasión microscópica de las capas oculares que necesitan un tratamiento más intenso son comunes. Algunos de estos pacientes mueren a causa de la enfermedad extraocular luego de la enucleación si no reciben un tratamiento post-operatorio adecuado (Chantada et al, 2004 A).

Actualmente, el riesgo de recaída extraocular es evaluado mediante estudios histopatológicos del grado de invasión del tumor en las capas del ojo, tales como la coroides, la esclera y el nervio óptico y la indicación de la terapia adyuvante está basada en esta información. Sin embargo, existen varias controversias acerca del valor pronóstico de estos factores (Cuenca et al, 2009; Chantada et al, 2004 B; Cheung N.K. et al, 1997; Wilson et al, 2011).

Como se mencionó anteriormente, además del empleo de la fundoscopia para realizar el diagnóstico, también pueden utilizarse el ultrasonido, la MRI y la TAC para evaluar la potencial extensión extraocular del tumor. Por su parte, los métodos de

diagnóstico por imágenes como la TAC, se utilizan principalmente para evaluar la extensión intraorbitaria o intracraneal del retinoblastoma o la presencia de masas irregulares intraoculares, permitiendo, en los casos de recidiva tumoral, definir la localización y extensión del nuevo tumor. Sin embargo, al igual que los estudios histopatológicos utilizados de rutina para la evaluación de la EMD destinada a la determinación del pronóstico en el retinoblastoma, poseen una escasa sensibilidad (Lacroix y von Knebel Doeberitz, 2001). En los primeros casos, porque sólo permiten identificar tumores con un diámetro no menor a 3–5 mm (correspondiente a unas 10^8 células cancerosas), no alcanzando a detectar menores grados de diseminación, como la EMD, por lo que su capacidad para identificar pacientes en alto riesgo es muy limitada. Y en el caso de los estudios histopatológicos, porque también muestran una limitada capacidad para detectar los estadios de alto riesgo y aún detectándolos, no aseguran el verdadero valor pronóstico (Cheung N.K. et al, 1997).

Además, aún existen controversias acerca del valor pronóstico de la histopatología y la diversidad de criterios para la asignación del riesgo, lo cual no contribuye con la realización de estudios comparativos en cuanto a los tratamientos o estadificación de pacientes. En referencia a esto, como se mencionó anteriormente, el grupo denominado IRSWG propuso una guía consensuada para la definición de las características de alto riesgo y para el procesamiento de los ojos en el retinoblastoma, la cual está basada en artículos publicados previamente y la experiencia de expertos de todo el mundo. Si bien, todavía requieren de estudios clínicos prospectivos y otros tipos de evaluaciones para validar los criterios acordados en la guía, su aporte es muy significativo a la hora del pronóstico de la enfermedad (Sastre et al, 2009).

Sumado a esto, la administración de quimioterapia adyuvante es particularmente problemática en los pacientes con retinoblastoma, ya que debe tener una buena penetración al sistema nervioso central (Gündüz et al, 2006; MacKay et al, 1984), donde son más comunes las recaídas debido a su contigüidad a la órbita, además de serlo en hueso y MO, estando asociada con toxicidad en el corto y largo plazo (Chantada et al, 2004 B y 2003; Honavar et al, 2002). Además, hay hechos que hacen que la indicación de la terapia adyuvante sea particularmente problemática en el retinoblastoma, ya que estos pacientes presentan una mayor predisposición a padecer neoplasias secundarias

debido a la presencia de la mutación en la línea germinal del gen supresor de tumor, RB1 (Aerts et al, 2006).

Los pacientes

En el Hospital de Pediatría SAMIC Prof. Dr. Juan P. Garrahan, centro con mayor volumen de ingreso de pacientes oncológicos infantiles de la Argentina, recibe aproximadamente 30-35 pacientes con retinoblastoma anualmente. Esto constituye alrededor del 80% de los casos vistos en el país, contrastando con otras neoplasias, en las cuales un promedio del 30% es visto en el hospital. De ellos, aproximadamente el 30% tienen factores histopatológicos de alto riesgo (siembras en la cámara anterior, compromiso de la coroides, tumor más allá de la lámina cribrosa, hemorragia intraocular, o extensión esclerosa o extraesclerosa) (Chantada et al, 2004 B; Honavar et al, 2002). Por lo tanto, considerando que la tasa de recaída de los pacientes en alto riesgo es del 10%, sólo sería posible detectar un solo paciente con recidiva metastásica por año mediante las metodologías de *screening* ya mencionadas.

Ahora bien, el panorama de riesgos de recidiva luego de la enucleación, mediante determinación histopatológica, es el siguiente: por un lado, se encuentran los pacientes que presentan características de alto riesgo en el estudio histopatológico. De estos, hasta el 40% aproximadamente recaen si no reciben un tratamiento adyuvante adecuado a tiempo (Magrann et al, 1989). Afortunadamente, la aplicación intensiva del mismo, el cual incluye principalmente quimio y radioterapia, ha disminuido significativamente la posibilidad de estas recaídas en los últimos años (Chantada et al, 2007). El restante 60% de los pacientes con estas características, que posiblemente no vaya a recaer y para los cuales no existe una metodología precisa que logre identificarlos correctamente, recibe de igual manera el tratamiento adyuvante que generalmente está asociado a riesgos de toxicidad aguda y secuelas a largo plazo.

Por el otro lado, se encuentran aquellos pacientes con una histopatología de bajo riesgo, que habitualmente no reciben una indicación de terapia adyuvante. No obstante recaen en el 1-5% de los casos sin una razón aparente (Chantada et al, 1999 B), por lo que podrían haberse tratado si hubiesen recibido una indicación de terapia adyuvante

temprana. Ante esta situación, es posible afirmar que la capacidad de detectar pacientes de alto riesgo mediante factores histopatológicos es muy limitada, aunque actualmente es la única herramienta disponible para evaluarlos. De igual modo, el criterio de asignación del riesgo para estratificar el tratamiento en estos pacientes está basado en factores estadísticos, por lo que no es lo suficientemente preciso para predecir el riesgo de recidiva extraocular a nivel individual. Para hacer más visible esta situación, se plantea una gráfica representativa del gestionamiento del tratamiento de pacientes con retinoblastoma unilateral, según se muestra en la Figura N°9:

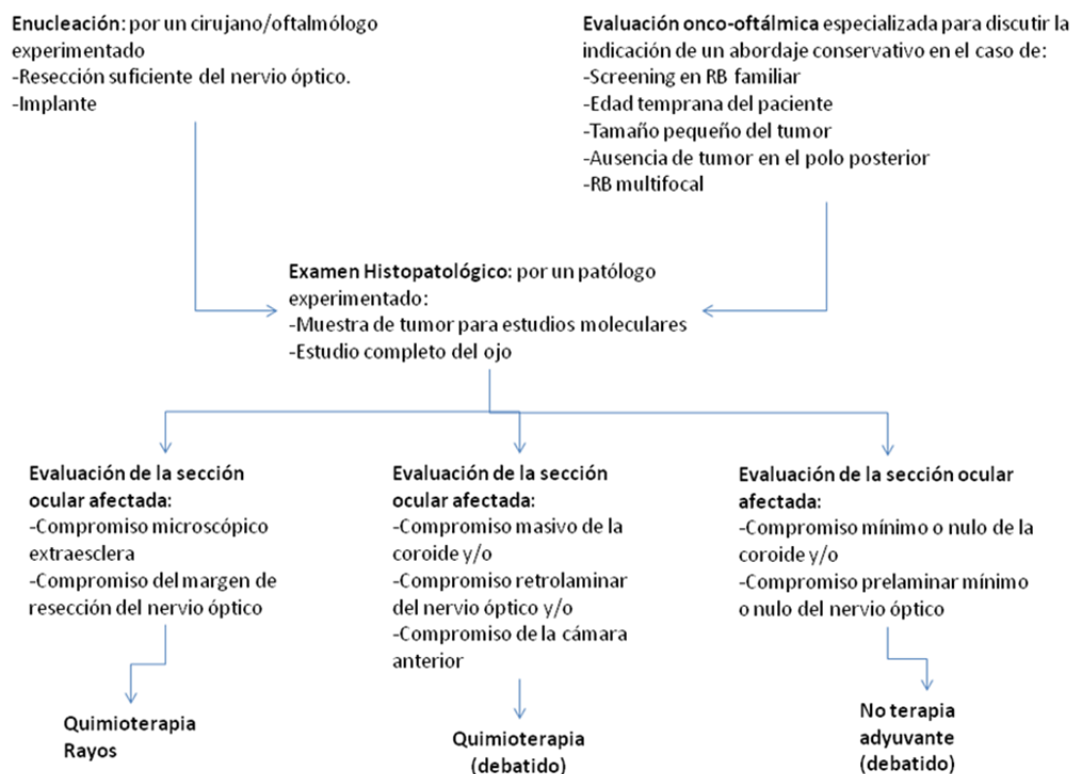


Figura N°9: Gestionamiento del tratamiento del Retinoblastoma unilateral.

Fuente: Adaptado de: Aerts I., Lumbroso-Le Rouic L., Gauthier-Villars M., Brisse H., Doz F., and Desjardins L. (2006). Retinoblastoma. Orphanet J Rare Dis, 1:31.

Medicina de precisión en el retinoblastoma

Como se mencionó al comienzo de este capítulo, la medicina de precisión o también denominada personalizada hace uso de la información genética como herramienta para conocer los requerimientos para el mantenimiento de la salud, prevenir

enfermedades y brindar tratamientos. El objetivo de la medicina de precisión es seleccionar el tratamiento más adecuado, con la dosis adecuada, para el paciente indicado y en el momento correcto (Personalized Medicine Coalition, 2014; Lohmann et al, 2013). Es por eso que la identificación y caracterización de marcadores moleculares, usados como indicadores de un cierto estado biológico, juega un rol importante en la medicina personalizada (Biomarkers Definitions Working Group, 2001; Jiang y Wang, 2010). Como se comentó al principio de este capítulo, los marcadores moleculares sirven como herramienta para el pronóstico de enfermedades, la predicción de la respuesta a un tratamiento, monitoreo durante el mismo, y la calidad de respuesta a este tratamiento. Por lo tanto, los marcadores moleculares tienen el potencial de sustentar decisiones clínicas desde el diagnóstico al pleneamiento del tratamiento, para mejorar las estrategias de individualización de la terapia, de manera de evitar el tratamiento excesivo o deficiente, los efectos secundarios asociados y aumentar la efectividad del pronóstico y costo.

En este sentido, un factor pronóstico para la supervivencia a largo plazo en el retinoblastoma es el estudio de la presencia de enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico, la EMD. Si en los pacientes en los que tras finalizar la terapia la EMR persiste o reaparece en MO, presentarían recaída clínica de forma invariable. En consecuencia, la investigación de la EMD sería de utilidad para esclarecer esta cuestión y poder asignar el verdadero riesgo en forma individualizada. La detección molecular de la misma mediante la técnica RT-PCR, técnica propuesta por primera vez por Smith y colaboradores para la detección de células circulantes en SP en melanoma en 1991 (Smith et al, 1991), empleando secuencias *target* específicas ha sido utilizada y propuesta para varios tipos de cáncer (Mocellin et al, 2006; Slade y Coombes, 2007) debido a su alta sensibilidad y especificidad.

Metodologías para la detección de la diseminación mínima.

Los métodos más comunmente utilizados para la detección de células tumorales son la inmunocitoquímica y la RT-PCR. Ha habido mucha investigación sobre las metodologías para la detección de células diseminadas o micrometástasis ocultas en pacientes antes de la aparición de las manifestaciones clínicas. Ciertamente, la

inmunohistoquímica ha sobrepasado el poder de detección o sensibilidad de la microscopía de campo claro tradicional, con un rango de sensibilidad de una célula tumoral en 10^4 a 10^5 células normales de MO (Osborne et al, 1989); sin embargo, su sensibilidad y especificidad son limitadas, y se ha reportado en varios estudios que el anticuerpo utilizado en la reacción inmunohistoquímica tiene una reacción cruzada con las células normales, disminuyendo relativamente su valor pronóstico (Diel et al, 1992; Rouzier et al, 2001; Giljer et al, 2014).

La MO es un órgano muy heterogéneo a nivel celular y ha sido el compartimiento biológico más comunmente estudiado para la evaluación del compromiso metastásico por células diseminadas en varios tipos de cáncer (Pantel y Alix-Panabie`res, 2014, Gilje et al, 2014). Esto es, probablemente, debido a su fácil acceso para toma de muestras, a modo de “biopsia líquida”, que permite obtener información de utilidad para evaluar el pronóstico individual, realizar la estadificación del riesgo, y para poder tomar decisiones terapéuticas más acertadas. La importancia del estudio de la MO, radica en que la presencia de células tumorales diseminadas en este sitio ha sido correlacionada con un mal pronóstico (Aguirre-Ghiso, 2007), ya que las mismas generalmente derivan en una metástasis ósea letal (Jemal et al, 2008). Aunque aún no se conoce a ciencia cierta el mecanismo por el cual ocurre, se piensa que las células tumorales diseminadas pueden derivar en metástasis clínicamente evidentes (Schmidt-Kittler et al, 2003) que llevan a la recurrencia de la enfermedad aún luego del tratamiento. Hay cada vez más evidencias que sustentan la idea de que este comportamiento de las células tumorales es dependiente de su microambiente circundante. Esto sugiere que el microambiente en los tejidos distantes, tales como el hueso, es esencial para la supervivencia y el crecimiento metastásico de las células tumorales diseminadas. No obstante esto, las células tumorales diseminadas no son pasivas en la MO, sino que también ellas ejercen presiones sobre lo que las rodea para crear microambientes más ventajosos. A esto se le llama nicho metastásico (Shiozawa et al, 2015).

También es comunmente utilizada la SP por su fácil acceso para el estudio de las células tumorales circulantes. La SP sería la herramienta ideal para el screening o monitoreo de la diseminación; sin embargo, su baja tasa de detección ha sido un problema en cáncer de mama y otros tipos de cáncer (Datta et al, 1994). Una cuestión

importante a tener en cuenta es si la liberación de células tumorales al torrente sanguíneo es un proceso continuo o esporádico (quizás hasta con un ritmo circadiano). No se conoce la tasa diaria de liberación de células tumorales desde el tumor primario en pacientes oncológicos; aunque Jonathan Uhr y colaboradores, estimaron el tiempo de vida media de las células tumorales circulantes en cáncer de mama, en un rango de 1 a 2.4 horas (Meng et al, 2004). En principio, la detección de las células tumorales circulantes en sangre proveerían información sobre las células metastásicas derivadas de varios sitios distantes, mientras que las células tumorales diseminadas detectadas en médula sólo reflejarían la situación en ese órgano. Sin embargo, la MO es un reservorio para las células tumorales siendo estas células diseminadas un reflejo de la historia de la diseminación tumoral durante un extendido periodo de tiempo, mientras que las células tumorales circulante en sangre representan sólo una fotografía en un momento dado de tal diseminación (Pantel y Alix-Panabières, 2014).

Por su parte, el LCR es un compartimento importante aunque poco comprendido del SNC, que actúa como un “sumidero biológico” para las neuronas y las células gliales. Se produce de manera continua y se recicla tanto como la sangre o la linfa, aunque nunca es filtrado (Patel et al, 2011). La habilidad de detectar y caracterizar las células malignas en el LCR derivadas de tumores primarios neurales o extraneurales permitiría dar respuesta a cuestiones fundamentales acerca de la biología de la diseminación metastásica a través de la identificación y caracterización de poblaciones de células tumorales con la capacidad de infiltrar el LCR. Las células tumorales pueden alcanzar el LCR a través de varios mecanismos tales como la diseminación hematogena, la diseminación directa desde el mismo tumor, o por migración a través de los espacios perineurales o perivasculares (Chamberlain, 2008; Mammoser y Groves, 2010; Weston et al, 2011). Mejorar la detección de las células malignas en el LCR también es clínicamente imperativo, ya que las técnicas de diagnóstico actuales poseen baja sensibilidad, lo que resulta en la demora del diagnóstico hasta que los síntomas relacionados a la enfermedad son marcados e irreversibles y las opciones terapéuticas son limitadas o inexistentes. En una revisión realizada por Chamberlain y colaboradores, se describen los tres principales métodos para la detección de metástasis leptomeníngea y diseminación de células tumorales al LCR: citología del LCR, estudio neurológico, e imágenes por radiografía del neuroeje (Chamberlain et al, 2009). Si bien todas estas técnicas pueden ser utilizadas para el diagnóstico de la metástasis

leptomeningea, todas ofrecen limitaciones y generalmente sólo detectan la presencia tumoral de manera tardía en el curso de la enfermedad. La citología del LCR, en la cual el LCR es preparado y examinado bajo microscopio para poder observar las células, es actualmente considerada el *gold standard* para el diagnóstico de la metástasis leptomeningea. Aunque es altamente específica (> 95%), carece de sensibilidad (< 50%) (Chamberlain et al, 2010). Con este método no hay cuantificación o caracterización de las células metastásicas y por lo que los clínicos deben evaluar el estado binario de ausencia o presencia de células malignas según la citología (Glantz et al, 1998). Éste es el *gold standard* pero carece de análisis molecular y sensibilidad, generalmente requiriendo una repetición del testeo o análisis con mayor volumen (Chamberlain et al, 2009).

Otro abordaje con vistas a mejorar la sensibilidad de la detección celular de las células tumorales es utilizar el método de la PCR para amplificar material genético específico de las células cancerosas. Más comúnmente, se investiga la retrotranscripción acoplada a la PCR (RT-PCR) como método para evaluar el ARN encontrado en el LCR. Presenta la ventaja de permitir la amplificación de pequeñas cantidades de ARN a una muestra mayor de ADNc; por lo que se necesitan sólo unas pocas células neoplásicas en el LCR. Sin embargo, la mayor limitación de la RT-PCR es que se debe contar con el par de primers adecuados. Pero a pesar de esto, esta metodología ha sido utilizada exitosamente para la detección de metástasis leptomeningea a partir de una variedad de fuentes primarias de cáncer (Weston et al, 2011). Por ejemplo, la RT-PCR para la mamaglobulina humana ha mostrado gran sensibilidad, mayor que la citología (pudiendo detectar 1 célula maligna en 10^6 normales) y ha sido utilizada con éxito para el diagnóstico de metástasis leptomeningea en pacientes con cáncer de mama (Dono et al, 2009).

La identificación inequívoca y precisa, y la caracterización de las células circulantes en sangre o de las células diseminadas en MO requieren metodologías extremadamente sensibles y específicas tales como las basadas en inmunomarcaciones, como la inmunocitoquímica o las metodologías basadas en PCR. Los ensayos basados en PCR se han vuelto la alternativa más masivamente utilizada a los ensayos inmunocitoquímicos; y son la herramienta eje de este trabajo, por lo que se comentan sus generalidades en el siguiente apartado.

Generalidades de la reacción en cadena de la polimerasa

Las técnicas basadas en la PCR (Figura N°10) permiten obtener información genética a través de la amplificación específica de secuencias de ácidos nucleicos a partir de un número reducido de molde *target* de partida. Estas reacciones de amplificación están caracterizadas por una amplificación logarítmica de las secuencias *target de ADN o ADNc*, por lo cual al comienzo de los ciclos de amplificación se obtiene un aumento exponencial del número de copias, para seguir luego por un plateau con una rápida disminución hasta cero del incremento del número de copias por ciclo. Al final de la reacción de PCR, se tendrá como resultado a la secuencia específica acumulada en billones de copias (amplicones). Por lo tanto, la cantidad de amplición o producto específico amplificado, al final de la corrida no guarda una correlación directa con el número de molde *target* presente en la muestra original. Sin embargo, muchas aplicaciones en medicina o investigación requieren la cuantificación absoluta o relativa del número del *target* específico en la muestra, de manera de poder tanto estudiar la reacción de una célula o población células a un estímulo, como también comparar el perfil génico de diferentes muestras. La importancia fundamental de los métodos de cuantificación de la expresión génica en la investigación básica, farmacogenómica y diagnóstico molecular continúa dirigiendo los esfuerzos hacia el mejoramiento de las metodologías actuales como hacia el desarrollo de nuevas tecnologías.

En este sentido, la PCR en tiempo real o qPCR (del inglés, *quantitative PCR*) es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos de amplificación con una señal de intensidad de fluorescencia a medida que se va acumulando. De esta manera, mediante el monitoreo de la reacción durante la fase exponencial de la amplificación, ya sea de manera relativa o absoluta (Ginzinger, 2002). En la PCR tradicional (*end-point* o a punto final), tanto la detección como la cuantificación de la secuencia amplificadaes son realizadas una vez finalizada dicha reacción luego del último ciclo de PCR, e involucra análisis pos-PCR tales como electroforesis en gel y análisis de imagen. Las ventajas de la qPCR incluyen una reducida probabilidad de variabilidad y contaminación, buena reproducibilidad, su mayor rango dinámico de detección y que, además de poder observar en tiempo real el aumento del *target* amplificado en cada ciclo, la amplificación y detección ocurren en un mismo tubo, lo que elimina la manipulación post-PCR.

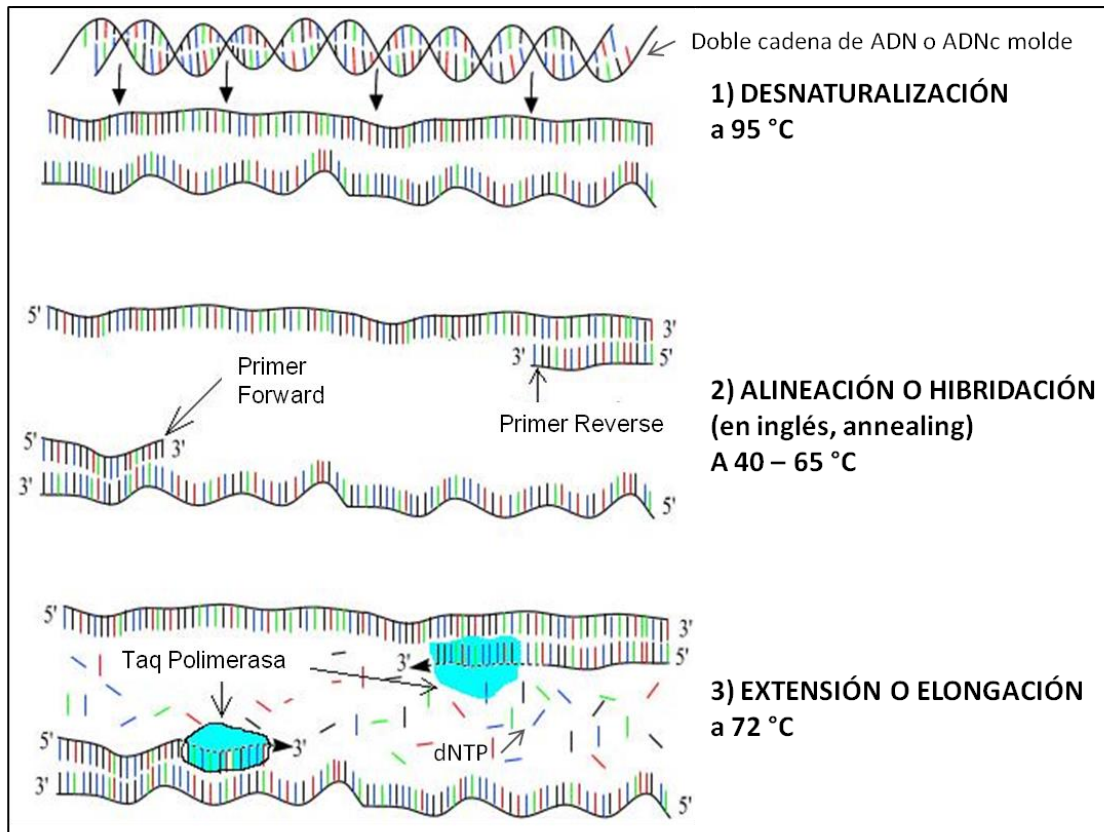


Figura N° 10. Esquema representativo de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). En el primer paso de desnaturalización, calentando el sistema de reacción (compuesto por básicamente por: desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), Mg_2 , la enzima Taq Polimerasa, Primers específicos, molde de ADN o ADNc), a unos 95 °C por 30 s – 2 min, se separa la doble hélice de ADN en dos hebras simples, quedando disponibles para la hibridación con los primers específicos. Así es que en el segundo paso de alineación o hibridación (o *annealing*), los primers específicos se hibridan en su secuencia complementaria en cada una de las hebras a 40 – 65 °C por 30 s – 2 min. Luego, en el tercer paso, ocurre la elongación a partir de la doble cadena generada por la hibridación primer-molde, a cargo de la enzima Taq Polimerasa a 72 °C por 1 – 2 min. A esta secuencia de tres pasos se la denomina “ciclo de amplificación”. La reacción de PCR consistirá, tradicionalmente, de aproximadamente 40 de estos ciclos. Así, al finalizar la corrida de PCR, la secuencia amplificada (contenida o flanqueada por ambos primers), también denominada “amplicón”, quedará acumulada en millones de copias, ya que el número de amplicones aumenta exponencialmente hasta que se agota el sistema de reacción.

Fuente: Modificado de: File:PCR Steps.JPG, autor: Tinojasontran. Libre licencia de uso
 Disponible en Wikimedia commons https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PCR_Steps.JPG

La reacción de PCR comienza a generar copias de la secuencia target de manera exponencial. Es sólo durante la fase exponencial de la reacción de PCR que es posible hacer una extrapolación para determinar la cantidad de secuencia target de partida en la muestra original. Debido a inhibidores de la reacción de la polimerasa presentes en la muestra, la limitación de reactivos, la acumulación de moléculas de pirofosfato, y fenómenos de *self-annealing* del producto que se va acumulando, la reacción de PCR

eventualmente cesa la amplificación de la secuencia *target* de manera exponencial, produciéndose un efecto *plateau*, como se mencionó más arriba, y haciendo que la cuantificación a punto final de los productos de PCR no sea confiable. Éste es la característica de la PCR tradicional que hace a la qPCR tan necesaria. Es por esto que por la necesidad de una cuantificación robusta, se desarrolló la técnica de qPCR, mientras que la PCR tradicional se utiliza hoy en día mayormente para la amplificación de ADN para secuenciación, clonado o para su uso en otras técnicas de la biología molecular (Real-Time PCR Handbook, (s.f)).

Debido a que en la actualidad el diagnóstico de pacientes con cáncer se basa en la utilización de técnicas que detectan masas tumorales ya establecidas, ya sean tumores primarios o metástasis, por su parte, las técnicas de detección moleculares permiten la detección de células malignas disgregadas; es decir, previo a la consolidación de una masa tumoral (Slade y Coombes, 2007). Esta característica no sólo les confiere una alta sensibilidad, sino que las convierte en estrategias indicadas para la determinación de la EMD.

Los marcadores moleculares propuestos

La beta-1,4-N-acetilgalactosaminil transferasa 1 (B4GALNT1) o, simplemente, GD2 sintasa (EC 2.4.1.92), como la llamaremos en este trabajo (aunque posee otras varias denominaciones), es una enzima de transmembrana tipo II de un solo paso de 533 aminoácidos, cuya principal actividad es la transferencia del grupo GalNAc sobre los gangliósidos precursores GM3, GD3 y lactosilceramida (LacCer) mediante enlaces de tipo beta-1,4 para dar síntesis a los gangliósidos GM2, GD2 y Asialo-GM2 (GA2), respectivamente (Furukawa et al, 1996; Yamashiro et al, 1995). En la Figura N°11 que se muestra en la página siguiente se representa de manera resumida los sitios dentro del metabolismo de los esfingolípidos, en dónde esta enzima cumple su función catalítica.

Su topología característica, al igual que la mayoría de las glicosiltransferasas, es la membrana del aparato de Golgi (Jaskiewicz y col., 1996), a través de la cual se ubica dejando una cola corta N-terminal hacia el citoplasma, una región transmembrana que contiene una región de anclaje y un extremo C-terminal en el cual contiene el dominio

catalítico que se extiende hacia el lumen de las cisternas del Golgi (Paulson y Colley, 1989).

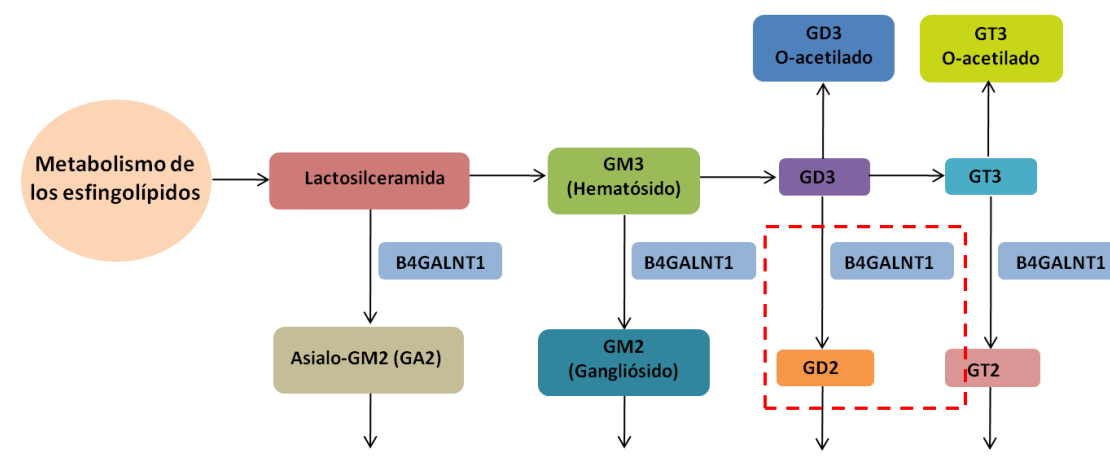


Figura N°11: Esquema resumido de la ruta metabólica de los esfingolípidos. Pueden verse los diversos sitios en los que la enzima GD2 sintasa (B4GALNT1), está involucrada. En este trabajo, en particular, se evaluó la expresión de la enzima y de su producto GD2, como se observa en el cuadro punteado.

Fuente: Tomado y adaptado <http://www.genecards.org/>

Se encuentra codificada en el gen que está ubicado en el locus 13.3 del brazo largo del cromosoma 12 y se expresa comúnmente en algunos tejidos normales, tales como el cerebral y en varios tipos tumorales como el neuroblastoma, cáncer de colon, carcinoma mamario, de pulmón, astrocitoma y melanoma (Sugita et al, 2002). Fue clonada por primera vez en 1992 por Nagata y colaboradores (Nagata et al, 1992).

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico, presentes en gran cantidad en las células ganglionares del sistema nervioso central, especialmente en las terminaciones nerviosas. Constituyen el 6% de los lípidos de membrana de la materia gris del cerebro humano y se hallan en menor cantidad en las membranas de la mayoría de los tejidos animales no nerviosos expresados en la membrana celular, principalmente de cerebro. Están involucrados en varias funciones biológicas tales como adhesión celular, interacciones intercelulares y proliferación. (Lloyd y Furukawa, 1998). Alteraciones específicas en la expresión de los gangliósidos luego de la transformación neoplásica, las cuales probablemente estén involucradas en el fenotipo metastásico de las células malignas (Cheresh et al, 1986; Yates et al, 1979), han sido encontradas particularmente en tumores de tejidos derivados de la cresta neural (Cheung et al, 2003).

Actualmente existen evidencias que demuestran que los niveles de metabolitos esfingolipídicos biológicamente activos y de enzimas del metabolismo de los esfingolípidos se encuentran alterados en el cáncer, por lo que la vía metabólica de los mismos estaría involucrada en la patogénesis y progresión tumoral (Dyatlovitskaya y Kandyba, 2006).

La GD2 sintasa demostró ser un marcador molecular muy útil en el neuroblastoma (Cheung et al, 2003; Hoon et al, 2001), un tumor pediátrico muy incidente derivado del neuroectodermo que, por lo tanto, comparte ciertas características fenotípicas con el retinoblastoma (Hoon et al, 2001), y en el cual este marcador es actualmente muy utilizado inclusive como blanco molecular para la inmunoterapia con anticuerpos monoclonales anti-GD2. El disialogangliósido GD2, en particular, es un antígeno glicolipídico que está altamente expresado en tumores tanto pediátricos como adultos, incluyendo el neuroblastoma, retinoblastoma, melanoma, tumores de cerebro, sarcomas y cáncer de pulmón de células pequeñas (Modak y Cheung, 2007). Además, se conoce por ensayos inmunológicos en suero de pacientes que el gangliósido GD2 es liberado por las células tumorales de retinoblastoma (Portoukalian et al, 1993), y que también ha sido hallado en las células metastásicas en la MO en pacientes con retinoblastoma (Chantada et al, 2006 A). Debido a que el mayor obstáculo para la detección de la EMD en el retinoblastoma ha sido la falta de marcadores moleculares asociados a tumor que permitan su utilización para la detección de la enfermedad extraocular, se propuso al inicio del presente trabajo estudiar el ARN de la GD2 sintasa como candidato para la detección de la EMD en el retinoblastoma.

Si bien la GD2 sintasa ha sido ampliamente utilizada en varios tipos de cáncer, hoy en día su uso es más limitado debido a que también se ha detectado su expresión en células normales; esto limita especialmente su especificidad en los compartimientos biológicos de alta celularidad tales como la MO (Beiske et al, 2009; Stutterheim et al, 2008; Martinez et al, 2007). Es por esto, que se ha avanzado en el estudio de marcadores moleculares alternativos más específicos que prometen una detección de la enfermedad diseminada más acertada, como ha sucedido en el neuroblastoma (Burchill et al, 2017). En este sentido, más recientemente, un marcador molecular específico de linaje celular, el CRX, un factor de transcripción tipo OTX con caja homeobox que es crítico para el desarrollo y diferenciación de los fotorreceptores, por lo que es expresado

tanto en conos como en bastones de la retina y ha sido reportado también en el retinoblastoma (Boatright et al, 2001; Glubrecht et al, 2009; Santagata et al, 2009; Terry et al, 2012; Xu et al, 2009). La metodología basada en PCR, la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) con retrotranscripción previa (RT-qPCR) para la la evaluación del ARNm del CRX ofrece una gran sensibilidad a la vez que una alta especificidad ya que el mismo sólo es expresado por células de origen retiniano (Glubrecht et al, 2009). Dado que el retinoblastoma deriva de precursores de células retineanas, el poder contar con marcadores de expresión génica linaje-específicos de estos, sería de gran utilidad para la detección de células tumorales en tejidos no vinculados al ojo, es decir, extraocularmente.

En la Figura N°12 puede verse una imagen descriptiva de la expresión de CRX en humanos basada en datos de bases de datos de las plataformas GTEx, BioGPS, Illumina Human BodyMap, y SAGE, con SAGE-tags de CGAP disponible en la web site de <http://www.genecards.org/>. Si bien, se ve que hay una expresión basal en varios tejidos, es predominante en retina normal, como se puede observar en la primer columna correspondiente a los datos de Microarray.

Así, según HIPED (del inglés, *Human Integrated Protein Expression Database*) que es una base de datos unificada de abundancia proteica en tejidos humanos dentro de GeneCards (basada en fuentes de datos de proteómica - ProteomicsDB, MOPED, PaxDb, MaxQB - basada en espectrometría de masa disponibles públicamente, integrando datos de 69 entidades anatómicas normales (tejidos, células, fluidos) y 125 líneas celulares), se puede ver en la Figura N°13 que la proteína resultante, producto de la expresión del gen de CRX, se encuentra únicamente en retina, indicando que es específica para la funcionalidad de ese tejido.

El CRX provoca la activación de varios genes en los fotorreceptores (conos y bastones), siendo fundamental para la diferenciación celular de ambos y para el mantenimiento de las vías regulatorias de la transcripción durante el desarrollo de la retina normal. Dado que su expresión está restringida a los precursores de los fotorreceptores y es de relevancia en la funcionalidad del linaje celular retiniano, a la vez que ya había sido probada su expresión en el retinoblastoma, se propuso al CRX como marcador molecular no sólo para la evaluación del diagnóstico, sino también para

la determinación del EMD. El CRX, también es conocido por los siguientes alias: Cone-Rod Homeobox, Orthodenticle Homeobox, CORD2, LCA7, OTX3, CRD (www.genecards.org); pero nos referimos a él en este trabajo como en su versión corta de Cone-Rod Homeobox, CRX.

mRNA expression in normal human tissues for CRX Gene ?

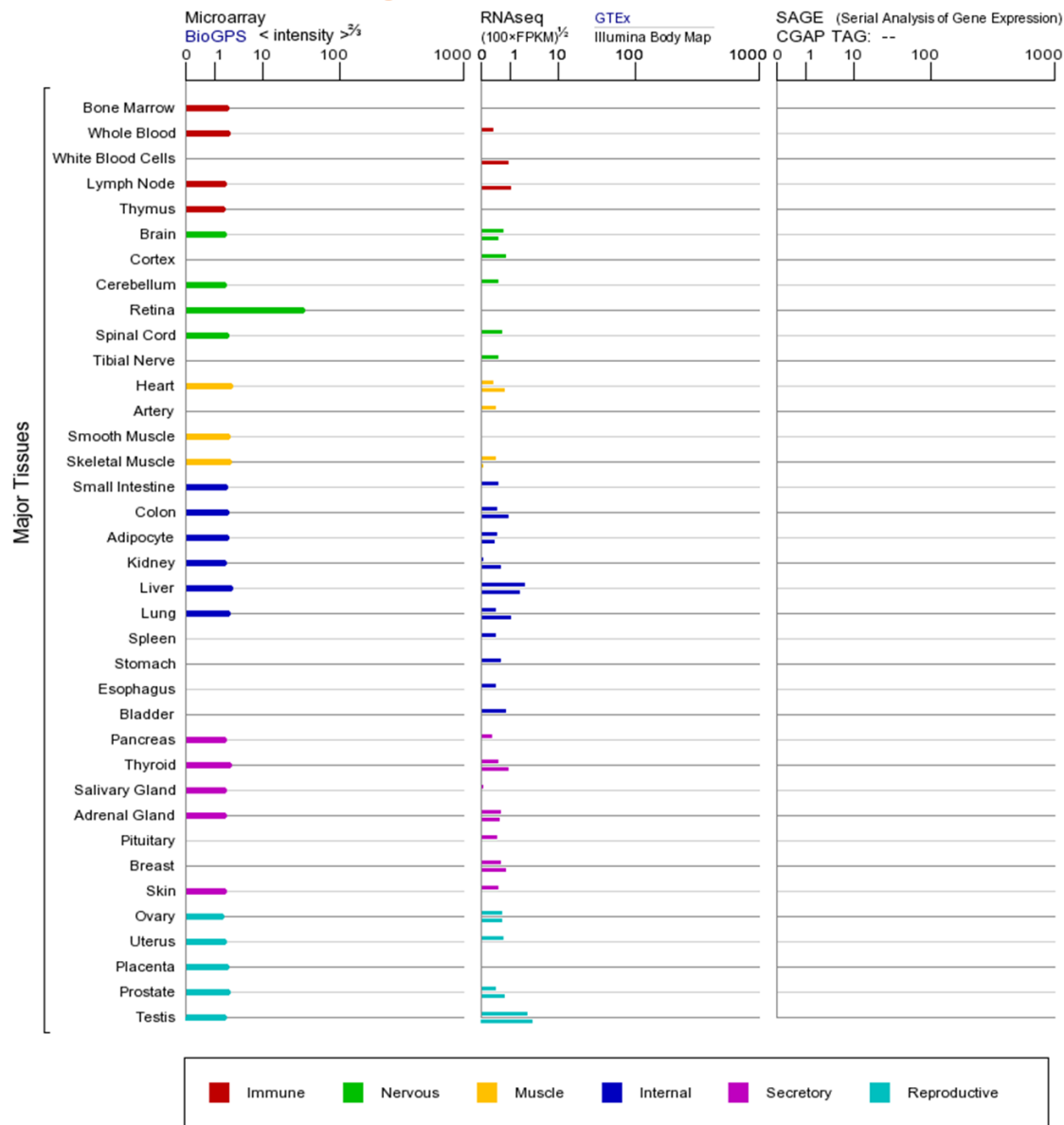


Figura N°12: Expresión del ARNm del gen CRX en tejido humano normal. Puede verse que la mayor expresión del ARNm del CRX se da en la retina. Los tejidos y compartimientos anatómicos están coloreados según 6 categorías - Immune (rojo), Nerviosa (verde), Muscular (amarillo), Interna (azul), Secretora (violeta) y Reproductiva (turquesa). Las intensidades normalizadas están descriptas en una escala de raíz, que es un intermedio entre log y escalas lineales. Los valores no son comparables entre los conjuntos de datos (es decir, entre Microarray, RNAseq y SAGE).

Fuente: Tomado de <http://www.genecards.org/>



Figura N°13: Expresión de la proteína del gen CRX en tejido normal y líneas celulares de las bases de datos de ProteomicsDB, PaxDb, y MOPED. Puede verse que el producto proteico de CRX se expresa exclusivamente en la retina. Los tejidos y compartimientos anatómicos están coloreados según 6 categorías: Sangre-Immune (rojo), Nerviosa (verde), Musculoesquelético (amarillo), Interna (azul), Secretora (violeta) y Reproductiva (turquesa). Los datos fueron normalizados de la siguiente manera: Para cada muestra, se calculó el valor de la proteína en ppm, en caso de que no fuese proveído por la fuente de los datos. Para cada muestra proveniente de MaxQB y ProteomicsDB, los valores de expresión por el método de iBAQ (intensity-based absolute quantification, es un indicador de los niveles de abundancia de proteínas) fueron divididos por la suma de los valores de cada muestra, y multiplicados por 1,000,000. Para todas las muestras, se juntaron los datos centrados en el gen mediante la sumatoria de los valores de expresión de todas las isoformas de cada gen. Para una mejor visualización del gráfico, los valores de expresión fueron expresados en escala de raíz, la cual es un intermedio entre la escala logarítmica y la lineal, como se utilizaron en los gráficos de expresión de ARNm.

Fuente: Tomado de <http://www.genecards.org/>

MATERIALES Y MÉTODOS

Introducción

En el presente trabajo se llevó a cabo:

- A) En primera instancia, el estudio de la EMD en muestras de LCR citológicamente negativos de pacientes con retinoblastoma de alto riesgo mediante la detección del ARNm de la GD2 sintasa por RT-PCR cualitativa y Nested-PCR.
- B) Seguidamente, la evaluación mediante RT-qPCR del ARNm del CRX como marcador molecular específico de linaje para casos de retinoblastoma metastásico y su uso como herramienta para el mejoramiento de la precisión del diagnóstico y la evaluación de la respuesta al tratamiento mediante el estudio de la EMD en la MO.
- C) Y, por último, el estudio del uso combinado de la RT-qPCR del ARNm del CRX junto con la inmunocitología del GD2 como marcadores de la EMD en casos de retinoblastoma no metastásico con el propósito de corroborar la posibilidad de evidenciar a la EMD en los casos con enfermedad considerada clínicamente intraocular, y de determinar un subgrupo de pacientes con retinoblastoma intraocular con un mayor riesgo de diseminación de la enfermedad.

A continuación se describen de manera general los materiales y las metodologías que fueron utilizadas para la realización de este trabajo y que forman parte común de todos los ejes principales de estudios enumerados arriba, seguido de las metodologías concernientes a cada uno de los capítulos en particular, nombrados como A), B) y C).

Materiales y Métodos generales

Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares de RB humano Y79 y WERI-Rb1 para la obtención de ARN total y su posterior utilización como molde para la RT seguida de la PCR a punto final y RT-qPCR en tiempo real. Las Y79 y las WERI-Rb1 fueron cultivadas en suspensión en medio RPMI 1640 (Gibco BRL) con 20% ó 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Internegocios S.A., Buenos Aires), respectivamente. Fueron mantenidas a 37°C con 5% de dióxido de carbono y en apropiadas condiciones de humedad, con cambio de medio de cultivo una o dos veces por semana. El medio de cultivo fue suplementado (por litro) con 2.5 g de glucosa, 2.38 g de HEPES, piruvato de sodio 1 mM, 1.5 g de bicarbonato de sodio, según las especificaciones del proveedor (ATCC).

Inmunocitología para el gangliósido GD2

En MO. La metodología empleada para la inmunociología de las MO, se llevó a cabo en el Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan como técnica de rutina para el estudio de células diseminadas en casos de alto riesgo. La inmunocitología para GD2 en las muestras de MO fue llevada a cabo por una microscopía de fluorescencia indirecta estándar usando el anticuerpo 3F8 (El anticuerpo monoclonal 3F8 anti-GD2 fue gentilmente provisto por el Dr. Nai-Kong V. Cheung (Memorial Sloan-Kettering, NY, EE.UU) en acuerdo con los procedimientos publicados (Portoukalian et al, 1993) como se detalla a continuación: Se fijan células mononucleares (CMN) previamente purificadas de aspirados de MO con un gradiente de Ficoll y luego incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-GD2 (3F8). Después de la incubación, las células que teñidas positivamente con el anticuerpo GD2 pueden ser contadas por microscopía, relativas al número total de CMN.

En LCR. La expresión del gangliósido GD2 fue evaluado por la técnica estándar de microscopía fluorescente indirecta. Brevemente, se obtuvo el pellet de células luego de la centrifugación de la muestra del LCR, y se incubó por 20 min con 10 µl del 3F8. Luego se lavó el pellet e incubó con 10 µl de inmunoglobulina de conejo anti-ratón

conjugada con FITC (F0313, marca Dako) durante otros 20 min. Se lavó y resuspendió las células en PBS para verlas luego en el microscopio de fluorescencia.

Declaración de ética

Al momento de la admisión, todos los padres/tutores responsables firmaron un consentimiento informado permitiendo el uso de muestras y datos clínicos para investigación. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética institucional del Hospital J.P. Garrahan y todos los procedimientos fueron llevados a cabo bajo los estándares éticos de la Declaración de Helsinki.

Almacenamiento y procesamiento de las muestras clínicas

Las muestras tanto de pacientes con retinoblastoma como de pacientes con enfermedades no emparentadas al retinoblastoma (usadas como control negativo) fueron obtenidas y almacenadas de la misma manera. Las muestras de pacientes que se utilizaron en este trabajo fueron obtenidas del Banco de Tumores del Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. Prof. Dr. Juan P. Garrahan de la Ciudad de Buenos Aires. Por otro lado, las muestras de MO de pacientes con retinoblastoma de bajo riesgo fueron enviadas desde el Hospital Infantil de México a cargo del Dr. Marco Ramírez, donde fueron almacenadas respetando el mismo procedimiento. El protocolo de evaluación de MO y LCR en México incluye a todos los pacientes con retinoblastoma, contrario al protocolo local en el Hospital Garrahan.

Desde Mayo de 2007 a Mayo de 2012, la metodología para el almacenamiento de las muestras de pacientes, tanto de LCR, SP como de MO, consistió en guardar 3 ml de LCR/SP ó 2 ml de MO en un buffer de tiocianato de guanidinio (TCG) 6 M en una relación 1:1.5 muestra/buffer (concentración final 4M) (Chomczynski and Sacchi, 1987) para los estudios por PCR. El buffer contenía TCG (Promega) 6 M, citrato de sodio 0.0375 M y lauroilsarcosin 0.75%. Una vez colocada la muestra en contacto con el TCG, seguidamente se agitó gentilmente por inversión para facilitar el contacto de la muestra con dicho buffer, siendo estas mezclas muestra/buffer almacenadas inmediatamente a -70 °C hasta su uso (Laurent et al, 2010).

La metodología de extracción del ARN previo a Mayo de 2012 a partir las muestras clínicas fue llevada a cabo a 4°C en base a la metodología de extracción del TRIzol (TRIzol® LS Reagent, Invitrogen™) indicadas en las especificaciones del fabricante. Los pellets de ARN se resuspendieron en 30 µl de agua tratada con DEPC o más, en función del tamaño del pellet, y almacenados a -70°C hasta su uso oportuno. En el caso de las muestras pequeñas o de bajo contenido celular, como de tumor o líquido cefalorraquídeo, se utilizó glicógeno ultrapuro (Invitrogen™) para facilitar la precipitación del ARN y optimizar la extracción. Una vez extraído el ARN, se lo cuantificó y evaluó su pureza espectrofotométricamente. Se verificó su integridad luego de cada retrotranscripción y primera ronda de amplificación del ARNm de la gliceraldehído 3-fosfatodehidrogenasa (GAPDH) de manera electroforética.

A partir de Mayo de 2012, se reemplazó la metodología de almacenamiento y procesamiento de muestras para adecuarla a las técnicas de rutina del Hospital Garrahan. A continuación se describen brevemente:

MO y SP: Las muestras de MO y SP se tomaron directamente de los pacientes en jeringas con EDTA, 4.5 ml de MO y 3ml de SP e inmediatamente fueron transferidos a tubos cónicos de 15ml para realizar la separación del plasma. Se agregó igual volumen de solución fisiológica para hacer una dilución al medio. Se volcó esta dilución cuidadosamente con pipeta Pasteur sobre un colchón de 3.5 – 4 ml de Ficoll-Hypaque, y se centrifugó a T° ambiente por 20 min a 1600 rpm, y se aisló la porción correspondiente a las células mononucleares. En este punto se realizó el recuento celular haciendo una dilución 1:20 de una alícuota de la extracción. Se completó con fisiológica hasta completar el tubo y se centrifugó a T° ambiente por 10 min a 2000 rpm para lavar. Se alícuotó de a 10 millones de células por tubo de 1.5 ml. La alícuota a ser estudiada en lo inmediato se conservó directamente en TRIzol. Se almacenó a -70°C hasta su uso.

LCR: En el Hospital Garrahan, el LCR extraído directamente por punción es colocado en un frasco pequeño de vidrio. El volumen total de la muestra, de aproximadamente 3ml, se transfirió a 2 tubos tipo eppendorf de 1.5 ml para luego centrifugar a T° ambiente por 20 min a 2000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 500 µl de TRIzol LS. Se almacenó a -70°C hasta su uso. Tanto para la MO o SP, como para el LCR almacenados de esta manera, se prosiguió con la

extracción del ARN acorde a las especificaciones en el protocolo de extracción del TRIzol que se detallan a continuación.

Extracción de ARN por la metodología del TRIzol

Luego de agregar el TRIzol a las respectivas muestras, se incubó a T° ambiente por 15 min en hielo. Por cada ml de TRIzol se agregó 0.2 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente a mano por 15 s, dejando incubar en hielo por 30 min. Para la separación de fases, se centrifugó a 4 °C por 30 min a 12000 rpm. Se agregó 0.5 ml de isopropanol frío por cada ml de TRIzol y se incubó en hielo por 30 min. Para la precipitación, se centrifugó a 4 °C por 30 min a 12000 rpm. Se descartó el sobrenadante por inversión, y se agregó 1 ml de ETOH 70% para el lavado del pellet de ARN. Se levantó el pellet por tincazo y se centrifugó a 4 °C por 30 min a 12000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar a T° ambiente por no más de 30 min. Se resuspendió el ARN en suficiente agua tratada con DEPC.

Por otro lado, las muestras que habían sido almacenadas en el buffer TCG de estabilización antes de Mayo de 2012, pero que fueron procesadas para la extracción del ARN luego de esa fecha, y con el objetivo de mejorar la pureza de la muestra extraída, fueron extraídas utilizando la metodología de extracción fenol ácido-cloroformo, la cual se eligió tras la optimización en base a 3 opciones: 1) Colocando igual volumen de fenol hidratado que de buffer TCG, y mitad de volumen de AcNa 2M (pH = 4); 2) Colocando 5 veces el volumen de TRIzol con respecto a la mezcla muestra/TCG; 3) Colocando 5 veces el volumen de TRIzol con respecto a la mezcla muestra/TCG + 3 veces el volumen de AcNa 2M (pH = 4) con respecto a la mezcla muestra/TCG. De éstas se continuó trabajando con la primer opción debido a los mejores rindes de muestra y valores 260/280 nm, como también reducción de los volúmenes de trabajo por muestra y abaratamiento de costos.

Selección de potenciales marcadores tumorales para el retinoblastoma

Se realizó una exhaustiva búsqueda bibliográfica teniendo en cuenta posibles genes candidatos para marcadores tumorales específicos de retinoblastoma cuya expresión estuviese confinada exclusivamente a las células de la retina. La búsqueda se

realizó mediante el motor de búsqueda *online* Pubmed, que permite el libre acceso a la base de datos MEDLINE de citaciones y resúmenes de artículos de investigación biomédica. Se pre-seleccionaron 8 candidatos, los genes: PGP9.5, Cone Arrestine, RXR, OPN1MW, OPN1SW, SYK, TRB2, y CRX. Debido al amplio sustento bibliográfico sobre su expresión en la retina y en el retinoblastoma (Boatright et al, 2001; Glubrecht et al, 2009; Santagata et al, 2009; Terry et al, 2012; Xu et al, 2009) y dado que su expresión está restringida a los precursores de los fotorreceptores y es de relevancia en la funcionalidad del linaje celular retiniano, se seleccionó al CRX, un factor de transcripción *homeobox* de tipo Otx que es expresado tanto en conos como en bastones de la retina.

Cálculo de los niveles relativos de expresión

Siempre que se realizó la determinación de la expresión del marcador molecular GD2 sintasa o CRX por RT-qPCR, se utilizó el método delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (Livak y Schmittgen, 2001) para la cuantificación relativa de los niveles de expresión génica. En este caso, se utilizó en la versión sin corrección de eficiencia, $2^{-\Delta\Delta Ct}$, es decir, asumiendo una duplicación óptima del ADN *target* tras cada ciclo de amplificación de la *real time*.

$$\Delta Ct_{\text{target}} = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{calibrador}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\Delta Ct_{\text{normalizador}} = Ct_{\text{normalizador}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$R = 2^{[\Delta Ct_{\text{target}} - \Delta Ct_{\text{normalizador}}]} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$R = 2^{-[\Delta Ct_{\text{normalizador}} - \Delta Ct_{\text{target}}]} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (\text{Ecuación 5})$$

En este modelo (ecuaciones 1-5) del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ó, simplemente, del $\Delta\Delta Ct$, el nivel normalizado de expresión (R, de ratio) del gen *target* (la GD2 sintasa o el CRX), está corregido por la expresión de una muestra calibradora, en este caso 1000 células WERI-Rb1 (ésta es una muestra no tratada, que funciona como control positivo y que se repite en cada experimento en todas las placas ensayadas) y normalizado por la expresión del gen de *house-keeping* GAPDH cuya expresión también es relativizada a la muestra calibradora. La normalización por el gen normalizador provee un método para la corrección de las potenciales diferencias en los resultados debidas a diferencias en la

carga de ARN. El problema principal de la utilización de un gen no regulado, como el GAPDH es que la mayoría ve afectada su expresión por el tratamiento aplicado, pudiendo variar entre tejidos o individuos (Pfaffl et al, 2004). Sin embargo, este inconveniente no fue observado en nuestro panel de muestras y pacientes utilizando al gen normalizador escogido, acorde a lo sugerido en la publicación de referencia para el estudio del neuroblastoma (Cheung I.Y. y Cheung N.K., 2001).

Mediante el uso del método $\Delta\Delta C_t$, los datos se presentan como las veces en que la expresión del gen target es sobre-expresado o sub-expresado normalizado por la expresión de un gen endógeno de referencia (GAPDH en este caso) y relativizado a un control no tratado, o muestra calibradora (el ARN proveniente de 1000 células de la línea celular WERI-Rb1). Para esta muestra control o calibradora no tratada, el $\Delta\Delta C_t$ vale cero y $2^0 = 1$, por lo que, por definición, los niveles de expresión relativos al mismo control no tratado es igual a 1. Por otro lado, para las muestras tratadas o en evaluación, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ indica los niveles o veces que el gen target es expresado con respecto o relativo al calibrador (Livak y Schmittgen, 2001).

Criterios de positividad y negatividad en los análisis de expresión

Aquellos pacientes en quienes se detectó el ARNm de CRX ya sea en la MO o en el LCR, o aquellos en los que se detectó el ARNm de la GD2 sintasa en el LCR, fueron considerados como positivos para la EMD. Los resultados positivos para la detección del ARNm del CRX fueron expresados como niveles relativos de expresión (Torbidoni et al, 2015). Y los resultados con la GD2 sintasa fueron expresados como datos cualitativos (positivo-negativo) (Laurent et al, 2013).

A) Detección de la enfermedad mínimamente diseminada en el LCR de pacientes con retinoblastoma de alto riesgo mediante el uso de la GD2 sintasa

Los pacientes

Todos los pacientes con retinoblastoma pertenecientes al estadio II–IV del *International Retinoblastoma Staging System* (IRSS) (Chantada et al 2006 B) que fueron diagnosticados sistemáticamente desde Mayo de 2007 a Febrero de 2012 fueron incluidos en el estudio.

Se incluyeron en el estudio a los pacientes con estadio I y características de alto riesgo tales como invasión masiva de la coroides o invasión retrolaminar y se tomaron muestras seriadas de LCR siempre que fuera posible en los exámenes oftalmológicos de rutina durante el seguimiento bajo anestesia total. Sin embargo, no se incluyeron a los pacientes con estadio IVb (con compromiso del SNC).

Las muestras de LCR fueron obtenidas por punción lumbar bajo anestesia general, usualmente dentro de los 10–14 días después de la enucleación de los pacientes en los estadios I–II y 1–3 días luego de la admisión en los pacientes con estadio III en adelante. En todos los casos, se obtuvo en el mismo momento muestras de MO. Los LCR de los pacientes en estadios III y IV fueron examinados repetidamente luego de dos ciclos de quimioterapia de inducción y rescate autólogo de células madre (ASCR) o al completar el tratamiento en aquellos que no recibieron ASCR. Las muestras de LCR de los pacientes en estadios I–II tuvieron evaluaciones repetidas durante el seguimiento una vez alcanzada la compleción de la quimioterapia adyuvante y al año del diagnóstico. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los padres/tutores y el protocolo, como así también las punciones suplementarias, fue aprobada por el Comité de Ética e Investigaciones del Hospital Garrahan.

Las muestras

Las muestras de LCR fueron procesadas inmediatamente luego de su obtención y estudiadas por citología. Se almacenó una alícuota de 2–3 ml en buffer TCG 6 M en

una relación 1:1.5 muestra/buffer para ser estudiadas por la técnica de PCR. Se consideró a un LCR positivo cuando pudieron identificarse células malignas en la citología. Se realizó el estudio inmunocitológico para el GD2 por microscopía de fluorescencia directa y/o por citometría de flujo para las células CD45–CD56+ (Shen et al, 2012) sólo cuando la citología de los LCR fue positiva o siempre que el conteo celular excedía las 3 células/mm³ indiferentemente de los hallazgos en la citología. El conteo celular en el LCR fue realizado por duplicado utilizando un hemocitómetro o cámara de conteo Levy–Neubauer. Para el estudio citológico, las muestras de LCR se procesaron de la siguiente manera: 500 µl de LCR se centrifugaron por 4 min a 1100 rpm y se dejaron secar los portaobjetos de vidrio a temperatura ambiente, se fijaron con acetona y se tiñeron con May Grünwald-Giemsa.

Extracción del ARN

La extracción de ARN fue realizada a 4°C siguiendo la metodología de extracción de fenol-cloroformo del TRIzol (TRIzol LS Reagent; Invitrogen) acorde al protocolo del producto. Debido a la baja celularidad del LCR, durante la extracción se utilizó además glicógeno ultrapuro (Invitrogen) como *carrier* para optimizar la extracción, como se publicó anteriormente (Laurent et al, 2010).

Diseño de primers

El diseño de *primers* específicos para la secuencia de ARNm de la GD2 sintasa (GenBank Accession No. NM_001478) fue realizado con el software PrimerSelecte 5.05 (DNAdnastar Inc.) (Laurent et al, 2010). El detalle de los *primers* está en la Tabla N°5.

Tabla N°5 – Secuencia de *primers* para la amplificación del ARNm de la GD2 sintasa y GAPDH

ARNm	Primer Forward	Primer Reverse	Tamaño del amplicón (pb)
GD2-RT-PCR	5'-TCGGCTACGGCTCTCATCACCAG -3'	5'-CTGAGCGTGGAGCCCGGCG -3'	347
GD2-Nested-PCR	5'-GAACCTGGCCGTGTCTCAAGTAAC-3'	5'-CACCATTATCGGCAGCTGCT -3'	180
GAPDH-RT-PCR	5'-GGGGAGCCAAAAGGGTCATCATCT-3'	5'-GACGCCTGCTTCACCACCTTCTTG	457

RT-PCR y Nested-PCR

Los estudios por PCR fueron llevados a cabo a ciegas, sin tener previo conocimiento de los resultados de los otros *tests* (citología o inmunocitología). Los resultados obtenidos por PCR no influenciaron en las decisiones terapéuticas concernientes a los pacientes del estudio.

Las muestras de ARN fueron analizadas por una RT-PCR de dos pasos. El primer paso de síntesis de ADNc y luego la PCR fueron llevados a cabo en un volumen final de 50 µl usando el kit IllustraReady-To-Go RT-PCR Bead kit (GE Healthcare) (Laurent et al, 2010). las características de ciclado para la RT-PCR fueron las siguientes: transcripción reversa, 1 h a 43 °C; desnaturalización inicial, 5 min a 95 °C; amplificación (60 ciclos), 1 min a 95 °C, 1 min a 63.7 °C y 30 s a 72 °C; extensión final, 10 min a 72 °C.

Se realizó una segunda ronda de amplificación por Nested-PCR sólo en aquellas muestras que tuvieron amplificación de GAPDH positiva. Los casos GAPDH-negativos fueron considerados como no informativos para la EMD. La preparación de la Nested-PCR se realizó como lo publicado previamente (Laurent et al 2010). El ciclado consistió de: una desnaturalización inicial, 1 min a 95 °C; amplificación (30 ciclos), 30 s a 95 °C, 30 s a 60.2 °C y 30 s a 72 °C; extensión final, 5 min a 72 °C.

La sensibilidad del método, como ya se había determinado en una publicación previa y en mi tesis de Maestría (Laurent, 2010), fue de 200 pg y 40 pg de ARN total para la RT-PCR y Nested-PCR, respectivamente. Los pacientes con una RT-PCR o Nested-PCR positiva para GD2 sintasa y amplificación de GAPDH fueron considerados como positivos para la EMD.

Tratamiento recibido por los pacientes

Los pacientes con solamente invasión masiva de la coroides no recibieron quimioterapia adyuvante. Este tratamiento fue administrado a los pacientes con compromiso post-laminar del nervio óptico, compromiso microscópico de la esclera, y a todos los pacientes con estadio II como se reportó previamente (Chantada et al, 2010).

Los pacientes con estadio III en adelante recibieron quimioterapia neoadyuvante, enucleación secundaria seguida de consolidación con radioterapia orbital y quimioterapia adyuvante en los pacientes con estadio III y ASCR en estadio IV si al menos una respuesta parcial era observada (Palma et al, 2012). A los pacientes que presentaron buftalmia se les ofreció quimioterapia neoadyuvante y enucleación secundaria seguida de terapia adyuvante aún cuando la diseminación extraocular no fue evidente (Bellaton et al, 2003).

Análisis estadístico

Se utilizaron los *tests* de Chi-cuadrado o Fisher para las variables categóricas y Mann–Whitney para las variables continuas. La recaída en el LCR fue definida como el evento y las curvas de sobrevida libre de eventos fueron calculadas por Kaplan–Meier. El estado de sobrevida fue actualizado hasta Julio de 2012. La comparación de curvas fue realizada con el test Log-Rank.

B) Uso del factor de transcripción de conos y bastones (CRX) como marcador molecular en el retinoblastoma metastásico

Este estudio comprendió 2 fases:

- 1-Validación del marcador y del método de detección
- 2-Evaluación de su uso en pacientes.

1- Validación del marcador y del método de detección

Prueba de expresión de la GD2 sintasa en médulas óseas control

La expresión de la GD2 sintasa había sido estudiada en el LCR de pacientes con retinoblastoma mediante PCR a punto final en dos rondas de amplificación, es decir por RT-PCR y luego por Nested-PCR, siempre que la expresión de GAPDH fuera positiva; sin embargo, no había sido evaluada en la MO. Con el objetivo de establecer si la determinación de la EMD por medio del estudio de la expresión de la GD2 sintasa en la MO de los pacientes sería de utilidad, se almacenaron muestras de MO para tal fin. Como punto de partida se estudió el ARN proveniente de 30 muestras de MO control de pacientes (no retinoblastoma) con las siguientes enfermedades: neuroblastoma, leucemia linfoblástica aguda, linfoma, linfoma cutáneo, meduloblastoma, sarcoma de Ewing, linfoma Hodgkin, púrpura trombocitopénica idiopática, como modo de prueba de que el marcador no es expresado de manera basal, hecho que podría interferir en los resultados de pacientes con la enfermedad, como establecen varios grupos (Beiske et al, 2009; Stutterheim et al, 2008; Martinez et al, 2007).

Para el estudio de la MO se utilizó la metodología basada en PCR en tiempo real, según una modificación del protocolo diseñado por los Dres. Cheung (Cheung I.Y. y Cheung N.K., 2001), el cual consistió 60 ciclos a 95°C por 15 s y 60°C por 1 min, utilizando al GAPDH como gen endógeno de referencia para la normalización de la expresión y la plataforma StepOne™ Real-Time PCR System (AppliedBiosystems). El molde de ADNc de partida fue de 100 ng, y los *primers forward* y *reverse* para GD2 sintasa fueron usados en una mezcla de 500 nM cada uno, junto con la sonda de 200

nM. Para el caso del GAPDH, ambos *primers* se utilizaron a 40 nM y la sonda a 100 nM. Los mismos son los descriptos a continuación (Tabla N°6):

Tabla N°6 - *Primers* para la qPCR de GD2 sintasa (Cheung)

	GD2 sintasa	GAPDH
Primer Forward	5'-GACAAGCCAGAGCGCGTTA-3'	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
Primer Reverse	5'-TACTTGAGACACGGCCAGGTT-3'	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'
Sondas	FAM-5'-AACCAGCCCTTGCCGAAGGGC-3' (99pb).	VIC-5'-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3' (226 bp)

Expresión del CRX en líneas celulares y tumor

Para corroborar si el marcador propuesto era expresado en el retinoblastoma, se evaluó la expresión de su ARNm en las líneas celulares comerciales de retinoblastoma Y79 y WERI-Rb1 y en 17 tumores primarios de retinoblastoma. Los tumores fueron obtenidos durante la enucleación y almacenados en fresco inmediatamente a -70 °C hasta su análisis. El ARN total de la línea celular WERI-Rb1 fue seleccionado como muestra de referencia para los ensayos de qPCR.

Controles

Para poder determinar los niveles de expresión basales de CRX en la MO, se utilizaron muestras de MO (n=47) de niños con patologías en remisión completa diferentes al retinoblastoma tales como leucemia, sarcoma de Ewing, histiocitosis, linfoma non-Hodgkin, meduloblastoma y neuroblastoma, las cuales fueron conservadas y evaluadas bajo las mismas condiciones que las muestras del estudio.

Extracción de ARN y síntesis del ADNc

Se extrajo en ARN total a partir de tumores, MO, SP y LCR mediante la metodología de extracción con fenol-cloroformo (Ver Materiales y Métodos generales).

La síntesis del ADNc necesario como molde para los ensayos de PCR fue basado en un procedimiento diseñado para convertir entre 1 pg–5 µg de ARN total en primer cadena de ADNc (SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix, Invitrogen, Life Technologies). Para un volumen final de reacción de 10 µl o de 20 µl se partió de hasta 2.5 µl (o hasta 3 µl) y de hasta 5µg (o hasta 6 µl) de ARN total, respectivamente, al que se agregó 0.5 µl (ó 1 µl) de *primers* hexámeros al azar (50 ng/µl) y 0.5 µl (ó 1 µl) de buffer de *annealing*. Se incubó a 65 °C por 5 min para la desnaturalización y se enfrió en hielo por al menos 1 min. Para la síntesis de la primer cadena de ADNc se agregó 1 µl para volumen final de 10 µl (ó 2 µl si el volumen final de reacción era de 20 µl) del mix de las enzimas SuperScript® III/RNaseOUT™ junto con 5 µl (ó 10 µl) del Mix 2X de reacción de primer cadena (conteniendo 10 mM MgCl₂, and 1 mM de cada dNTP). Se incubó a 25 °C para el *annealing* de los *primers* y se continuó con un ciclo de 50 °C por 50 min para la síntesis de la primer cadena de ADNc. Se finalizó la reacción a 85 °C por 5 min y se almacenó cada tubo conteniendo el ADNc a -70 °C para su eventual uso.

Diseño de Primers

El diseño de los *primers* para qPCR específicos para CRX fue realizado con el software Primer Express 1.5 (Applied Biosystems) en base a la secuencia del GenBank N° NM_000554, considerando sólo *primers* interexónicos con un intrón de al menos 500 pb con el fin de evitar error sistemático en los resultados por amplificación de ADN genómico contaminante. Lo mismo se realizó con el gen *housekeeping* GADPH, según la secuencia del GenBank N° NM_001256799.1. Se siguieron las recomendaciones del fabricante (Applied Biosystems) tales como temperatura de *annealing* entre 60 °C y 70 °C, 40 a 60% contenido de GC, tamaño del oligonucleótido entre 16 y 20 bases, tamaño del fragmento amplificado entre 80 y 150 bases. El alineamiento único para cada par de primer fue evaluado a través de la herramienta de PCR *in silico* disponible a través de la Universidad Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/>). Los *primers* seleccionados utilizados para la amplificación del ADNc del CRX y del GADPH se describen en la Tabla N°7.

Tabla N°7 - Diseño de primers para qPCR de CRX

ARNm	Primer Forward	Primer Reverse	T°de melting [°C]
CRX RT-qPCR SybrGreen	5'-GAGGAGGTGGCTCTGAAGATCA-3'	5'-TTAGCCCTCCGGTTCTTGAA-3'	78
GAPDH RT-qPCR SybrGreen	5'-ATGGAAATCCCATCACCATCTT-3'	5'-CGCCCCACTTGATTTTGG-3'	76

En el caso de los estudios basados en *Nested*-PCR y PCR solos, se emplearon la secuencias de los *primers* anteriormente reportados por nuestro grupo tanto para la GD2 sintasa como para GAPDH (Laurent et al, 2010) y que se mostraron en A). La evaluación del LCR llevada a cabo por RT-PCR y Nested-PCR de la GD2 sintasa como se comentó en A), incluyó las muestras estudiadas hasta Mayo de 2012, siendo reemplazado por los estudios de CRX basados en qPCR a partir de esa fecha.

Para el par de *primers* diseñados para CRX se evaluaron diferentes concentraciones, 1.200 nM, 800 nM e 400 nM, 200 nM, combinadas con diferentes cantidades de molde (10, 50 y 100 ng) de partida para la qPCR. Se consideró la utilización de la menor concentración de *primers* a fin de evitar la formación de estructuras secundarias debidas a su exceso obteniéndose los menores valores de Ct.

Una vez obtenida la concentración de *primers* a utilizar, se calculó la eficiencia para el par haciendo diluciones seriadas de ADNc convertido a partir de RNA total (50 ng, 5 ng, 0.5 ng, 0.05 ng e 0.005 ng). A partir de los resultados, se realizó un gráfico donde se relacionan los Cts con el valor de las cantidades de ADNc en logaritmo en base 10. O valor correspondiente al coeficiente angular (la pendiente o *slope*) de la ecuación de la recta de la curva estándar ($y = ax + b$, $a = slope$) se utiliza para calcular la eficiencia (Ef) de la reacción:

$$Ef = 10^{(-1/slope)} \quad (\text{Ecuación 6})$$

qPCR

Por cada 20 µl de volumen final de reacción, contenido en cada well de las placas de 48 pocillos (MicroAmp® Optical - Applied Biosystems), se agregaron los siguientes componentes: Power SYBR® Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems), 800 nM de cada *primer* de CRX *forward* y *reverse*, 100 ng de molde de ADNc y agua tratada con DEPC para completar el volumen final. Lo mismo se agregó para cada muestra pero considerando 200 nM de cada *primer* específico de GAPDH. Cada ronda PCR incluyó al menos un triplicado de cada muestra incógnita a evaluar por CRX y GAPDH (se utilizó luego el promedio), una muestra de referencia equivalente a 1000 células de la línea celular WERI-Rb1 y un control negativo sin molde. Los estudios fueron llevados a cabo por duplicado. El gen de *housekeeping* GAPDH fue utilizado para la normalización debido a su expresión estable en todos los tumores evaluados.

El ciclado de la qPCR fue realizado en un equipo StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Las reacciones fueron realizadas en condiciones universales de ciclado que consistió en una fase inicial que comenzó con un paso de 10 min a 95 °C para activar a la AmpliTaq Gold ADN polimerasa, seguido de 50 ciclos de 15 s a 95 °C de desnaturalización y 1 min a 60 °C para el apareamiento de los *primers* y la extensión, más una curva de *melting* estándar para la determinación de la especificidad de la amplificación.

Al final de la amplificación se adicionó una etapa de 20 min de duración en la cual la temperatura aumenta gradualmente de 60 °C a 95 °C a 0.2 °C por segundo con la continua adquisición de fluorescencia (Morrison et al, 1998), a partir de la cual se obtiene una curva de disociación o *melting*, en la cual la presencia de un pico único confirma la especificidad de la amplificación.

A medida que se van formando nuevas hebras de doble cadena durante cada ciclo de la reacción de amplificación, el nivel de fluorescencia emitida aumenta gradualmente, siendo, que mientras menor sea el ciclo en el que la fluorescencia alcanza un determinado límite, mayor es el nivel de expresión del transcripto analizado (Morrison et al, 1998). El parámetro utilizado es el Ct (Cycle Threshold o ciclo límite),

que es una línea aleatoria fija en la región exponencial de las reacciones y es usada para determinar el ciclo en el que cada muestra alcanza un determinado valor de fluorescencia (Livak and Schmittgen, 2001). Las reacciones realizadas por duplicado admitieron un valor de desvío estándar de 0.5, siendo repetidas cuando sobrepasaron ese valor.

El uso de la muestra calibradora, que es una muestra común utilizada en todas las placas, permite la comparación de dos reacciones independientes para un mismo gen. Esa muestra es utilizada para salvar las diferencias entre placas, por ejemplo, cuando el número de muestras estudiado es superior al número de muestras que caben en una placa o cuando es necesario realizar una repetición del ensayo porque los triplicados o duplicados de cada muestra presentaban un desvío estándar mayor a 0.5

La expresión diferencial del transcripto de interés fue determinada por cuantificación relativa en relación a GAPDH. Para cálculo de medida relativa de expresión fue utilizado un modelo matemático propuesto por Pfaffl (Pfaffl, 2001), considerando la eficiencia de amplificación como del 100%.

Límite de Detección (LOD) de la qPCR

El LOD (del inglés, *Limit of Detection*) o sensibilidad del sistema de detección por qPCR fue evaluado mediante la realización de una siembra de células WERI-Rb1 en células mononucleares (CMN) de manera tal de obtener un rango de diluciones de 10^{-1} a 10^{-7} . En acuerdo con el criterio que establece que la amplificación específica debería ser lo suficientemente separada de la amplificación no específica (*background*), y debido a que todas las muestras de control fueron CRX-negativas (*background* = 0) definimos la sensibilidad como la dilución más baja en la que hubo amplificación específica, siendo el desvío estándar de las réplicas menor a 0.5. El rango cuantitativo fue definido como la dilución más baja capaz de devolver una amplificación reproducible.

2-Evaluación de CRX en pacientes

Pacientes

En este estudio prospectivo se incluyó a todos los pacientes con retinoblastoma metastásico al diagnóstico o a los recaídos que fueron admitidos al Hospital Garrahan en el periodo de Marzo de 2007 hasta Diciembre de 2013. Los pacientes con retinoblastoma trilateral fueron excluidos de este análisis. Siempre que se intentó aplicar una terapia curativa, los pacientes fueron incluidos en un régimen de quimioterapia intensiva de inducción seguida por consolidación con quimioterapia de alta dosis y ASCR para aquellos pacientes respondedores. En el caso de los pacientes con enfermedad metastásica evidente, se los trató con radioterapia en concordancia con guías de tratamiento publicadas con anterioridad (Palma et al, 2012; Chantada et al, 2010).

Obtención y preservación de las muestras clínicas

Las muestras de MO, SP y LCR fueron colectadas sistemáticamente como parte de la evaluación de la enfermedad mínima bajo un esquema prospectivo, luego de aprobación por parte del comité de ética. Mediante consentimiento informado, se obtuvo y se preservó material genético sobrante de los estudios diagnósticos en el banco de tumores del Hospital Garrahan.

La evaluación de la MO incluyó 2 aspirados y 2 biopsias tomadas de la partes posterior de ambas crestas ilíacas. El material obtenido fue enviado al sector encargado de la evaluación morfológica por citología e inmunocitología para el gangliósido GD2 a cargo del Servicio de Inmunología del Hospital Garrahan, y para el estudio por qPCR. Para la obtención de estas muestras, se removió ligeramente la aguja del sitio de punción de manera de poder obtener material de un sitio diferente y evitando su dilución con SP.

Desde el comienzo del estudio hasta Mayo de 2012, las muestras de MO de pacientes destinadas a los estudios por PCR fueron colocadas inmediatamente en un buffer de tiocianato de guanidinio 6M en una proporción 1:1.5 de muestra/buffer para la

preservación del ARN hasta su análisis, como reportó nuestro grupo previamente (Laurent et al, 2010). Las biopsias de MO fueron procesadas como de rutina y evaluadas por un médico patólogo por medio de una histopatología convencional.

La inmunocitología para GD2 en las muestras de MO fue llevada a cabo por una microscopía de fluorescencia indirecta estándar usando el anticuerpo 3F8 (amablemente cedido por el Dr. Nai Kong Cheung) en acuerdo con procedimientos de rutina ya publicados. (Chantada et al, 2006 A), como se describió más arriba en este capítulo. En todos los casos, las muestras de MO fueron adquiridas con anestesia general del paciente y concomitantes con el estudio oftalmológico siempre que fuera posible. En ese mismo momento, se obtuvieron las muestras de 3 ml de SP y las de LCR.

En el caso del LCR, se colectaron muestras para realizar la citología, para la inmunocitología (la cual se llevó a cabo en caso de que el conteo celular excediera las 3 células/mm³) y para el estudio por PCR (3ml). La evaluación de la respuesta al tratamiento se programó para después del segundo ciclo de inducción con quimioterapia; sin embargo, en los casos de invasión tumoral en la MO, se llevaron a cabo los mismos estudios luego del primer ciclo de quimioterapia y fue repetido tras cada ciclo hasta que se negativizó. En todos los casos, se realizó un examen completo antes de la consolidación, al día 60 de la consolidación con quimioterapia de alta dosis y RACM y al año luego del diagnóstico, ante el evento de una sospecha de recaída extraocular.

Análisis de los datos de expresión de CRX

Las muestras clínicas fueron consideradas positivas si presentaban amplificación específica, evidente en la temperatura de *melting* que es única para amplicón, y si en al menos 2 de las 3 réplicas tenían un valor de Ct menor que 40, con un desvío estándar entre las réplicas menor a 0.5. Las muestras con ninguna amplificación o amplificación en sólo una de las réplicas y/o con valores de Ct mayores a 40 fueron consideradas como negativas. Los datos fueron analizados de manera cualitativa, ya que luego del diagnóstico todas las muestras se volvieron negativas para CRX. Los pacientes en quienes se detectó el ARNm de CRX por RT-qPCR o el GD2 por inmunocitología en

MO, SP o LCR, pero que no mostraron células tumorales evidentes por los criterios patológicos estándar, fueron considerados como EMD positivos. El estado de sobrevida fue actualizado hasta junio de 2014.

C) Uso de CRX como marcador de la enfermedad mínimamente diseminada en el retinoblastoma no metastásico

El enfoque de este estudio fue prospectivo e incluyó a todos los pacientes con retinoblastoma no metastásico que fueron diagnosticados en el Hospital Garrahan entre Mayo de 2007 y Octubre de 2012, quienes cumplían con los siguientes criterios de inclusión:

Criterios de inclusión

Grupo de alto riesgo

- Pacientes inicialmente enucleados con retinoblastoma estadio I según el IRSS (Chantada et al, 2006 B) y factores histopatológicos de riesgo definidos como invasión masiva de la coroides, PLONI, o compromiso intra-escleral; o estadio II incluyendo a aquellos pacientes con residuos tumorales más allá del margen de resección quirúrgica del nervio óptico y/o invasión trans-escleral.
- Pacientes con retinoblastoma bilateral quienes fueron enucleados luego de que la terapia conservativa fallara, mostrando factores de riesgo en la histopatología.
- Pacientes con buftalmia masiva quienes recibieron quimioterapia neoadyuvante y enucleación secundaria.

Grupo de riesgo medio

- Pacientes con retinoblastoma bilateral que fueron sometidos a enucleación primaria de uno de los ojos y quimiorreducción sistémica para el restante ojo que no poseía características patológicas de alto riesgo. En estos casos, fue posible realizar la determinación de la EMD debido a que tanto la médula ósea MO como el LCR fueron exploradas antes del inicio de la quimiorreducción indiferentemente del estudio patológico.

- Pacientes quienes fueron sometidos a una enucleación inicial sin factores de riesgo en la patología. Debido que no se realiza ninguna evaluación de la MO o el LCR de manera rutinaria en el Hospital Garrahan para estos pacientes, se recolectaron 10 muestras que fueron obtenidas de una cohorte no seleccionada de pacientes con estas características en el Hospital Infantil de México Federico Gómez donde el protocolo para los estudio de la MO y el LCR incluye a la totalidad de los pacientes con retinoblastoma. Dichas muestras fueron preservadas de igual manera con los mismos procedimientos que los utilizados en el Hospital Garrahan para las muestras del estudio del CRX, enviadas a la Argentina y analizadas en el Hospital Garrahan al igual que las almacenadas y procesadas localmente.

Obtención, preservación y procesamiento de las muestras clínicas

Se recolectaron muestras de MO y LCR de cada paciente. El procedimiento de evaluación de la MO fue el siguiente (Chantada et al, 2006 A): Se obtuvieron 2 aspirados y 2 biopsias de cada cresta ilíaca posterior. Todas las muestras fueron evaluadas utilizando citología y histopatología estándar. Las muestras para el estudio de la EMD fueron preservadas en un buffer TCG con una relación 1:1.5 muestra/buffer y congeladas a -70 °C hasta su análisis, como se reportó anteriormente (Torbidoni et al, 2015). La expresión del ARNm del CRX se evaluó mediante la metodología de qPCR en tiempo real.

La inmunocitología para el gangliósido GD2 se realizó mediante la técnica de microscopía de fluorescencia indirecta estándar con el anticuerpo 3F8 (provisto amablemente por el Dr. Nai Kong Cheung, MD) (Chantada et al, 2006 A). Todos los pacientes de cualquier estadio con una inmunocitología positiva para GD2 y aquellos con invasión tumoral en el margen de resección quirúrgica del nervio óptico pasaron por exámenes repetidos mensuales hasta su negativización en el primero de los casos, y luego de 6 y 12 meses del diagnóstico en el segundo. En el mismo momento, también se tomó una muestra de 3-5-ml de LCR. En el caso de estas muestras, la primera muestra de LCR se utilizó para la citología, una segunda para la inmunocitología (la cual se llevó a cabo en caso que el conteo celular resultara en más de 3 células/mm³), y la

tercera fue almacenada a -70°C para los estudios por PCR. El ARNm de la GD2 sintasa fue utilizada para la evaluación de la EMD en 14 pacientes incluidos en la primera fase de este estudio, siendo reemplazado por el ARNm del CRX en 45 pacientes. En 35 pacientes no fue posible la obtención de ARN a partir de su muestra de LCR.

Tratamiento recibido por los pacientes

Debido a que el presente trabajo se trata de una validación del uso de marcadores, la presencia de la EMD no tuvo influencia en la toma de decisiones terapéuticas durante el estudio. Todas las muestras fueron procesadas a ciegas, siendo tanto la patología como el resultado clínico de los pacientes desconocidos ante la realización de las PCR y las inmunocitologías. Los pacientes fueron tratados con terapias estándar (Chantada et al, 2010), las cuales se resumen en la Tabla N°8.

Tabla N°8 - Guías de tratamiento según los factores de riesgo histopatológicos

Subgrupo	Tratamiento	Descripción
Invasión aislada de la coroides	No terapiaadyuvante	-
Invasión del segmento anterior	No terapiaadyuvante	-
Invasión aislada post-laminar del nervio óptico (< 1 mm)	No terapiaadyuvante	-
Invasión post-laminar del nervio óptico (> 1 mm) o en combinación invasión masiva de la coroides o de la esclera.	Quimioterapia adyuvante	<u>Régimen A</u> Etopósido 100 mg/m² (3.3 mg/kg*) días 1-3 en ciclos 1, 3, 5 y 7. Carboplatino 500 mg/m² (18 mg/kg*) días 1 y 2 en ciclos 1, 3, 5 y 7. <u>Régimen B</u> Vincristina 1.5 mg/m² (0.05 mg/kg*) día 1 en ciclos 2, 4, 6 y 8. Ciclofosfamida 65 mg/kg, día 1 en ciclos 2, 4, 6 y 8. Idarubicina 10 mg/m² día 1 en ciclos 2, 4, 6 y 8.
Buftalmia masiva	Quimioterapia Pre-enucleación (2-3 ciclos) seguida de quimioterapia adyuvante (total: 8 ciclos)	Los mismos regímenes de quimioterapia.
Tumor en el margen de resección del nervio óptico	Quimioterapia adyuvante Radioterapia orbital (*)	Régimen A y B más radioterapia orbital (n=4) Protocolo COG0321 y no radioterapia orbital (n=3).

(*) Dosis de radioterapia orbital 45 Gy a la órbita incluyendo al quiasma

Análisis estadístico de los datos

Antes de ingresar al protocolo, todos los padres o tutores de los pacientes firmaron un consentimiento informado permitiendo el uso de muestras y datos clínicos para fines de investigación. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética, Docencia e Investigación del Hospital JP Garrahan y el Hospital Infantil de México, siendo todos los procedimientos llevados a cabo según estándares éticos y la Declaración de Helsinki.

El diseño y análisis del estudio se realizaron en base a las guías REMARK (McShane et al, 2005). Las variables categóricas y el test de Mann-Whitney para las variables continuas. Se definió a la recaída extraocular como un evento y se llevaron a cabo las curvas Kaplan-Meier de sobrevida libre de enfermedad. La comparación entre curvas fue realizada mediante un test de Mantel-Cox. El estado de sobrevida fue actualizado hasta Octubre de 2014. La regresión logística escalonada hacia adelante fue realizada con el objetivo de identificar variables que estuvieran independientemente asociadas con la EMD en el estudio patológico y para evaluar si se trataba de factores de riesgo para la recaída extraocular. Se consideró a un p-valor <0.05 como estadísticamente significativo.

DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD MÍNIMAMENTE DISEMINADA EN EL LCR DE PACIENTES CON RETINOBLASTOMA DE ALTO RIESGO MEDIANTE EL USO DE LA GD2 SINTASA

La diseminación en SNC es la causa más común de muerte en el retinoblastoma (Leal-Leal et al, 2006). Puede estar presente al diagnóstico o puede ocurrir como un evento secundario en niños sin compromiso inicial del SNC. En estos pacientes, la diseminación leptomeningea es la más común, siendo diagnosticada por estudios de imágenes y evaluación citológica del LCR (MacKenzie, 1996; Greenberg and Goldberg, 1977). Los pacientes que se presentan con diseminación orbitaria como así también aquellos con invasión postlaminar del nervio óptico o con invasión masiva de la coroides están en mayor riesgo de recaída (Pratt et al, 1989; Azar et al, 2003).

La quimioterapia se usa en estos niños con la intención de prevenir este evento fatal en el retinoblastoma; sin embargo, la recaída en el LCR puede ocurrir en una proporción de estos niños, generalmente dentro del primer año luego del diagnóstico (Radhakrishnan et al, 2012; Gimblett et al, 1995). Por este motivo, nos planteamos que sería de gran importancia poder identificar tempranamente a los pacientes en alto riesgo de manera de poder administrar una terapia más intensiva y dirigida al SNC. No obstante, el *timing* de la diseminación de la enfermedad al SNC en el retinoblastoma no se conoce. Se ha postulado que puede ocurrir a través de la invasión del nervio óptico pero no hay ningún patrón predictivo de la diseminación (MacKay et al, 1984). Tal como en otras neoplasias pediátricas, como el neuroblastoma, el SNC estaría actuando como un santuario donde los niveles activos de quimioterapia que se administra como terapia adyuvante, no son suficientes para el control tumoral, lo cual deriva finalmente en la recaída (Kramer et al, 2001).

Es posible que la EMD esté presente al diagnóstico y, si es correctamente detectada, puede ser potencialmente afectada por quimioterapia (Gimblett et al, 1995). Sin embargo, las metodologías disponibles para la identificación de estos niños, tales como la citología convencional y estudios por imágenes, fallan en esta tarea y se hacen, por lo tanto, imprescindibles los estudios inmunológicos y moleculares de marcadores

específicos de tumor, los cuales incrementan la sensibilidad de los exámenes estándares identificando potencialmente a la EMD (Kimoto et al, 2011; Chamberlain et al, 2009; Pine et al, 2005). No obstante, en contraposición a lo que ocurre con otros tumores pediátricos derivados del neuroectodermo, como el neuroblastoma (Beiske et al, 2009; Stutterheim et al, 2009) hasta el momento de haber realizado este trabajo, sólo se habían publicado reportes de caso en referencia al uso de técnicas moleculares para la detección de la EMD en el retinoblastoma (Dimaras et al, 2010 B; Yamashita et al, 2001). Estos reportes se enfocaban en la evaluación de la EMD en la MO y en la sangre periférica, pero no había reportes en el LCR para el retinoblastoma. La rareza de este tumor y la baja frecuencia de la ocurrencia de diseminación metastásica en países desarrollados constituyen un obstáculo para el estudio de una cohorte significativa de pacientes con riesgo de enfermedad metastásica. Además, hay información limitada sobre *targets* moleculares para el estudio de la EMD en el retinoblastoma (Laurent et al. 2010).

Debido a que es expresado consistentemente en el retinoblastoma, tras el trabajo de nuestro grupo y otros previamente, se identificó al gangliósido GD2 y a su enzima sintasa como candidatos para la evaluación de la EMD en el retinoblastoma y como un marcador de superficie celular para la inmunodetección (Laurent et al, 2010; Cheung NK et al, 1986; Shen et al, 2012. Por lo tanto, los estudios iniciales de esta tesis apuntaron a evaluar la detección de la EMD por RT-PCR del ARNm de la GD2 sintasa en muestras de LCR acelulares de pacientes con retinoblastoma de alto riesgo.

Resultados

Se evaluaron un total de 26 pacientes recientemente diagnosticados con retinoblastoma, 10 de los cuales eran bilaterales. Catorce (14) pacientes del total tenían estadio I (9 con compromiso postlaminar del nervio óptico y 5 con invasión masiva aislada de la coroides). Uno (1) de ellos, con compromiso postlaminar, se presentó con buftalmia masiva pero sin evidencia de diseminación extraocular en los estudios por imágenes y recibió quimioterapia pre-enucleación seguida de enucleación y terapia adyuvante. También se incluyeron 5 pacientes con estadio II con tumor en el margen de resección del nervio óptico luego de la enucleación inicial, y 3 pacientes con estadio III (extensión orbitaria masiva). También se incluyeron 4 pacientes con estadio IVa con metástasis en la MO. Durante el periodo de la investigación, se diagnosticaron 3 pacientes con estadio IVb. Tres (3) pacientes elegibles no fueron incluidos debido a que no se contó con el consentimiento de sus padres para el estudio seriado de los LCR.

Datos clínicos

Un total de 6 pacientes tuvieron recaída en el LCR. Las células tumorales en las citologías de los LCR resultaron positivas para GD2 por inmunocitología en 5 de ellos y por citometría de flujo con el patrón CD45–CD56+ positivo en el restante. La media del recuento celular de los pacientes recaídos fue de 6.6 células/mm³ (rango 2.4–151). El estadio inicial de los pacientes recaídos fue: II = 3, III = 1 y IVa = 2. La totalidad de los pacientes que recayeron fallecieron a causa de la enfermedad diseminada.

Evaluación de la EMD

Seis pacientes (23%) fueron positivos para el ARNm de la GD2 sintasa, revelando la presencia de EMD. Trece pacientes (50%) fueron negativos tanto para la RT-PCR como Nested-PCR, y 7 (27%) no brindaron resultados informativos. Las características clínicas y el resultado clínico de los pacientes se muestran en las Tablas N°9 y N°10. En 2 de los pacientes en quienes se había detectado la EMD al momento del diagnóstico también se continuó detectando la EMD en los subsecuentes LCR, teniendo ambos pacientes una recaída pronta en el LCR. La Figura N°14 muestra los resultados de uno de esos pacientes. En total, 3 de 6 pacientes con EMD recayeron en el

LCR y los 3 restantes tuvieron una SLE por 18, 26 y 28 meses, respectivamente, luego de haber recibido terapia adyuvante, no detectándose EMD evidente en dos muestras consecutivas de LCR (6 meses y 1 año luego del diagnóstico) en todos ellos.

Uno (1) de los pacientes de la cohorte sin EMD tuvo una recaída en el LCR, y dos recaídas más en el LCR ocurrieron en la cohorte con estudios de RT-PCR no informativos. En todos estos casos, sólo fue evaluada una sola muestra y la recaída en el LCR tuvo lugar antes de la segunda toma de muestra planificada. Por lo tanto, el valor predictivo negativo para la recaída en el LCR de las RT-PCR negativas para la GD2 sintasa al diagnóstico fue de 0.91.

Tabla N°9 - Descripción de pacientes con una RT-PCR y/o Nested-PCR positiva para el ARNm de la GD2 sintasa

#	Lateralidad, Estadio de la enfermedad y grado de extensión al diagnóstico	Tratamiento	PCR positiva	Resultado clínico	Observaciones
1	Unilateral Estadio IVa Tumor en el margen de resección Invasión de MO	Enucleación inicial, Quimioterapia convencional, consolidación con RACM	Al diagnóstico, después de la terapia de inducción y luego del RACM antes de la recaída	Recaída en el LCR a los 14 meses	La PCR negativizó luego de la terapia de inducción La PCR se positivizó 1 mes antes de la recaída
2	Unilateral Estadio II Tumor en el margen de resección	Enucleación inicial, quimioterapia convencional, Radioterapia orbitaria	Al diagnóstico	Vivo, libre de enfermedad (+22 meses)	PCR negativa a los 6 meses y 1 año luego del diagnóstico
3	Unilateral Estadio III Extensión orbitaria E invasión masiva del nervio óptico	Quimioterapia Neo-adyuvante, Enucleación, Quimioterapia adyuvante y radioterapia	Al diagnóstico	Recaída en el LCR a los 8 meses	La PCR se negativizó luego de la quimioterapia adyuvante
4	Unilateral Estadio I Bftalmia masiva No extensión extraocular	Quimioterapia adyuvante, Enucleación, Quimioterapia adyuvante	Al diagnóstico	Vivo, libre de enfermedad (+26 meses)	PCR negativa a los 6 meses y al año luego del diagnóstico
5	Bilateral Estadio III Extensión orbitaria Invasión masiva del nervio óptico	Quimioterapia adyuvante	Al diagnóstico y después del 1° y 2° ciclo de quimioterapia	Recaída en el LCR	Enfermedad estable luego de la quimioterapia La PCR nunca fue negativa
6	Unilateral Estadio III Extensión masiva orbitaria	Quimioterapia Neo-adyuvante, Enucleación, Quimioterapia adyuvante y radioterapia	Al diagnóstico	Vivo, libre de enfermedad (+18 meses)	PCR negativa a los 6 meses y al año luego del diagnóstico

Tabla N°10 - Descripción de pacientes con enfermedad mínimamente diseminada (EMD) negativa

Extensión de la enfermedad	Bilateral/unilateral	Tratamiento	Resultado clínico	Observaciones
Estadio I (invasión de la coroides)	4/1	Observación = 1 Quimioterapia = 4 (#)	Todos sobrevivieron libres de eventos	1 caso tuvo invasión de la esclera (#) Pacientes con enfermedad bilateral (n = 3) recibieron quimiorreducción para el tratamiento del otro ojo.
Estadio I (invasión postlaminar del nervio óptico)	1/3	Quimioterapia adyuvante = 4	Todos sobrevivieron libres de eventos	3 pacientes tenían invasión masiva concomitante de la coroides
Estadio II (tumor en el margen de resección del nervio óptico)	0/2	Quimioterapia adyuvante y radioterapia orbitaria = 2	1 paciente sobrevivió libre de eventos 1 paciente recayó en el LCR a los 10 meses (+)	(+) La EMD fue negativa en 2 muestras (la del diagnóstico y la de los 6 meses)
Estadio IVa (metastasis sistémica)	1/1	1 paciente: quimioterapia neo-adyuvante, enucleación, consolidación con RACM 1 paciente: exenteración orbitaria en otro Centro, quimioterapia seguida de consolidación con RACM (*)	1 paciente sobrevivió libre de eventos 1 paciente tuvo una recaída en SNC (masa en SNC) (*)	(*) Este paciente fue tratado con exenteración orbitaria en otro Centro como terapia inicial. No se realizó punción lumbar a la recaída en el LCR a los 12 meses debido a una hipertensión intra-cranial severa. El paciente desarrolló una fístula de LCR a partir de la cirugía orbitaria luego de la quimioterapia de inducción, por lo que sólo se contó con una sola muestra disponible para el estudio de la EMD.

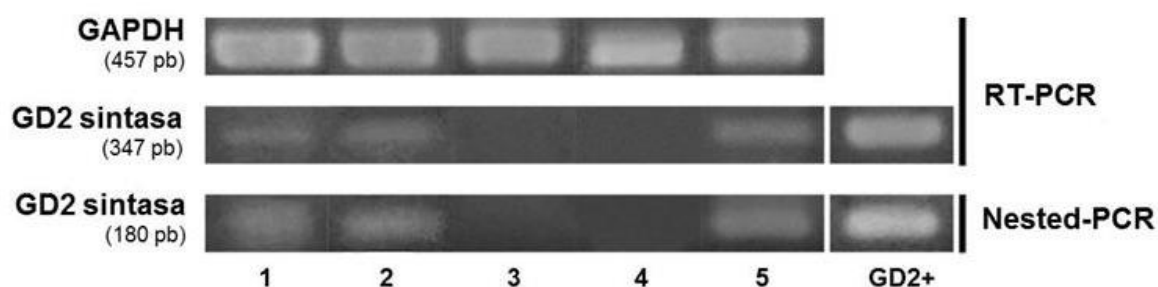


Figura N°14: Detección molecular del ARNm de la GD2 sintasa por RT-PCR y Nested-PCR a partir del LCR de un paciente representativo en estadio IVa. Se utilizó la secuencia del ARNm de la GAPDH como control de carga e integridad del ARN extraído. GD2+, control positivo (5 ng de ARN total de las células Y79).

Las calles 1-5 representan muestras tomadas en el tiempo del mismo paciente: 1, al diagnóstico; 2, a los 3 meses post-diagnóstico; 3, después de 4 ciclos de terapia de inducción; 4, 2 meses después de la consolidación con rescate autólogo con células madre (RACM) (10 meses post-diagnóstico); 5, al momento de la recaída evidente en el LCR. La citología convencional y la inmunocitología fueron positivas solamente en la calle 5 cuando el paciente ya tenía evidencia clínica y por imágenes de la recaída leptomenínea.

Factores clínicos asociados a la EMD

La presencia de EMD se correlacionó significativamente con el compromiso masivo del nervio óptico (tanto por tumor en el margen de resección quirúrgica, o en la enucleación inicial, como engrosamiento del nervio óptico en los estudios por imágenes al diagnóstico) y con historia de glaucoma (Tabla N°11).

Tabla N°11 - Análisis comparativo entre pacientes con enfermedad mínimamente diseminada (EMD detectada por RT-PCR del ARNm de la GD2 sintasa seguida de Nested-PCR), y pacientes con un resultado negativo

	RT-PCR o Nested-PCR positiva para la GD2 sintasa (n = 6)	RT-PCR y Nested-PCR negativa para la GD2 sintasa (n = 13)	p-valor
Edad media de ingreso al estudio	29.3	20.6	0.9
Bilateral/unilateral	1/5	6/7	0.2
Historia de glaucoma	5 (83.3%)	5 (38.4%)	0.01
Metástasis sistémica	2 (33.3%)	2 (15.4%)	0.3
Compromiso masivo del nervio óptico	3 (50%)	2/12* (16.6%)	0.01
Engrosamiento del nervio óptico al diagnóstico en los estudios por imágenes	3/5 (60%)*	0/11*	0.01
Infiltración perineural en el globo ocular enucleado	2/4 (50%)*	0/11*	0.05

*Información no disponible en todos los pacientes

Resultados clínicos según la presencia de la EMD

La probabilidad en 2 años de recaída en el LCR fue de 0.50 (95% intervalo de confianza (IC) = 0.13–0.88) para los pacientes con EMD en contraposición al 0.08 (95%, IC = 0.02–0.46) para aquellos con RT-PCR negativas de las evaluaciones de los LCR al diagnóstico (p = 0.03) (Figura N°15).

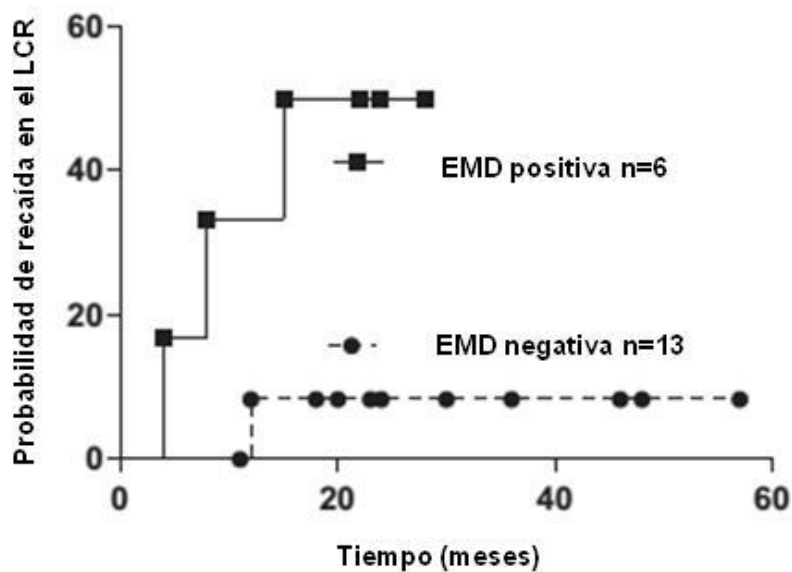


Figura N° 15: Probabilidad de recaída en el LCR según la presencia de la EMD determinada por la positividad de la expresión de la GD2 sintasa por RT-PCR y Nested-PCR ($p = 0.03$).

Discusión

Mediante el uso de técnicas moleculares, se pudo detectar por primera vez, según el conocimiento de los autores, la EMD en el LCR del diagnóstico en un conjunto de pacientes con retinoblastoma de alto riesgo. Este hallazgo estaría sugiriendo por primera vez en la literatura, que ya existe una diseminación oculta en el LCR al momento del diagnóstico en un sub-grupo de pacientes de mayor riesgo. Fue posible describir a partir de nuestros datos a este sub-grupo de pacientes con mayor riesgo ya que aquellos con invasión masiva del nervio óptico e historia de glaucoma estaban a un riesgo significativamente mayor. Este hallazgo se correlaciona con la experiencia clínica de un reporte que muestra que hasta 2/3 de los pacientes en estadio III y engrosamiento del nervio óptico visto por los estudios por imágenes recayeron en el SNC (Radhakrishnan et al, 2012). El compromiso masivo del nervio óptico también ya ha sido reportado previamente en asociación con glaucoma (Chantada et al, 2009 A; Shields C.L., 1994) y los cambios en la cinética del LCR en los pacientes con glaucoma reportados en otras condiciones (Killer et al, 2012) estarían favoreciendo las siembras tumorales en el LCR.

Las observaciones de nuestra cohorte de pacientes podrían ser de utilidad para la inferencia de patrones de diseminación. Uno de nuestros pacientes con estadio IVa (#1 Tabla N°9 y Figura N°14) tuvo EMD al diagnóstico pero se negativizó luego de la terapia de inducción; sin embargo se positivizó nuevamente en el estudio post-transplante cuando el paciente se encontraba en completa remisión clínica y asintomático. Esto fue el anuncio de la ocurrencia de una recaída evidente en el LCR un mes más tarde.

En el paciente #3, la EMD fue evidente en todos los LCR estudiados, teniendo una recaída leptomeníngea al poco tiempo. Otro paciente que presentaba buftalmia masiva, pero no evidencia de enfermedad extraocular, tuvo EMD detectada al diagnóstico. Generalmente, se utiliza quimioterapia pre-enucleación en este tipo de pacientes con el objetivo de poder realizar una enucleación más segura luego de la reducción de la masa tumoral (Bellaton et al, 2003). Por lo tanto, este último paciente fue tratado con quimioterapia inmediatamente luego del diagnóstico, lo cual debe haber sido beneficioso en cuanto al momento en que se trató la EMD, ya que se negativizó luego del tratamiento y el paciente permanece libre de enfermedad por más de 5 años. Considerando todos estos datos, es posible que un resultado positivo para la EMD pudiera estar prediciendo la recaída clínica en el LCR si se estudian muestras seriadas. Este hecho también fue observado en la cohorte estudiada con CRX.

Aunque todos nuestros pacientes con estadios II–IVa fueron secuencialmente evaluados, la población en estadio I y factores de alto riesgo que puede ser evaluada en serie fue limitada debido a restricciones en la obtención de las muestras de LCR en los exámenes de seguimiento. Por lo tanto, si bien fueron incluidos todos los pacientes con evaluaciones seriadas de los LCR durante el período, los pacientes con enfermedad bilateral estuvieron sobre-representados debido a que la serie de LCR podía ser obtenido bajo anestesia durante el seguimiento en esos casos. Además, habría un sesgo en la selección en los pacientes con bajo riesgo. Debido a que todos los pacientes indiferentemente de su status respecto a la EMD recibieron terapia intensiva, esto hizo que sea imposible estimar con exactitud el valor positivo predictivo de la recaída en el LCR. En otras palabras, no fue posible probar que todos los pacientes con EMD recaerían eventualmente debido a que todos ellos habían recibido tratamiento intensivo.

Por un lado se encontró que, en contraposición a un LCR positivo por citología convencional el cual es, en la práctica, invariablemente fatal, una proporción de pacientes con EMD podía ser salvado con tratamiento intensivo. Por lo tanto, el potencial metastásico de algunas células tumorales o la carga tumoral puede ser afectado por el tratamiento, por lo que la identificación temprana de la EMD debería ser usada para dictaminar una terapia más intensiva en estas poblaciones seleccionadas.

Por otro lado, también se observó que el valor negativo predictivo del test fue alto, aún en la población de alto riesgo. La recaída en el LCR ocurrió en solamente 1 de los 13 pacientes con EMD al diagnóstico. No obstante, la RT-PCR para el ARNm de la GD2 sintasa no fue informativa en cerca de 1/4 de nuestros pacientes, ocurriendo la recaída en el LCR en 2 de ellos. Es posible que esto último esté relacionado a limitaciones en el estudio de la EMD, tales como la escasa celularidad del LCR, el poco volumen de la muestra obtenida, y el escaso número de muestras analizados para cada paciente. Debido a que en el momento del diseño del estudio, la presencia de la EMD en el LCR era incierta, sólo obtuvimos un número limitado de muestras de LCR con la intención de disminuir el riesgo del paciente. Por eso, la obtención de un mayor volumen de LCR o la obtención repetitiva de muestras podrían aumentar no sólo el número de estudios informativos, sino también la sensibilidad del test (Glantz et al, 1998).

Además, la expresión basal de la GD2 en las células no malignas (Hersey et al, 1988) también podría estar arrojando resultados falsos positivos. Asimismo, la presencia de tumores que no expresan la GD2 sintasa, como se reportó previamente para el neuroblastoma, también puede ocurrir (Schumacher-Kuckelkorn et al, 2005), lo cual podría dar resultados falsos negativos. Si bien el valor negativo predictivo en este estudio fue elevado, debería ser confirmado mediante el estudio de pacientes de bajo riesgo que no fueron incluidos en este estudio ya que no se les hizo ninguna evaluación a su LCR.

El resultado de este estudio, mostrando que la EMD está presente en el LCR al momento del diagnóstico en pacientes de alto riesgo sirvió como eje para el siguiente estudio que evalúa muestras secuenciales y el uso de técnicas más sensibles tales como la qPCR en tiempo real para una combinación de marcadores en la cohorte de mayor

riesgo. Como se reportó previamente en una cohorte menor (Shen et al, 2012; Chantada et al, 2006 A) el uso de inmunocitología para GD2 (en conjunto con la determinación de células CD45–CD56+ por citometría de flujo) permitió una caracterización rápida y confiable de las células malignas en todos nuestros casos con recaída en LCR. No obstante, no es adecuada para la determinación de la EMD ya que se requiere la presencia de un mínimo número de células en el LCR (Urbanits et al, 2002; Bommer et al, 2011).

En conclusión, los resultados obtenidos en esta parte del trabajo deben ser considerados como una prueba de concepto de que la EMD está presente en el LCR de pacientes con retinoblastoma sin compromiso del SNC al diagnóstico y, especialmente, en aquellos quienes presentan compromiso masivo del nervio óptico y glaucoma. Aunque estos últimos tienen un mal pronóstico, algunos pueden ser salvados mediante terapia intensiva, lo que justificaría un trabajo más intensivo en la toma de muestras para una estimación más precisa del riesgo.

USO DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN DE CONOS Y BASTONES (CRX) COMO MARCADOR MOLECULAR EN EL RETINOBLASTOMA METASTÁSICO

En el capítulo anterior, se mostró que la EMD es detectable al momento del diagnóstico en el LCR de pacientes con invasión masiva del nervio óptico y glaucoma. (Laurent et al, 2013). En dicho estudio se utilizó a la GD2 sintasa como marcador molecular de la EMD, cuyo uso ha sido extendidamente reportado para el neuroblastoma, como se comentó anteriormente. Sin embargo, se ha detectado la expresión del gangliósido GD2 en células normales, por lo que existe un *background* de expresión cuando se utilizan metodologías más sensibles; esto limita su especificidad en los compartimientos biológicos de alta celularidad tales como la MO (Beiske et al, 2009; Stutterheim et al, 2008; Martinez C. et al, 2007). Por lo tanto, fue necesaria la identificación de un biomarcador que pudiera ser utilizado en la MO con alta sensibilidad y especificidad.

Visto que el retinoblastoma deriva de precursores retineanos, el poder contar con marcadores de expresión génica linaje-específicos de estos, sería de gran utilidad para la detección de células tumorales en tejidos no vinculados al ojo. Entre este tipo de marcadores candidatos se encuentra el CRX, un factor de transcripción de tipo Otx que es expresado tanto en conos como en bastones de la retina y ha sido reportado también en el retinoblastoma (Boatright et al, 2001; Glubrecht et al, 2009; Santagata et al, 2009; Terry et al, 2012; Xu et al, 2009). El CRX provoca la activación de varios genes en ambos tipos de fotorreceptores, siendo fundamental para la diferenciación celular de ambos y para el mantenimiento de las vías regulatorias de la transcripción durante el desarrollo de la retina normal. Dado que su expresión está restringida a los precursores de los fotorreceptores y es de relevancia en la funcionalidad del linaje celular retiniano, el objetivo de esta sección del trabajo fue estudiar al ARNm del CRX como marcador molecular no sólo para la evaluación del diagnóstico, sino también para la determinación del EMD.

En consecuencia, los objetivos de este estudio fueron:

- Evaluar la utilidad de la detección del ARNm del CRX como marcado linaje-específico mediante la técnica de RT-qPCR en MO, SP y LCR para la identificación de células tumorales infiltradas en el retinoblastoma metastásico.
- Evaluar el rol de ARNm del CRX como marcador de la EMD para identificar y analizar la cinética y patrones de respuesta al tratamiento y de recidiva de la enfermedad.
- Integrar esta información para establecer patrones de diseminación de la enfermedad en los diferentes escenarios clínicos.

Resultados

Prueba de la expresión de la GD2 sintasa en MO control

Como resultado del estudio de las 30 muestras de MO control de pacientes con enfermedades de tipo no retinoblastoma por RT-qPCR para la GD2 sintasa, se encontró que tenían niveles muy reducidos de expresión (mayores al ciclo 36), presentando desvíos estándar mucho mayores a 0.5 entre las réplicas de cada muestra del ensayo. En los casos donde se vio una aparente amplificación en un ciclo bajo (ciclo 23, por ejemplo) en sólo una de las réplicas, se pudo observar se correspondían con “*creeping curves*”, las cuales se definen como curvas de amplificación a partir de una muestra negativa, la cual “levanta” lentamente durante la reacción de PCR. (Gabert et al, 2003). Si bien no se conoce el mecanismo subyacente a este fenómeno, cuando se analizó la vista multicomponente de resultados se pudo ver que no se trataba de amplificaciones específicas.

Expresión del ARNm del CRX en tumores y líneas celulares de retinoblastoma

Tanto en los 17 tumores de retinoblastoma estudiados como en ambas líneas celulares de retinoblastoma Y79 y WERI-Rb1 se detectó una elevada expresión de CRX. Los valores de la expresión relativa del ARNm de CRX en los tumores fueron de 8.1×10^{-5} to 5.6 (promedio, 0.86; σ : 1.3) (Figura N°16, página siguiente), siendo el Ct medio de CRX observado en los mismos de 29 (rango de Ct de 19 – 34, σ : 5.8) y en las 1000 WERI-Rb1 el Ct medio fue de 26 (rango de Ct de 25 – 27, σ : 1.4).

Expresión del ARNm del CRX en MO normal

El ARNm del CRX no fue detectado en ninguna de las 47 muestras de MO de pacientes con otras patologías diferentes al retinoblastoma, siendo detectada sólo la amplificación del gen normalizador GADPH; por lo tanto, no hubo necesidad de establecer un umbral de separación entre la expresión de CRX debida a la presencia de la EMD y la expresión basal del mismo, ya que no la posee, siendo entonces toda expresión específica de CRX considerada como positiva.

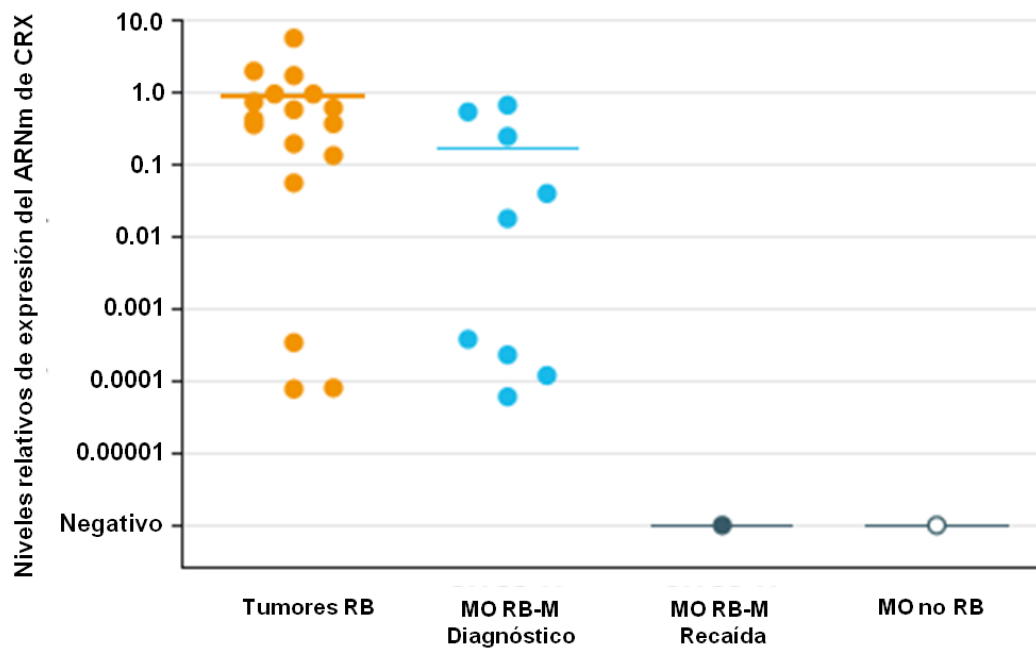


Figura N°16: Niveles relativos de expresión del ARNm del CRX en tumores de retinoblastoma (RB) y en muestras de MO de pacientes con RB metastásico (RB-M) al diagnóstico, pacientes con recaída metastásica, y pacientes sin RB. Los puntos anaranjados representan los tumores RB; los puntos celestes representan las MO con enfermedad metastásicas al diagnóstico; el punto gris representa la MO de pacientes con RB con recaída en el LCR; el punto blanco representa las MO de pacientes sin RB; las líneas horizontales representan el valor promedio de cada grupo.

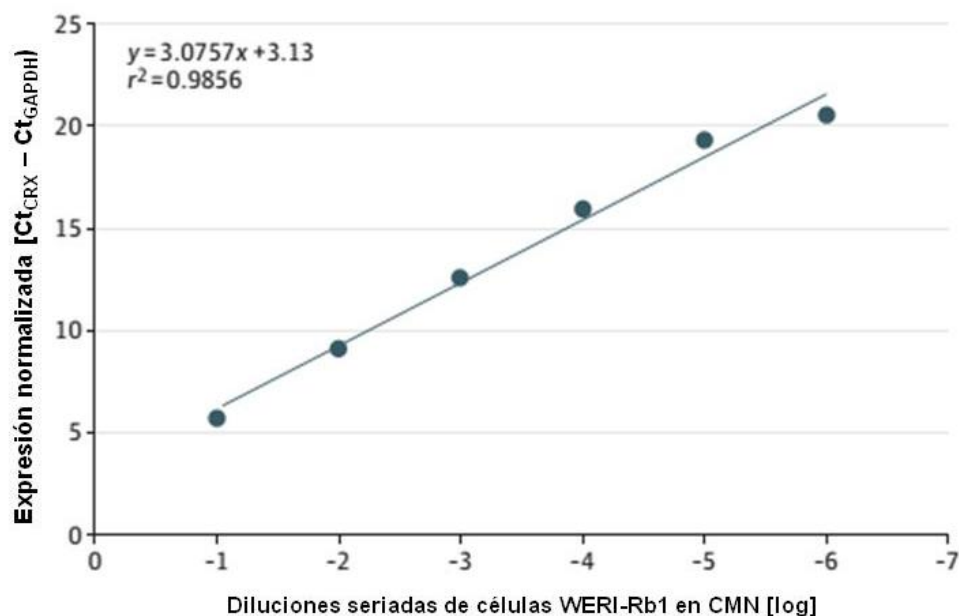


Figura N°17: Límite de detección de CRX determinado mediante la dilución de células WERI-Rb1 en células mononucleares normales (CMN). La sensibilidad fue de 1 célula tumoral en 10^7 CMN (10^{-7}), y el rango cuantitativo fue de 1.0×10^{-1} a 1.0×10^{-5} ($r^2 = 0.9856$). La ecuación de la recta fue $y = 3.0757x + 3.13$. Ct representa el ciclo umbral (*cycle threshold*).

Límite de detección (LOD) del ARNm del CRX

El LOD de CRX fue equivalente a 1 WERI-Rb1 en 1×10^7 CMN (10^{-7}) (10^{-7} o niveles relativos de expresión (NRE) del ARNm del CRX, 3.11×10^{-5}), y el rango cuantitativo fue de 1 WERI-Rb1 en 1×10^1 CMN hasta 1 WERI-Rb1 en 1×10^5 CMN (10^{-1} hasta 10^{-5} ya que la linealidad se pierde en la última dilución) ($r^2 = 0.9856$) (Figura N°17, página anterior).

Descripción de los pacientes

El estudio incluyó a un total de 17 pacientes con retinoblastoma metastásico, de los cuales 5 eran bilaterales. Nueve (9) pacientes tenían metástasis diagnosticada al inicio de la enfermedad (Tabla N°12) y los restantes 8 fueron incluidos al momento de un evento de recaída metastásica (Tabla N°13) luego del diagnóstico de retinoblastoma no metastásico.

Todos los pacientes con diagnóstico inicial de la enfermedad metastásica tenían invasión de MO demostrada por la biopsia y 2 de ellos tenían invasión del SNC concomitante con compromiso quiasmático, pero LCR normal según la citología. Seis (6) pacientes en este grupo se presentaron con masas orbitarias masivas, por lo que recibieron quimioterapia neoadyuvante y enucleación secundaria luego de 4 ciclos de quimioterapia intensiva; los restantes 3 fueron enucleados al inicio ($n = 2$) o exenterados en otro centro médico ($n = 1$) y la enfermedad metastásica fue diagnosticada luego de la evaluación de la enfermedad. Ambos pacientes enucleados tenían invasión tumoral en el margen de resección quirúrgica del nervio óptico. Ningún tumor estuvo disponible para revisión en el caso de las exenteraciones en los otros centros.

De los 9 pacientes con enfermedad metastásica al diagnóstico, uno murió por toxicidad provocada por la quimioterapia luego del primer ciclo, y 7 llegaron a remisión completa con quimioterapia y remoción quirúrgica del tumor ocular primario. El resultado clínico de los pacientes puede verse en la Tabla N°12. El paciente restante, con compromiso quiasmático, tuvo una respuesta mixta luego de 2 ciclos de inducción, consistente en enfermedad estable en la masa orbitaria y remisión completa en la MO; sin embargo, la paciente evolucionó rápidamente hacia la enfermedad progresiva y

murió por diseminación meníngea en el LCR luego del tercer ciclo de quimioterapia. De los 7 pacientes que tuvieron una remisión completa con la quimioterapia, 4 permanecieron en remisión completa y libres de enfermedad. Los restantes 3 pacientes (2 con compromiso inicial del SNC y el paciente que había sido exenterado en otro centro de salud) fallecieron debido a que recayeron en el LCR en dos de los casos y por hemorragia en SNC en el caso restante.

Del total de 8 pacientes incluidos tras la recaída metastásica, todos se habían presentado con enfermedad no metastásica pero tuvieron recaída en SNC en un promedio de 12 meses (rango de 6 a 27 meses) luego del diagnóstico (Tabla N°13). En un caso, la recaída en LCR fue precedida por una recaída orbitaria inicial. En 7 de los casos, la recaída abarcó el compromiso del LCR y una masa tumoral en el quiasma con LCR normal en el caso restante. No hubo compromiso evidente en la biopsia de la MO en ninguno de estos casos. Dos (2) de estos pacientes tuvieron una segunda remisión completa con quimioterapia sistémica intensiva y quimioterapia intratecal. No obstante, ocurrió una segunda recaída al LCR, siendo la MO aún normal en uno de los casos (el caso restante no fue estudiado debido a la decisión de los padres). Ninguno de los pacientes de este subgrupo sobrevivió. Siete de ellos murió por progresión de la enfermedad en SNC y uno por un episodio de sepsis neutropénica.

Tabla N°12 - Descripción de los pacientes incluidos con enfermedad metastásica al diagnóstico

Paciente N°/Lateralidad	Sitio metastásico al ingreso	Estado al ingreso		LCR			Estado luego de la inducción		LCR			Tratamiento	Resultado clínico
		MO	IC (GD2)	CRX	Citología	Análisis CRX/GD2	MO	IC (GD2)	CRX	Citología	Análisis CRX/GD2		
1/Unilateral	MO	+	+	+ mRNA NRE, 4×10^{-4}	-	NE ^a	RC-	-	-	-	- (GD2- nested PCR)	Quimioterapia intensiva de inducción y consolidación con RACM	Vivo, en RC (38 meses)
2/Bilateral	MO y órbita	+	+	+ mRNA NRE, 6×10^{-5}	-	NE ^a	RC-	-	-	-	NE ^a	Quimioterapia intensiva de inducción y consolidación con RACM	Vivo, en RC (70 meses)
3/Unilateral	MO, órbita, y nódulos linfáticos	+	+	+ mRNA NRE, 2.45×10^{-1}	-	- (GD2- nested PCR)	RC-	-	-	-	NE ^a	Quimioterapia intensiva de inducción y consolidación con RACM	Recaída en SNC; Masa quiasmática con LCR-; MO- con EM-; terapia paliativa
4/Unilateral	MO y órbita	+	+	+ mRNA NRE, 4.0×10^{-2}	-	- (GD2- nested PCR)	NR	NR	NR	NR	NR	Quimioterapia intensiva de inducción	Muere por toxicidad luego del 1° ciclo de quimioterapia
5/Unilateral	MO y órbita	+	+	+ mRNA NRE, 1.7×10^{-2}	-	+ (CRX mRNA REL, 1.8)	RC-	-	-	-	NE ^a	Quimioterapia intensiva de inducción y consolidación con RACM	Vivo, en RC (28 meses)
6/Unilateral	MO	+	+	+ mRNA NRE, 1.2×10^{-4}	-	+ (GD2- nested PCR)	RC-	-	-	-	- (GD2- nested PCR)	Quimioterapia intensiva de inducción y consolidación con RACM	Recaída en SNC con compromiso del LCR; MO- con EM-; Terapia paliativa y muerte ^b

7/Unilateral	MO y órbita	+	+	+ mRNA NRE, 5.2×10^{-1}	-	- (GD2- nested PCR)	RC-	-	-	-	- (GD2- nested PCR)	Quimioterapia intensiva de inducción y consolidación con RACM	Vivo, en RC (1 mes)
8/Unilateral	MO, órbita, y SNC (masa quiasmática)	+	+	+ mRNA NRE, 2.3×10^{-4}	-	NE ^a	RC-	-	-	-	- (GD2- nested PCR)	Quimioterapia intensiva de inducción	Muere por hemorragia en SNC en el periodo post- transplante
9/Bilateral	MO, órbita, y SNC (masa quiasmática)	+	+	+ mRNA NRE, 6.7×10^{-1}	-	+ (GD2- nested PCR)	RC-	-	-	-	+ (GD2- nested PCR)	Quimioterapia intensiva de inducción descontinuada por efectos tóxicos inaceptables y adherencia familiar pobre	Progresión al SNC con diseminación leptomeningea y muerte

^a No evaluable debido a que no hubo rendimiento de ARN en la extracción o el ARN se encontraba dañado.

^b LCR positivo antes de la recaída clínica.

Abreviaciones: RACM, rescate autólogo con células madre; MO, médula ósea; LCR, líquido cefalorraquídeo; RC, remisión completa, CRX, cone-rod homeobox; GD2, disialogangliósido GD2; IC, inmunocitología; DM, Diseminación mínima; ARNm, ARN mensajero; NR, no realizado; NE, no evaluable (GAPDH negativo); PCR, reacción en cadena de la polimerasa; NRE, Niveles relativos de expresión; +, positivo; -, negativo.

Tabla N°13 - Descripción de los pacientes incluidos tras la recaída metastásica

		Estado al ingreso			Estado luego de la inducción								
		MO		LCR					LCR				
Paciente Nº/Lateralidad	Secuencia de la terapia previa	Biopsia/ Citología	IC (GD2)	CRX	Citología	Análisis CRX/GD2	Citología	IC (GD2)	CRX	Citología	Análisis CRX/GD2	Tratamiento de la recaída en el SNC	Resultado clínico
10/Unilateral	Enucleación- quimioterapia adyuvante y radioterapia orbitaria	-	-	ND	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	Terapia intratecal paliativa	Muere por progresión de la enfermedad en SNC
11/Bilateral	Quimiorreducción, radioterapia de haz externo (EBRT), enucleación y terapia adyuvante	-	-	NE ^a	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	Quimioterapia intensiva	Muere por toxicidad
12/Unilateral	Masa quiasmática al ingreso; terapia neoadyuvante, enucleación- quimioterapia adyuvante, y radioterapia orbitaria	-	-	-	Dudoso	+	NR	NR	NR	+	+	Topotecan (como hidrocloruro) intravenoso	Muere por progresión de la enfermedad en SNC
13/Unilateral	Enucleación- quimioterapia adyuvante	-	-	-	Dudoso	+	-	-	-	-	NE ^a	Quimioterapia intensiva y Topotecan intratecal	Muere por recaída de la enfermedad en LCR
14/Bilateral	Quimiorreducción, quimioterapia intra-arterial y enucleación ante recaída orbitaria	-	-	-	Dudoso	+	-	-	-	-	-	Quimioterapia sistémica, Radioterapia craneal, y topotecan intratecal	Muere por progresión de la enfermedad en SNC
15/Unilateral	Enucleación-	-	-	-	+	+	-	-	-	NR	NR	Tratamiento	Muere por

	quimioterapia adyuvante y radioterapia orbitaria					(IC para GD2)						paliativo	progresión de la enfermedad en SNC
16/Unilateral	Masa quiasmática al ingreso; terapia neoadyuvante, enucleación- quimioterapia adyuvante, y radioterapia orbitaria	-	-	-	-	- (GD2- nested PCR)	NR	NR	NR	NR	NR	Tratamiento paliativo	Muere por progresión de la enfermedad en SNC
17/Unilateral	Enucleación- quimioterapia adyuvante y radioterapia orbitaria	-	-	-	+	+ (IC para GD2)	NR	NR	NR	NR	NR	Tratamiento paliativo	Muere por progresión de la enfermedad en SNC

^a No evaluable debido a que no hubo rendimiento de ARN en la extracción o el ARN se encontraba dañado.

Abreviaciones: MO, médula ósea; LCR, líquido cefalorraquídeo; SNC, sistema nervioso central; CRX, cone-rod homeobox; GD2, disialogangliósido GD2; IC, inmunocitología; ARNm, ARN mensajero; NR, no realizado; NE, no evaluable (GAPDH negativo); Nested-PCR, reacción en cadena de la polimerasa anidada; NRE, Niveles relativos de expresión; EBRT, radioterapia de haz externo; +, positivo; -, negativo.

CRX como marcador tumoral en pacientes con evidencia histopatológica de invasión en MO

Tanto el ARNm de CRX como la inmunocitología para el gangliósido GD2 fueron positivas en los 9 casos metastásicos del estudio, confirmando la infiltración neoplásica en la MO. Los NRE del ARNm del CRX se presentaron en un rango de 6.0×10^{-5} to 0.67 (promedio, 0.17; σ : 0.26) (Figura N°16).

También la SP de estos pacientes resultó positiva para el ARNm del CRX, a pesar del hecho de que todos tuvieron un recuento celular normal y no presentaron evidencias de blastos circulantes. En 7 de los 8 casos estudiados (ya que uno falleció luego del primer ciclo de inducción con quimioterapia y no se contó con muestras disponibles) no se evidenció enfermedad mínima en las muestras de MO en ningún momento luego del primer ciclo de quimioterapia, ya que se negativizaron para ambos, la RT-qPCR para CRX y la inmunocitología para GD2, permaneciendo por debajo del nivel de detección de ahí en más tanto antes de la consolidación con alta dosis y con RACM hasta la reconstitución hematopoyética a los 2 meses y 1 año luego del trasplante. En el paciente restante el CRX se negativizó luego de 2 ciclos en la MO pero sufrió una recaída en el LCR luego del tercer ciclo (determinado por Nested-PCR para GD2 sintasa). Ninguno de los pacientes tuvo recaída en la MO.

EMD en la MO de pacientes con recaída en el LCR

Se evaluaron un total de 11 episodios de recaída en el LCR en 9 pacientes con retinoblastoma. De estos, 7 pacientes fueron incluidos en el estudio a la primera recaída en el LCR y 2 de estos casos tuvieron una segunda recaída en el LCR la cual fue también estudiada. Dos (2) pacientes quienes fueron incluidos en el grupo de pacientes que se presentaron con enfermedad metastásica al diagnóstico tuvieron una recaída en el LCR como primer evento y fueron también considerados para ser estudiados en esta sección. Se evaluó la MO en todos los casos recaídos recaídos en el LCR, las cuales resultaron negativas en el estudio morfológico. No hubo evidencia de enfermedad mínima ya que la inmunocitología para GD2 y el ARNm del CRX fue negativo en todas las instancias (Figura N°16). Un caso no fue estudiado debido a la decisión de los padres.

En 7 de estos episodios, se observaron células neoplásicas típicas en el LCR por evaluación morfológica, las cuales fueron identificadas y confirmadas como malignas mediante la inmunocitología para GD2. En 3 eventos, la citología resultó no ser conclusiva, por lo que las células neoplásicas fueron identificadas por Nested-PCR para GD2 sintasa o RT-qPCR para CRX (Los NRE para el ARNm de CRX fueron de 1.5 y 1.8). En uno de los casos, el LCR no fue evaluado (Tabla N°13).

Enfermedad mínima en el LCR de pacientes sin evidencia clínica de compromiso en LCR

Tres de 9 pacientes con enfermedad metastásica inicial tuvieron EMD en el LCR al diagnóstico (2 estudiados por RT-PCR y Nested-PCR para la detección de la GD2 sintasa y 1 por RT-qPCR para CRX, NRE: 1.87). De los que se presentaron con el LCR comprometido, sólo pudo evaluarse la enfermedad mínima en los 2 casos que alcanzaron una segunda remisión completa. Debido a que estos pacientes recibieron quimioterapia intratecal periódica, varias de las muestras estuvieron disponibles para su estudio. En uno de estos casos y en otro del grupo metastásico, luego de volverse negativos, la detección de la enfermedad mínima predijo la recaída en el LCR que ocurriría semanas después (NRE del ARNm de CRX: 1.5).

Discusión

En esta fase del estudio, se llevó a cabo la validación del CRX como marcador tumoral en sitios extraoculares. Mediante el uso de la tecnología basada en PCR en tiempo real pueden alcanzarse una alta sensibilidad y especificidad y, por lo tanto, este marcador fue seleccionado como de elección para ser utilizado para la evaluación de la enfermedad mínima ya que demostró poseer una alta expresión en tumores y no ser expresado en tejido normal, MO o SP (Stutterheim et al, 2009).

En la validación de CRX en MO de niños sin retinoblastoma, se mostró que este marcador no tiene expresión detectable en este tejido, es decir, que no presenta resultados falsos positivos en un amplio grupo de muestras control pero sí una expresión uniforme en retinoblastoma, no mostrando falsos negativos. Esto sugiere que el sistema de detección propuesto para la enfermedad mínima en el retinoblastoma mediante la

técnica de la RT-qPCR para el ARNm de CRX en MO infiltradas presenta tanto una especificidad como una sensibilidad del 100%. Sin embargo, el amplio rango de NRE del ARNm del CRX podría ser explicado por los diferentes grados de infiltración tumoral en cada pacientes (Stutterheim et al, 2012).

Además, se vio en la cohorte estudiada que las células tumorales de los pacientes que recayeron luego de múltiples ciclos con quimioterapia continuaron mostrando expresión del ARNm del CRX, hecho que permitiría su uso en la evaluación de la respuesta al tratamiento durante el curso de la enfermedad. Por lo tanto, en base también a lo reportado en publicaciones previas de otros grupos sobre su consistente expresión, (Boatright et al, 2001; Glubrecht et al, 2009; Santagata et al, 2009) el ARNm del CRX parece ser un marcado candidato ideal para la evaluación de la enfermedad mínima en el retinoblastoma. No obstante, los estudios basados en ARN poseen su limitación inherente debida a la limitada estabilidad de la molécula, a diferencia de las determinaciones a partir del ADN.

En contraposición a nuestra experiencia previa con GD2 sintasa, el ARNm del CRX se presenta como un marcador más específico para el retinoblastoma diseminado ya que no es expresado de manera basal en tejido normal. Del mismo modo, la inmunocitología para el gangliósido GD2 probó ser tan sensible como específica en la caracterización de células sospechosas infiltradas en la MO como malignas, siendo técnicamente menos compleja. Sin embargo, la RT-qPCR para el ARNm del CRX resultó ser más sensible en la evaluación del LCR en 2 casos con resultados inconclusos de la citología convencional y la inmunocitología para el gangliósido GD2.

Tal como se reportó para la RT-PCR seguida de una segunda ronda de amplificación por Nested-PCR para la GD2 sintasa (Laurent et al, 2013; Atlas et al, 1988), la enfermedad mínima puede ser detectada en el LCR mediante la expresión de CRX, anticipando la recaída en el LCR. No obstante, al igual que lo reportado con el uso de GD2 sintasa, el uso de la qPCR para la determinación de la EMD en el LCR presenta el desafío de los bajos rindes de ARN provenientes de los LCR acelulares, por lo que sería adecuada la utilización de más de una técnica para la obtención de un resultado confiable (Laurent et al, 2013).

Los resultados del presente estudio, además contribuyen al mejor entendimiento de la cinética de respuesta al tratamiento en el retinoblastoma metastásico como así también a inferir los mecanismos de la diseminación de la enfermedad. Con las terapias intensivas actuales, varios de los pacientes con retinoblastoma con metástasis sistémica que generalmente se presentan con invasión de la MO pueden ser curados siempre que no tengan comprometido el SNC, ya que la mayoría de las fallas de los tratamientos están relacionadas con las recaídas en el SNC aún en los pacientes con diseminación al SNC no evidente. El rápido y completo *clearance* de las células tumorales de la MO visto en la cohorte estudiada, apoya el concepto de que el control de la enfermedad sistémica es óptimo con la quimioterapia intensiva. Si bien la qPCR en tiempo real permite análisis cuantitativos, no fue posible realizarlos en la cohorte estudiada debido a que, luego del primer ciclo de quimioterapia, todos los pacientes respondedores en la MO mostraron valores por debajo de los niveles de detección del sistema no habiendo cambios durante el estudio.

Cuando hay compromiso del SNC, sin embargo, tanto al diagnóstico como en la recaída, la cura sigue siendo difícil aún utilizando estas terapias tan intensivas. En el capítulo anterior (Laurent et al, 2013), se mostró que la EMD está presente en el LCR al diagnóstico en una proporción considerable de los pacientes en alto riesgo. En este sentido, con el objetivo de poder intensificar la terapia dirigida preferencialmente al LCR o sistémica para mejorar los resultados, sería de gran importancia saber si el LCR presenta concomitantemente siembras al momento de la diseminación, como fue reportado en varios casos de leucemia linfoblástica aguda en niños (Biojone et al, 2012) o si se trata de un evento aislado confinado al SNC, y si cualquiera de ellos están ya presentes al diagnóstico o al momento de la recaída.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta parte del trabajo muestran claramente que la invasión de la MO no contribuye significativamente a la ocurrencia de la recaída en el LCR ya que no hubo ninguna evidencia de EMD en ninguno de los 11 episodios estudiados de recaída en el SNC. Es más probable que en la mayoría de los casos, el LCR se encuentre sembrado más tempranamente en el curso de la enfermedad, posiblemente desde el nervio óptico, y que estas células tumorales diseminadas no sean completamente erradicadas por la quimioterapia convencional en estos pacientes con

alto riesgo, desencadenando la recaída en el LCR, el cual actúa como un santuario para estas escasas células que logran escapar a la terapia efectiva (Atlas et al, 1988).

Por tanto, estos datos indicarían que la intensificación de la terapia dirigida al LCR con quimioterapia intratecal o intraventricular deberían considerarse de manera de mejorar los resultados en pacientes (Dimaras et al, 2011). La mayoría de los grupos (Dunkel et al, 2010) actualmente tratan al retinoblastoma metastásico en el SNC con quimioterapia sistémica intensiva y no quimioterapia intratecal, pero las tasas de supervivencia son inferiores al 30%. Si bien la quimioterapia intratecal, incluyendo metotrexato y citarabina fue utilizada ampliamente años atrás, (Schvartzman et al, 1996; Pratt, 1998) la mayoría de los grupos la discontinuó en favor de regímenes terapéuticos sistémicos más intensivos, en gran medida debido a la relativamente baja actividad de estas drogas en el retinoblastoma. Sin embargo, otras drogas más recientes que ya han sido testeadas para la quimioterapia intratecal en el retinoblastoma, tales como el topotecan clorhidrato, podrían ser buenos candidatos en vista de nuestros hallazgos (Dimaras et al, 2009; Potter et al, 2012).

En nuestra población de 9 pacientes con metástasis sistémica no fue observado ningún caso de enfermedad mínima residual y la MO se negativizó luego de la quimioterapia de inducción, aún a nivel molecular. Por lo tanto, el rol de la enfermedad mínima en la MO luego de la quimioterapia de inducción en el pronóstico clínico sería menos relevante en el retinoblastoma que en el neuroblastoma, el cual es menos quimiosensible. No obstante, hay que tener en cuenta que en el neuroblastoma (Pratt, 1998) esto ha sido estudiado en miles de pacientes, por lo que se requerirían estudios de mayores cohortes y más información para poder rechazar definitivamente esta hipótesis en el retinoblastoma.

En conclusión, el ARNm del CRX fue identificado como un biomarcador novedoso en el retinoblastoma diseminado de interés para la detección de la EMD y como herramienta para mejorar la identificación de células tumorales en sitios extraoculares. Mediante su uso, pudimos observar que la recaída en LCR no estaría relacionada con la diseminación sistémica concomitante del retinoblastoma.

USO DEL CRX COMO MARCADOR DE LA ENFERMEDAD MÍNIMAMENTE DISEMINADA EN EL RETINOBLASTOMA NO METASTÁSICO

En esta última etapa de mi trabajo, se implementó el conocimiento adquirido en los capítulos anteriores en el estudio de una cohorte más grande de pacientes afectados de retinoblastoma de alto riesgo en nuestro país y aquellos en quienes se concentran el mayor número de fatalidades. Las características que definen a esta población de alto riesgo se establecen en el estudio histopatológico del globo ocular enucleado (Sastre et al, 2009) e incluyen: la invasión de la porción postlaminar del nervio óptico (del inglés: PLONI), invasión masiva de la coroides e invasión de la esclera (Aerts et al, 2013; Chantada et al, 2010). Otras características, tales como la invasión del segmento anterior, invasión corioidea focal, o la invasión prelaminar, generalmente dadas de manera combinada, son consideradas como características de alto riesgo, garantizando la terapia adyuvante obligada, según algunos, pero no todos los grupos (Aerts et al, 2013; Kaliki et al, 2011). En la teoría, para que estos pacientes sufran una recaída extraocular, la EMD debería estar presente tempranamente en el curso de la enfermedad por lo cual, si no es tratada o es resistente al tratamiento, desencadenará la recaída tumoral. La diseminación extraocular puede ocurrir también en casos tratados inicialmente con esquemas conservadores de la visión, pero poco se conoce acerca del patrón de diseminación en estos casos (Chantada et al, 2007 B) debido a no es posible estimar el riesgo ya que el tumor no está disponible para un estudio patológico. Para las terapias conservativas, los grupos de tratamiento están migrando desde la quimiorreducción sistémica hacia los tratamientos oculares localizados (Shields C.L., 2013). Estas terapias localizadas poseen muy pequeño efecto o ningún efecto en lo absoluto a nivel sistémico, por lo que, en teoría, la EMD quedaría no tratada (Levin et al, 2011). Sin embargo, los casos de diseminación metastásica son muy infrecuentes (Gobin et al, 2011), por lo que podría decirse que la EMD sería muy improbable en estos casos.

Aplicando los conocimientos adquiridos en el estudio de la enfermedad metastática, mediante la evaluación con qPCR del ARNm del CRX, mostramos que el

mismo tiene una gran sensibilidad a la vez que una alta especificidad ya que sólo es expresado por células de origen retiniano (Torbidoni et al, 2015; Glubrecht et al, 2009).

En base a esta información, se plantea la hipótesis de si la EMD es detectable y, en caso de serlo, si sería una herramienta útil para una estimación más precisa del riesgo de recaída metastásica en pacientes con retinoblastoma no metastásico y factores de riesgo en la histopatología. Entonces, en esta parte del trabajo se realizó una evaluación prospectiva en pacientes no metastásicos del ARNm del CRX para la detección de la EMD mediante una RT-qPCR con el objetivo de:

- Evaluar si la EMD es detectable en sitios extraoculares en pacientes con retinoblastoma y factores de riesgo en la histopatología, cuando se supone que la enfermedad es intraocular,
- Detectar cuáles características clínicas o patológicas están relacionadas o son predictoras de la EMD,
- Evaluar el impacto pronóstico de la EMD sobre la SLE de los pacientes con retinoblastoma y factores de riesgo en la histopatología.

Resultados

Datos clínicos

Un total de 192 pacientes con retinoblastoma intraocular fueron evaluados en el Hospital Garrahan durante el período de estudio (Mayo 2007 y Octubre 2013).

Al momento de la admisión, todos los padres/tutores responsables firmaron un consentimiento informado permitiendo el uso de muestras y datos clínicos para investigación. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética institucional del Hospital J.P. Garrahan y todos los procedimientos fueron llevados a cabo bajo los estándares éticos de la Declaración de Helsinki, como se aclaró anteriormente.

Un total de 107 pacientes que cumplían con los criterios de inclusión (enfermedad intraocular con factores de riesgo en la patología) fueron incluidos al estudio. De todos estos, 11 pacientes fueron evaluados únicamente por inmunocitología para GD2, debido a que no se contó con el consentimiento para el uso del material en 8 pacientes y por el hecho de que el material almacenado no fue adecuado para el estudio de la EMD por PCR en otros 3 casos. En todos estos pacientes, la inmunocitología para GD2 resultó negativa y, ninguno tuvo eventos de recaída extraocular. Los restantes 96 pacientes pudieron ser evaluados de manera completa (Figura N°18); sin embargo, no fue posible obtener ARN a partir de las muestras de LCR al diagnóstico en 35 pacientes (36.4%). De los 96 pacientes, 70 (83.3%) fueron evaluados al momento del diagnóstico y 16 (16.6%) luego de la enucleación secundaria tras la recaída intraocular al fallar la terapia conservativa.

La quimioterapia para la preservación del ojo incuyó: quimiorreducción sistémica con vincristina, etopósido y carboplatino en 12 pacientes (seguido de quimioterapia intra-arterial o quimioterapia intravítrea en 3 casos) y sólo quimioterapia intra-arterial incluyendo una combinación de topotecan, carboplatino y melfalan en 4 pacientes. Doce pacientes recibieron quimioterapia neoadyuvante debido a la presencia de una buftalmia masiva al diagnóstico.

Veintiseis (27.1%) tenían tumores bilaterales y 70 (72.9%), unilaterales. La relación Mujer/Varón fue de: 0.89. La edad promedio al momento de la inclusión al estudio fue de 26 meses (rango, 1 a 168).

Los factores de riesgo en la histopatología incluyeron invasión coroidea aislada masiva en 14 pacientes, PLONI en 51 casos (26 de ellos con invasión coroidea masiva concomitante y 13 con invasión de la esclerótica del ojo), y 12 con invasión de la esclera sin PLONI. Siete pacientes tenían tumor en el margen de resección quirúrgica del nervio óptico. La quimioterapia adyuvante se describe en la Tabla N°14 y en la Figura N°18.

Tabla N°14 - Guías de tratamiento según los factores de riesgo en la patología

Subgrupo	Tratamiento	Descripción
Invasión aislada de la coroides	No terapia adyuvante	
Invasión del segmento anterior	No terapia adyuvante	
Invasión post-laminar aislada del nervio óptico (<1 mm)	No terapia adyuvante	
Invasión Post-laminar del nervio óptico (>1 mm) o en combinación con invasión masiva de la coroides o escleral	Quimioterapia Adyuvante	Régimen A Etopósido 100 mg/m² (3.3 mg/kg) días 1-3 en los ciclos 1, 3,5 y 7. Carboplatino 500 mg/m² (18 mg/kg) días 1 y 2 en los ciclos 1, 3, 5 y 7. Régimen B Vincristina 1.5 mg/m² (0.05 mg/kg) día 1 en los ciclos 2, 4, 6 y 8. Ciclofosfamida 65 mg/kg, en día 1 en los ciclos 2, 4, 6 y 8. Idarubicina 10 mg/m² en día 1 en los ciclos 2, 4, 6 y 8.
Buftalmia masiva	Quimioterapia Pre-enucleación (2-3 ciclos) seguida de quimioterapia adyuvante (total 8 ciclos)	Los mismos regímenes de quimioterapia
Tumor en el margen de resección quirúrgica del nervio óptico	Quimioterapia adyuvante Radioterapia Orbital (*)	Régimen A y B más radioterapia orbital (n = 4) Protocolo COG0321 y no radioterapia orbital (n = 3)

(*) Dosis de radiación orbital 45 Gy a órbita incluyendo el quiasma.

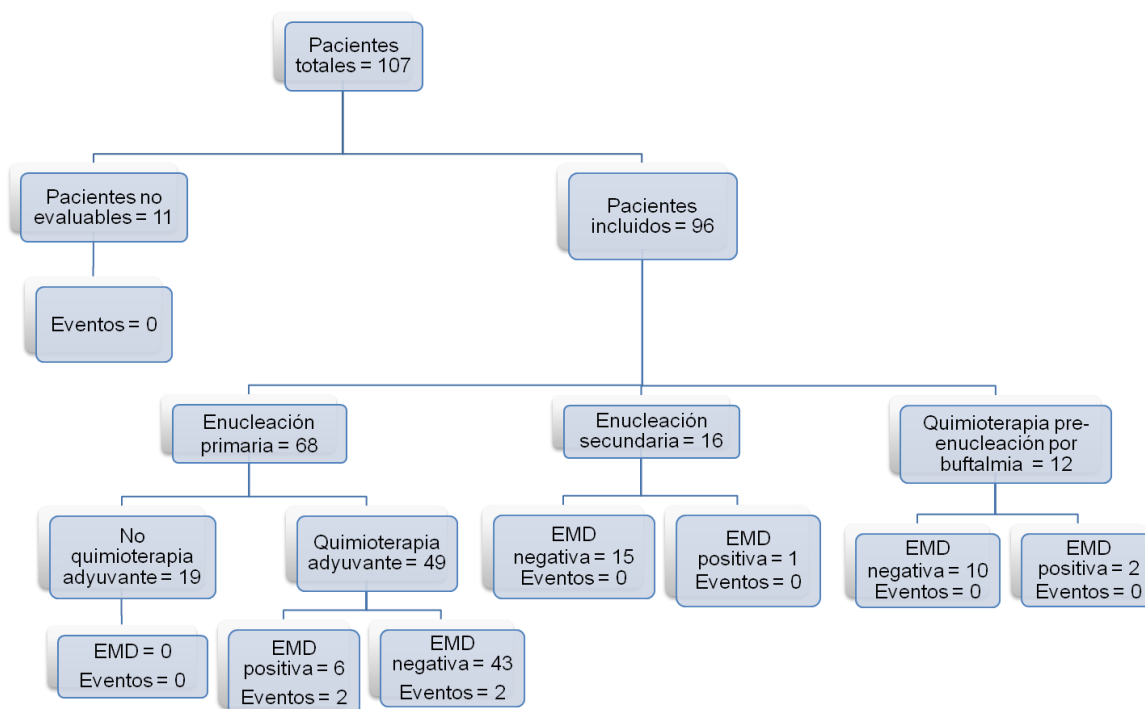


Figura N°18: Diagrama de flujo esquemático de los pacientes incluidos en el estudio según categoría de riesgo, tratamiento, resultado clínico, y presencia de enfermedad mínimamente diseminada (EMD).

Además, se pudo obtener material a partir de 18 pacientes adicionales sin factores de riesgo en la histopatología quienes fueron considerados como una cohorte observacional que no fue incluida en el estudio. Ninguno recibió ninguna terapia oncológica luego de la enucleación. Ninguno tuvo la EMD y ninguno recayó.

De los pacientes evaluados al diagnóstico, 61 (76.3%) tenían un ojo que pertenecía al grupo E y 18 (33.7%) al grupo D (Murphree, 2005). Esta información no estuvo disponible en uno de los pacientes. Cuarenta y tres pacientes del grupo E (70.5%) tenía glaucoma y/o buftalmia, características que estaban ausentes en 17 (27.9%) pacientes, mientras que dicha información no estuvo disponible en 2 casos (1.6%).

Pacientes con EMD

Nueve pacientes presentaron la EMD (9.4% de la población) (Tabla N°15). Siete de estos casos mostraron evidencia de la EMD a partir de la positividad del ARNm del CRX detectado en la MO (rango de niveles relativos de expresión: 0.00007-0.0034), situación que se revirtió tras la terapia adyuvante en las muestras de MO consecutivas.

Los 2 pacientes restantes tuvieron una determinación de la expresión de la GD2 sintasa positiva en el LCR al diagnóstico, siendo la MO negativa tanto para la expresión del ARNm del CRX como para la inmunocitología para la GD2.

Tabla N°15 - Descripción clínica y resultado clínico de pacientes con la EMD

Paciente/ Lateralidad	Patología	Tratamiento	EMD	Resultado clínico
1/Unilateral	Tumor en el margen de resección del nervio óptico, invasión masiva de la coroides	Quimioterapia adyuvante y radioterapia orbital	LCR (Positivo para GD2 sintasa)	VLE (61 meses)
2/Unilateral	Tumor en el margen de resección del nervio óptico, invasión masiva de la coroides	Quimioterapia adyuvante y radioterapia orbital	MO (Positivo para el ARNm del CRX, NRE: 1.74×10^{-4})	Recaída en SNC
3/Bilateral (*)	Compromiso Post-laminar del nervio óptico, invasión masiva de la coroides, invasión intra-esclera	Quimioterapia adyuvante	MO (Positivo para el ARNm del CRX, NRE: 4.0×10^{-5})	VLE (58 meses)
4/Unilateral	Tumor en el margen de resección del nervio óptico, invasión masiva de la coroides, invasión intra-tecal	Quimioterapia adyuvante y radioterapia orbital	MO (Positivo para el ARNm del CRX, NRE: 3.4×10^{-3})	VLE (64 meses)
5/Unilateral	Tumor en el margen de resección del nervio óptico, invasión masiva de la coroides, invasión	Quimioterapia adyuvante	MO (Positivo para el ARNm del CRX, NRE: 3.85×10^{-4})	Recaída en el SNC
6/Unilateral	No evaluable debido a quimioterapia pre-enucleación	Quimioterapia adyuvante	LCR (Positivo para GD2 sintasa)	VLE (64 meses)
7/Unilateral	Compromiso Post-laminar del nervio óptico, invasión masiva de la coroides, invasión intra-escleral	Quimioterapia adyuvante	MO (Positivo para el ARNm del CRX, NRE: 7.0×10^{-5})	VLE (46 meses)
8/Unilateral	No evaluable debido a quimioterapia pre-enucleación	Quimioterapia pre-enucleación y quimioterapia adyuvante	MO (Positivo para el ARNm del CRX, NRE: 3.15×10^{-3})	VLE (24 meses)
9/Unilateral	Invasión masiva de la coroides e invasión intra-escleral	Quimioterapia adyuvante	MO (Positivo para el ARNm del CRX, NRE: 2.1×10^{-4})	VLE (45 meses)

(*) EMD fue evaluada luego de la enucleación tras falla de la terapia conservativa. MO, médula ósea; LCR, líquido cefalorraquídeo; SNC, sistema nervioso central; VLE: Vivo, libre de enfermedad. NRE: Niveles relativos de expresión.

Ningún paciente con ojos enucleados del grupo D al diagnóstico tuvo EMD, mientras que 8 de los 61 pacientes con ojos del grupo E sí presentaron EMD (13.1%). En particular, 8 de los 43 ojos del grupo E con glaucoma (con o sin buftalmia) tenía

EMD (18.6%). El caso restante con EMD era bilateral, grupo D al diagnóstico y fue enucleado tras falla del tratamiento de un ojo con quimioterapia intra-arterial. La EMD fue detectada luego de la enucleación, la cual mostró invasión de la esclera. Esta paciente se ha mantenido libre de enfermedad por 58 meses luego de recibir terapia adyuvante con determinaciones negativas de EMD durante el seguimiento. La correlación entre los factores de riesgo en la patología y la presencia de la EMD se muestran en la Tabla N°16.

Tabla N°16 - Enfermedad mínimamente diseminada según factores de riesgo histopatológicos

	EMD negativa	EMD positiva	P-valor
Invasión de la coroides (cualquiera) (n=77)	67 (90.5%)	7 (9.5%)	0.39
Invasión masiva de la coroides (n= 51)	44 (86.3%)	7 (13.7%)	0.08
Invasión de la esclera (n=25)	19 (76%)	6 (24%)	0.002
Invasión retro-laminar del nervio óptico (n=51)	50 (98%)	1 (2%)	0.2
Invasión en el margen de resección del nervio óptico (n=7)	3 (42.9%)	4 (57.1%)	0.0005
Invasión del segmento anterior (n=17)	14 (82.3%)	3 (17.7%)	0.13

Los pacientes que presentaron buftalmia masiva y fueron enucleados y tratados con quimioterapia neo-adyuvante programada (n = 12, 2 con EMD) fueron excluidos.

Análisis de sobrevida

Hubo 4 eventos de recaída metastásica en la población en estudio con una mediana de 9 meses después del diagnóstico (rango 6 a 12). Todos estos eventos se dieron en pacientes quienes habían recibido terapia adyuvante tras la enucleación inicial. El único sitio de recaída fue el LCR y fue un evento fatal en todos los casos.

Con una mediana de seguimiento de 38 meses (rango 8 a 89), la probabilidad de sobrevida libre de enfermedad a 3 años (pSLE) para los pacientes de este estudio fue de 0.96 (95%, CI = 0.89-0.99). La pSLE a 3 años de los pacientes con la EMD fue significativamente más baja que en aquellos sin la EMD (0.78 (95% CI = 0.37-0.94) versus 0.98 (95%, CI = 0.93-1) p = 0.004) (Figura N°19).

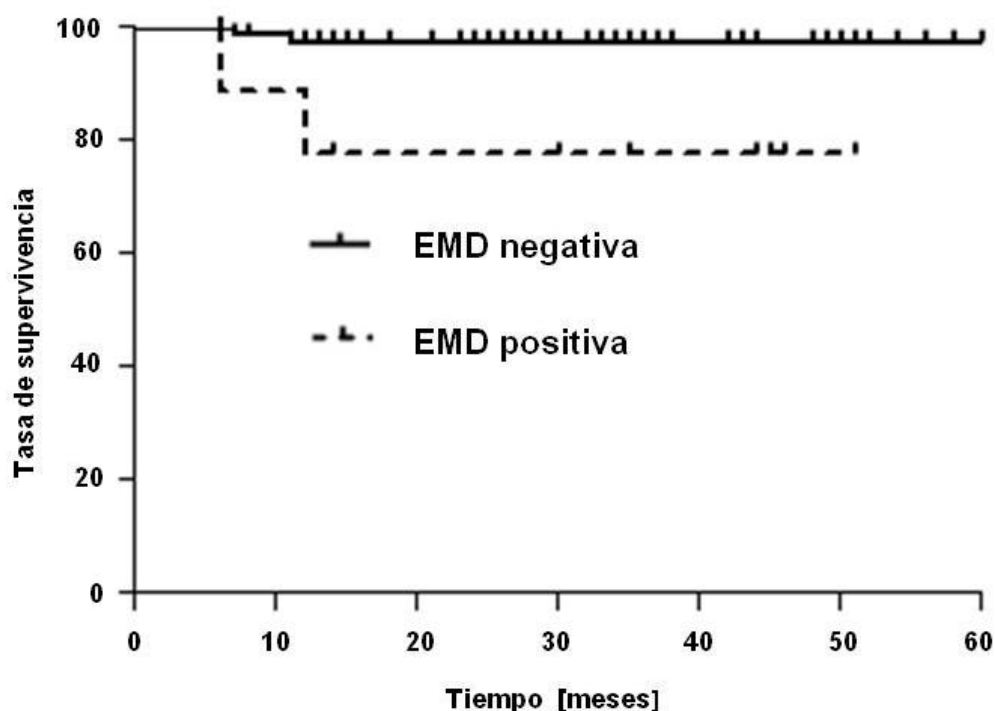


Figura N°19: Probabilidad de sobrevida libre de enfermedad (pSLE) para los pacientes según la presencia de la enfermedad mínimamente diseminada (EMD). Los pacientes con EMD tuvieron una pSLE de 3 años de 0.78 (95% IC = 0.37-0.94) versus aquellos sin EMD (0.98, 95% IC = 0.93-1) $p = 0.004$.

Discusión

Los datos obtenidos en esta sección del trabajo a partir del estudio prospectivo de la cohorte de pacientes con retinoblastoma no metastásico y factores de riesgo en la histopatología mostraron que el 9.4% de los mismos tenía la EMD y que este subgrupo de pacientes tenía una sobrevida libre de enfermedad más pobre.

A nuestro entender, este ha sido el primer reporte sobre la EMD en una amplia cohorte de pacientes con retinoblastoma no metastásico. En el capítulo anterior se mencionó el uso del ARNm del CRX para el estudio de la EMD en pacientes con retinoblastoma metastásico (Torbidoni et al, 2015). En el presente estudio se extendió la aplicación de la qPCR para la detección del mensajero del CRX como una herramienta para la evaluación de la EMD en la enfermedad no metastásica, la cual es más frecuente en nuestro ámbito, permitiendo la identificación de un subgrupo de pacientes de “muy alto riesgo” dentro del grupo de los ya considerados de alto riesgo debido a la presencia de los factores de riesgo histopatológicos. La estimación del riesgo

a la recaída metastásica en estos pacientes representa un desafío debido a que la misma ocurre casi exclusivamente en pacientes con retinoblastoma y factores de riesgo en la histopatología (Aerts et al, 2013), pero aún en esta población es un evento que se da poco frecuentemente gracias a los tratamientos utilizados. Prácticamente, ningún paciente sin factores de riesgo en la histopatología tuvo una recaída metastásica, por lo que generalmente no se les trata con ninguna terapia adyuvante (Chantada et al, 1999 B).

En la teoría, un estudio sobre la EMD sería de utilidad para identificar a aquellos raros casos que no pueden ser identificados como de alto riesgo a través de la patología. Sin embargo, debido a que para la evaluación de la EMD se requiere muestras tanto de MO como de LCR, esto no pudo ser determinado en este estudio ya que estos estudios invasivos sólo son hechos en los pacientes con factores de riesgo en la histopatología. Ninguno de los 85 pacientes sin factores de riesgo en la histopatología que fueron diagnosticados en el Hospital Garrahan en el mismo intervalo de tiempo tuvo una recaída metastásica, por lo que sería cuestionable, de hecho, practicar estos procedimientos invasivos en estas poblaciones de menor riesgo. A pesar de la restricción en los procedimientos invasivos en los pacientes sin factores de riesgo en la histopatología, se pudo estudiar la EMD en 18 casos de bajo riesgo en quienes la disponibilidad de la MO y LCR fue posible debido a otras razones clínicas, pero ninguno tuvo la EMD y ninguno recayó.

Si bien las recaídas metastásicas ocurren casi exclusivamente en pacientes con factores de riesgo en la histopatología (Kaliki et al, 2016; Chantada et al, 2004 A), no hay consenso general sobre cuáles son los pacientes a los que se les debería administrar la terapia adyuvante debido a que el riesgo de recaída metastásica varía en las diferentes categorías de pacientes con factores de riesgo en la histopatología. Por ejemplo, el riesgo es aparentemente mayor en pacientes con PLONI (con o sin invasión en el margen de resección quirúrgica del nervio óptico) (Kaliki et al, 2016; Antoneli et al, 2003) o con compromiso de la esclera (Antoneli et al, 2007; Cuenca et al, 2009), por lo que aparentemente todos los grupos usan terapia adyuvante para reducir el riesgo (Aerts et al, 2013).

Por el contrario, solo el 4% de los pacientes con invasión masiva aislada de la coroides presenta una recaída metastásica aún cuando no les fue administrada ninguna terapia adyuvante (Bosaleh et al, 2012). Por lo tanto, debido a que a pesar de recibir terapia adyuvante aún una proporción de pacientes presenta casi invariablemente una recaída metastásica fatal, es importante poder identificar de una manera más precisa a estos pacientes en quienes un abordaje terapéutico diferente podría mejorar sus chances de sobrevivir. En este estudio se pudo identificar a estos pacientes con un “muy alto” riesgo dentro del grupo con factores de riesgo en la histopatología (alto riesgo), ya que aquellos que tuvieron la EMD tuvieron una SLE del 78% en comparación a una población similar sin EMD que tuvo un 96% de SLE ($p = 0.004$) a pesar de la terapia intensiva. En este subgrupo, se encontró la EMD más comúnmente en los pacientes con tumor en el margen de resección del nervio óptico y en los que tenían invasión escleral. Por este motivo, estos conocimientos fueron trasladados a la clínica ya que actualmente en el Hospital Garrahan se ha modificado la terapia adyuvante, incluyendo un tratamiento con quimioterapia intratecal más intensivo. En base a los resultados del trabajo en pacientes metastásicos (desarrollado en el capítulo anterior), sugiriendo que la recaída en el SNC es generalmente un evento aislado, es decir, que el LCR se presenta generalmente como un santuario a los que respecta a la recaída (Torbidoni et al, 2015) e independiente de la diseminación sistémica, la introducción de la quimioterapia intratecal intensiva podría mejorar el resultado clínico ya que se estaría tratando con mayor eficiencia el LCR como compartimiento (Dimaras et al, 2011), mejorando potencialmente el control de la enfermedad.

Dado que según la filosofía de tratamiento en el Hospital Garrahan no todos los pacientes con factores de riesgo en la histopatología recibieron terapia adyuvante, se pueden hacer algunas observaciones interesantes. Por ejemplo, ninguno de los 14 pacientes con invasión masiva aislada de la coroides tenía la EMD, ninguno recibió terapia adyuvante y ninguno recayó. Lo mismo se ve ha visto en estudios ya reportados en los que muchos pacientes con invasión aislada de la coroides o PLONI no recaen a pesar de no recibir la terapia luego de la enucleación (Aerts et al, 2013; Kaliki et al, 2011). Sin embargo, en este estudio un caso con PLONI y con una evaluación de la EMD con resultado negativo al diagnóstico y que había recibido terapia adyuvante, tuvo una recaída extraocular por lo que, en este caso, su estatus de “muy alto riesgo” no pudo ser identificado por dicha evaluación. Este caso hace notar el hecho de que, por un lado,

la recaída puede ocurrir a pesar de una evaluación negativa de la EMD pero que, por otro lado, la quimioterapia adyuvante aún en regímenes relativamente intensivos no es garantía a la hora de prevenir la recaída metastásica en todos los casos de alto riesgo (Kaliki et al, 2016). Los restantes casos con EMD negativa ($n = 50$) no recayeron. Es cierto que continua incierto cuál hubiera sido el resultado clínico si no hubiesen recibido terapia adyuvante. Teóricamente, los pacientes con EMD a quienes no se los trata con terapia adyuvante eventualmente desarrollarán una recaída extraocular; sin embargo, se ha reportado la presencia de células diseminadas en *dormancy* sin potencial metastásico en otros tumores (Neves, 2006) y posiblemente esta situación pueda darse en el retinoblastoma. Además, así como se ve en otras patologías tales como el neuroblastoma, una evaluación negativa de la EMD no es suficiente para garantizar la no recaída, pero esto no quita que los pacientes con un “muy alto riesgo” por tener la EMD no tengan un riesgo adicional mayor de recaída (Yáñez et al, 2011). Las recaídas ocurrieron solamente en el LCR, mientras que la MO permaneció negativa para la EMD en todos los casos al momento de la recaída (Torbidoni et al, 2015). No obstante, aún hay cuestiones que afectan la sensibilidad del sistema de detección de la EMD que precisan ser mejoradas, tales como la baja celularidad y el volumen limitado de las muestras de LCR que hicieron imposible la obtención de ARN total para el análisis en el 36% de los casos. También puede ocurrir que haya diferencias de expresión en los marcadores (Stutterheim et al, 2008); no obstante, poco probablemente haya ocurrido esto en nuestros casos ya que las células tumorales diseminadas fueron positivas para CRX en todas las muestras de LCR en la recaída, mientras que la EMD permaneció persistentemente negativa en la MO del mismo momento (Torbidoni et al, 2015). Todo esto estaría indicando que el protocolo de muestreo del LCR estaría jugando un rol fundamental en la precisión de las determinaciones de PCR previas.

Si bien fue posible encontrar una correlación entre los pacientes con factores de riesgo en la histopatología, la EMD y la recaída metastásica, es preciso contar con el globo ocular enucleado para poder identificar a estos pacientes con riesgo. Si la EMD pudiera ser detectada de manera preoperatoria, entonces los pacientes con este mayor riesgo podrían ser identificados de manera temprana y tratados apropiadamente. Además, desde la introducción de la quimioterapia intra-arterial, la mayoría de los pacientes con ojos en el grupo D y un número creciente con ojos del grupo E están siendo considerados actualmente en varios centros de salud como candidatos para la

terapia conservativa (Abramson et al, 2015; Munier et al, 2013; Shields C.L., 2014). El estudio de la EMD podría ser de utilidad en la identificación de aquellos pacientes en quienes el abordaje conservativo no sería conveniente o interrumpido luego de la progresión de la enfermedad intraocular. En el Hospital Garrahan se enuclearon inicialmente, por protocolo de rutina a todos los pacientes con ojos grupo E durante el periodo de estudio, y se encontró que la EMD se daba en el 18.6% de estos pacientes que presentaba glaucoma. Esto sugiere que el tratamiento conservador no debería ser impartido en esta población de pacientes, quienes sí deberían ser tratados como poseedores de la enfermedad potencialmente diseminada.

En conclusión, se puede decir que los datos aquí presentados muestran que fue posible identificar a una población de pacientes de “muy alto riesgo” con retinoblastoma y factores de riesgo en la histopatología quienes tienen la EMD y que, por eso, tienen una SLE significativamente más baja a pesar de la terapia adyuvante intensiva. Por este motivo, sería necesario un abordaje alternativo de tratamiento para mejorar los resultados clínicos en esta población. Por último, se halló que los pacientes con retinoblastoma grupo E y glaucoma tienen un riesgo mayor de tener la EMD al diagnóstico y no deberían ser considerados para candidatos a la terapia conservativa.

CONCLUSIONES GENERALES

Los estudios llevados a cabo en esta tesis contribuyeron al conocimiento general de la biología de la diseminación del retinoblastoma mediante resultados originales aportando desarrollos tecnológicos que fueron aplicados a pacientes. Se puso a punto la técnica para el uso de 2 biomarcadores moleculares (GD2 sintasa y CRX) para el estudio de la enfermedad mínimamente diseminada (EMD) en el retinoblastoma. En el caso del CRX, la técnica no había sido reportada por otros grupos y a partir de este trabajo, es ahora utilizada en distintos centros internacionales. Se ha logrado un sinergismo entre el desarrollo tecnológico y la aplicación a pacientes mediante un esfuerzo conjunto entre un centro académico como la Universidad de Quilmes y un hospital público con alto volumen de pacientes, como el Hospital Garrahan. Las técnicas desarrolladas en el centro académico, se han trasladado a la clínica, utilizándolas para estudiar un alto número de pacientes en forma prospectiva bajo estándares éticos y obteniendo información útil para el manejo clínico de estos pacientes.

En su primera fase, mediante el uso de la GD2 sintasa, se detectó por primera vez en la literatura la presencia de EMD en el LCR en pacientes con retinoblastoma avanzado, como una prueba de concepto de que la EMD está presente en el LCR de pacientes con retinoblastoma sin compromiso del SNC detectable clínicamente al diagnóstico. Se logró determinar una población de mayor riesgo de padecer EMD (pacientes con glaucoma y compromiso de nervio óptico) y se estableció una correlación pronóstica ya que aquellos con EMD presentaron una sobrevida menor.

Con estos datos como base, se optimizó el estudio de la EMD mediante la puesta a punto de una técnica que permitió utilizar otro biomarcador (CRX) más sensible y específico. Esto posibilitó el estudio de la MO como sitio de diseminación. Así, se estudió en un primer término pacientes con retinoblastoma metastásico, donde el ARNm del CRX fue identificado como un biomarcador novedoso de interés para la detección de la EMD. Además, este biomarcador fue útil como herramienta para mejorar la identificación de células tumorales en sitios extraoculares. Mediante su uso, pudimos contribuir al conocimiento de la diseminación de este tumor, ya que en casos de compromiso o recaída en LCR, no fue posible detectar la presencia de EMD en la MO,

sugiriendo que la diseminación no sería por vía sistémica, sino que lo haría por vía leptomeníngea.

En el estudio de 96 pacientes con retinoblastoma intraocular de alto riesgo, el uso de EMD permitió identificar a una población de pacientes de “muy alto riesgo” dentro del grupo ya conocido de paciente con factores de riesgo en la histopatología. Este subgrupo incluyó pacientes con invasión de nervio óptico y glaucoma que tuvieron una sobrevida libre de enfermedad significativamente más baja a pesar de haber recibido terapia adyuvante intravenosa intensiva. Se halló que los pacientes con retinoblastoma grupo E y glaucoma tienen un riesgo mayor de tener la EMD al diagnóstico y no deberían ser considerados para candidatos a la terapia conservadora.

Los resultados de esta tesis dieron sustento teórico para cambios en el protocolo de tratamiento de los pacientes con retinoblastoma de alto riesgo, incluyéndose la quimioterapia intra-tecal con el fin de lograr una mayor cobertura en ese compartimiento en pacientes de alto riesgo, sin intensificar su tratamiento sistémico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

- Abramson D.H. (2005).** Retinoblastoma in the 20th century: past success and future challenges the Weisenfeld lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(8): 2683-2691.
- Abramson D.H., Dunkel I.J., and McCormick B. (2000).** *Neoplasms of the eye*. In: Cancer Medicine (Editors: Holland J.F., and Frei E.), Canada: BC Decker Inc.
- Abramson D.H., Shields C.L., Munier F.L., and Chantada G.L. (2015).** Treatment of Retinoblastoma in 2015: Agreement and Disagreement. *JAMA Ophthalmol*, 33(11):1341-1347.
- Aerts I., Lumbroso-Le Rouic L., Gauthier-Villars M., Brisse H., Doz F., and Desjardins L. (2006).** Retinoblastoma. *Orphanet J Rare Dis*, 1:31.
- Aerts I., Sastre-Garau X., Savignoni A., Lumbroso-Le Rouic L., Thebaud-Leculée E., Frappaz D., Coze C., Thomas C., Gauthier-Villars M., Lévy-Gabriel C., Brisse H.J., Desjardins L., and Doz F. (2013).** Results of a multicenter prospective study on the postoperative treatment of unilateral retinoblastoma after primary enucleation. *J Clin Oncol* 31(11):1458-63.
- Aguirre-Ghiso J.A. (2007).** Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Rev Cancer*, 7(11): 834–846.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Walter P. (2004).** *Biología molecular de la célula* (4ta edición). Barcelona – España: Editorial Omega.
- Antoneli C.B., Steinhorst F., de Cássia Braga Ribeiro K., Novaes P.E., Chojniak M.M., Arias V., and de Camargo B. (2003).** Extraocular retinoblastoma: a 13-year experience. *Cancer*, 98(6):1292-1298.
- Antoneli C.B., Ribeiro K.B., Rodriguez-Galindo C., Soares F.A., Arias V.A., Novaes P.E., Chojniak M.M., and Malogolowkin M. (2007).** The addition of ifosfamide/etoposide to cisplatin/teniposide improves the survival of children with retinoblastoma and orbital involvement. *J Pediatr Hematol Oncol*, 29(10):700-704.
- Apushkin M.A., Shapiro M.J., and Mafee M.F. (2005).** Retinoblastoma and Simulating Lesions: Role of Imaging. *Neuroimaging Clin N Am*, 15(1): 49-67.
- Armakolas A., Panteleakou Z., Nezos A., Tsouma A., Skondra M., Lembessis P., Pissimissis N., and Koutsilieris M. (2010).** Detection of the Circulating Tumor Cells in Cancer Patients. *Future Oncol*, 6(12):1849-1856.
- Atchaneeyasakul L.O., Wongsiraroj C., Uprasertkul M., Sanpakit K., Thephamongkhon K., and Trinavarat A. (2009).** Prognostic factors and treatment outcomes of retinoblastoma in pediatric patients: a single-institution study. *Jpn J Ophthalmol*, 53(1): 35-39.
- Atlas S.W., Kemp S.S., Rorke L., and Grossman R.I. (1988).** Hemorrhagic intracranial retinoblastoma metastases: MR-pathology correlation. *J Comput Assist Tomogr*, 12(2):286-289.
- Azar D., Donaldson C., and Dalla-Pozza L. (2003).** Questioning the need for routine bone marrow aspiration and lumbar puncture in patients with retinoblastoma. *Clin Exp Ophthalmol*, 31(1): 57–60.

B

- Baker S.J., Markowitz S., Fearon E.R., Willson J.K., and Vogelstein B. (1990).** Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*, 249(4971): 912-915.
- Bal de Bier Joffé E., Puricelli L., and Alonso D.F. (2008).** *Biología tumoral: claves celulares y moleculares del cáncer* (1ra Edición). Buenos Aires - Argentina: Editorial Eudeba.
- Balmer A., and Munier F. (2007).** Differential diagnosis of leukocoria and strabismus, first presenting signs of retinoblastoma. *Clin Ophthalmol*, 1(4): 431–439.
- Balmer A., Zografos L., and Munier F. (2006).** Diagnosis and current Management of retinoblastoma. *Oncogene*, 25(38):5341-5349.
- Bates S. (2010).** Progress towards personalized medicine. *Drug Discovery Today*, 15(3-4):115-120.

Beiske K., Burchill S.A., Cheung I.Y., Hiyama E., Seeger R.C., Cohn S.L., Pearson A.D., and Matthay K.K.. (2009). Consensus criteria for sensitive detection of minimal neuroblastoma cells in bone marrow, blood and stem cell preparations by immunocytology and QRT-PCR: recommendations by the International Neuroblastoma Risk Group Task Force. *Br J Cancer*, 100(10):1627-1637.

Bellaton E., Bertozzi A.I., Behar C., Chastagner P., Brisse H., Sainte-Rose C., Doz F., and Desjardins L. (2003). Neoadjuvant chemotherapy for extensive unilateral retinoblastoma. *Br J Ophthalmol*, 87(3): 327–329.

Bernard P.S., and Wittwer C.T. (2002). Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem*, 48(8):1178-1185.

Biojone E., Queiróz R.deP., Valera E.T., Odashima N.S., Takayanagui O.M., Viana M.B., Tone L.G., and Scrideli C.A. (2012). Minimal residual disease in cerebrospinal fluid at diagnosis: a more intensive treatment protocol was able to eliminate the adverse prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 53(1):89-95.

Biomarkers Definitions Working Group. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol Ther*, 69(3) 89– 95.

Boatright J.H., Borst D.E., Stodulkova E., and Nickerson J.M. (2001). Endogenous CRX expression and IRBP promoter activity in retinoblastoma cells. *Brain Res*, 916(1-2):136-142.

Bommer M., Nagy A., Schopflin C., Pauls S., Ringhoffer M., and Schmid M. (2011). Cerebrospinal fluid pleocytosis: pitfalls and benefits of combined analysis using cytomorphology and flow cytometry. *Cancer Cytopathol*, 119(1): 20–26.

Bosaleh A., Sampor C., Solernou V., Fandiño A., Domínguez J., de Dávila M.T., Chantada G.L. (2012). Outcome of children with retinoblastoma and isolated choroidal invasion. *Arch Ophthalmol*, 130(6):724-729.

Broaddus E., Topham A., and Singh A.D. (2009). Survival with retinoblastoma in the USA: 1975-2004. *Br J Ophthalmol*, 93(1):24-27.

Burchill S.A., Beiske K., Shimada H., Ambros P.F., Seeger R., Tytgat G.A., Brock P.R., Haber M., Park J.R., and Berthold F. (2017). Recommendations for the standardization of bone marrow disease assessment and reporting in children with neuroblastoma on behalf of the International Neuroblastoma Response Criteria Bone Marrow Working Group. *Cancer*, 123(7):1095-1105.

C

Canturk S., Qaddoumi I., Khetan V., Ma Z., Furmanchuk A., Antoneli C.B., Sultan I., Kebudi R., Sharma T., Rodriguez-Galindo C., Abramson D.H., and Chantada G.L. (2010). Survival of retinoblastoma in less-developed countries impact of socioeconomic and health-related indicators. *Br J Ophthalmol*, 94(11):1432-6.

Chamberlain M.C. (2008). Neoplastic Meningitis. *Oncologist*, 13(9):967–977.

Chamberlain M.C., Glantz M., Groves M.D., and Wilson W.H. (2009). Diagnostic tools for neoplastic meningitis: detecting disease identifying patient risk and determining benefit of treatment. *Semin Oncol*, 36(4 Suppl 2):S35-45.

Chan H.S.L., Rushlow D., Doyle J., Williams J., Abella E.M., Héon E., and Gallie B.L. (2006). Molecular RB1 gene detection of minimal residual disease in metastatic retinoblastoma. *Cancer Res*, 66(8): 1021.

Chantada G., Fandiño A., Manzitti J., Urrutia L., and Schwartzman E. (1999 – A). Late diagnosis of retinoblastoma in a developing country. *Arch Dis Child*, 80(2): 171-174.

Chantada G.L., de Dávila M.T., Fandiño A., Manzitti J., Raslawski E., Casak S., and Schwartzman E. (1999 – B). Retinoblastoma with low risk for extraocular relapse. *Ophthalmic Genet*, 20(3):133-140.

Chantada G., Fandiño A., Casak S., Manzitti J., Raslawski E., and Schwartzman E. (2003). Treatment of overt extraocular retinoblastoma. *Med Pediatr Oncol*, 40(3):158-161.

Chantada G.L., Dunkel I.J., de Davila M.T., and Abramson D.H. (2004 A). Retinoblastoma patients with high risk ocular pathological features: who needs adjuvant therapy? *Br J Ophthalmol*, 88(8): 1069-1073.

Chantada G., Fandiño A., Dávila M.T., Manzitti J., Raslawski E., Casak S., and Schwartzman E. (2004 B) Results of a prospective study for the treatment of retinoblastoma. *Cancer*, 100(4): 834-842.

- Chantada G.L., Rossi J., Casco F., Fandiño A., Scopinaro M., G de Dávila M.T., and Abramson D.H. (2006 - A)** An aggressive Bone Marrow Evaluation Including Immunocytology with GD2 for advanced retinoblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol*, 28(6): 369-373.
- Chantada G., Doz F., Antoneli C.B., Grundy R., Clare Stannard F.F., Dunkel I.J., Grabowski E., Leal-Leal C., Rodríguez-Galindo C., Schwartzman E., Popovic M.B., Kremens B., Meadows A.T., and Zucker J.M. (2006 - B)**. A proposal for an International Retinoblastoma Staging System. *Pediatr Blood Cancer*, 47(6): 801-805.
- Chantada G.L., Casco F., Fandiño A.C., Galli S., Manzitti J., Scopinaro M., Schwartzman E., and de Dávila M.T. (2007)**. Outcome of Patients with Retinoblastoma and Postlaminar Optic Nerve Invasion. *Ophthalmology*, 114(11): 2083-9.
- Chantada G.L., Dunkel I.J., Antoneli C.B., de Dávila M.T., Arias V., Beaverson K., Fandiño A.C., Chojniak M., and Abramson D.H. (2007 - B)**. Risk factors for extraocular relapse following enucleation after failure of chemoreduction in retinoblastoma. *Pediatr Blood Cancer*, 49(3):256-60.
- Chantada G.L., Doz F., Orjuela M., Qaddoumi I., Sitorus R.S., Kepak T., Furmanchuk A., Castellanos M., Sharma T., Chevez-Barrios P., and Rodríguez-Galindo C. (2008)**. International Retinoblastoma Staging Working Group. World disparities in risk definition and management of retinoblastoma: a report from the International Retinoblastoma Staging Working Group. *Pediatr Blood Cancer*, 50(3):692-4.
- Chantada G.L., Gonzalez A., Fandiño A., de Davila M.T., Demirdjian G., Scopinaro M., and Abramson D. (2009 - A)**. Some clinical findings at presentation can predict high-risk pathology features in unilateral retinoblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol*, 31(5):325-9.
- Chantada G.L., Dunkel I.J., Qaddoumi I., Antoneli C.B., Totah A., Canturk S., Nawaiseh I., Fandiño A., Pífano I., Peksayar G., Ribeiro K.B., and Abramson D.H. (2009 - B)**. Familiar retinoblastoma in developing countries. *Pediatr Blood Cancer*, 53(3): 338-342.
- Chantada G.L., Fandiño A.C., Gutter M.R., Raslawski E.C., Dominguez J.L., Manzitti J., de Dávila M.T., Zubizarreta P., and Scopinaro M. (2010)**. Results of a prospective study for the treatment of unilateral retinoblastoma. *Pediatr Blood Cancer*, 55(1):60-66.
- Chantada G.L., Qaddoumi I., Canturk S., Khetan V., Ma Z., Kimani K., Yeniad B., Sultan I., Sitorus R.S., Tacyildiz N., and Abramson D.H. (2011)**. Strategies to manage retinoblastoma in developing countries. *Pediatr Blood Cancer*, 56(3):341-8.
- Cheresh D.A., Pierschbacher M.D., Herzig M.A., and Mujoo K. (1986)**. Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins. *J Cell Biol*, 102(3): 688-696.
- Cheung I.Y., and Cheung N.K. (2001)**. Quantitation of marrow disease in neuroblastoma by real-time reverse transcription-PCR. *Clin Cancer Res*, 7(6):1698-705.
- Cheung I.Y., Lo Piccolo M.S., Kushner B.H., Kramer K., and Cheung N.K. (2003)**. Quantitation of GD2 synthase mRNA by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction: clinical utility in evaluating adjuvant therapy in neuroblastoma. *J Clin Oncol*, 21(6): 1087-1093.
- Cheung N.K., Von Hoff D.D., Strandjord S.E., and Coccia P.F. (1986)**. Detection of neuroblastoma cells in bone marrow using GD2 specific monoclonal antibodies. *J Clin Oncol*, 4(3): 363-369.
- Cheung N.K., Heller G., Kushner B.H., Liu C., and Cheung I.Y. (1997)**. Detection of metastatic neuroblastoma in bone marrow: when is routine marrow histology insensitive? *J Clin Oncol*, 15(8): 2807-17.
- Chomczynski P., and Sacchi N. (1987)**. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
- Corson T.W., and Gallie B.L. (2007)**. One Hit, Two Hits, Three Hits, More? Genomic Changes in the Development of Retinoblastoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 46(7):617-634.
- Croce C.M. (2008)**. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*, 358(5):502-511.
- Cuenca A., Giron F., Castro D., Fandiño A., Gutter M., de Dávila M.T., and Chantada G. (2009)**. Microscopic scleral invasion in retinoblastoma: clinicopathological features and outcome. *Arch Ophthalmol*, 127(8): 1006-1010.

D

Datta Y.H., Adams P.T., Drobyski W.R., Ethier S.P., Terry V.H., and Roth M.S. (1994). Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse- transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol*, 12(3): 475–482.

De Jong M.C., Kors W.A., De Graaf P., Castelijns J.A., Kivelä T., and Moll A.C. (2014). Trilateral retinoblastoma: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Oncology*, 15(10): 1157–1167.

De Vita V., Hellman S and Rosenberg S. (1997). *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (5th Edition), Philadelphia, PA - USA, Editorial Lippincott Williams & Wilkins.

Diel I.J., Kaufmann M., Goerner R., Costa S.D., Kaul S., and Bastert G. (1992). Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: A prognostic factor for distant metastasis. *J Clin Oncol*, 10(10):1534-1539.

Dimaras H., Héon E., Budning A., Doyle J.J., Halliday W., Gallie B.L., and Chan H.S. (2009). Retinoblastoma CSF metastasis cured by multimodality chemotherapy without radiation. *Ophthalmic Genet*, 30(3):121-126.

Dimaras H., Dimba E.A.O., and Gallie B.L. (2010 A). Challenging the global retinoblastoma survival effort disparity through a collaborative research. *Br J Ophthalmol*, 94(11): 1415-1416.

Dimaras H., Rushlow D., Halliday W., Doyle J.J., Babyn P., Abella E.M., Williams J., Héon E., Gallie B.L., Chan H.S. (2010 B). Using RB1 mutations to assess minimal residual disease in metastatic retinoblastoma. *Transl Res*, 156(2):91-7, 2010.

Dimaras H., Héon E., Doyle J., Strahlendorf C., Paton K.E., Halliday W., Babyn P., Gallie B.L., and Chan H.S. (2011). Multifaceted chemotherapy for trilateral retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*, 129(3):362-365.

Dono M., Ferro P., Benedetti L., Capellini C., Moroni M., Dessanti P., Bacigalupo B., Tartaglione A., Battolla E., Fedeli F., Roncella S. (2009). Molecular detection of human mammaglobin in cerebrospinal fluid from breast cancer patient with leptomeningeal carcinomatosis. *J Neurooncol*, 91(3):295–298.

Draper G.J., Sanders B.M., Brownbill P.A., and Hawkins M.M. (1992). Patterns of risk of hereditary retinoblastoma and applications to genetic counselling. *Br. J. Cancer*, 66(1): 211-219.

Dunkel I.J., Aledo A., Kernan N.A., Kushner B., Bayer L., Gollamudi S.V., Finlay J.L., and Abramson D.H. (2000). Successful treatment of metastatic retinoblastoma. *Cancer*, 89(10):2117–2121.

Dunkel I.J., Chan H.S., Jubran R., Chantada G.L., Goldman S., Chintagumpala M., Khakoo Y., and Abramson D.H. (2010). High-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem cell rescue for stage 4B retinoblastoma. *Pediatr Blood Cancer*, 55(1):149-152.

Dyatlovitskaya E.V., and Kandyba A.G. (2006). Role of biologically active sphingolipids in tumor growth. *Biochemistry (Mosc)*, 71(1):10-17.

Dyer M.A., and Abramson D.H. (2009). Mutations and cancer: one or two historical perspectives? *Lancet Oncol*, 10(8): 834.

E

Eagle R.C. Jr. (2009). High-risk features and tumor differentiation in retinoblastoma: a retrospective histopathologic study. *Arch Pathol Lab Med*, 133(8):1203-1209.

Ellsworth R.M. (1969). The practical management of retinoblastoma. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 67: 462-534.

Eng C., Li F.P., Abramson D.H., Ellsworth R.M., Wong F.L., Goldman M.B., Seddon J., Tarbell N., and Boice J.J. (1993). Mortality from second tumors among long-term survivors of retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst*, 85(14):1121–1128.

F

Ferrari Marback E., Arias V.E.A., Paranhos Jr A., Soares F.A, Murphree A.L., and Erwenne C.M. (2003). Tumour angiogenesis as a prognostic factor for disease dissemination in retinoblastoma. *Br J Ophthalmol*, 87(10): 1224–1228.

Folkman J. (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*, 82(1):4–6.

Folkman J., and Shing Y. (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem*, 267(16):10931-10934.

Friend S.H., Bernards R., Rogelj S., Weinberg R.A., Rapaport J.M., Albert D.M., and Dryja T.P. (1986). A Human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, 323: 643-646.

Furukawa K., Soejima H., Niikawa N., and Shiku H. (1996). Genomic organization and chromosomal assignment of the human β 1, 4-N-Acetylgalactosaminyltransferase gene. Identification of multiple transcription units. *J Biol Chem*, 271(34): 20836-20844.

G

Gabert J., Beillard E., van der Velden V.H., Bi W., Grimwade D., Pallisgaard N., Barbany G., Cazzaniga G., Cayuela J.M., Cavé H., Pane F., Aerts J.L., De Micheli D., Thirion X., Pradel V., González M., Viehmann S., Malec M., Saglio G., van Dongen J.J. (2003). Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*, 17(12):2318-57.

Gene analysis and biomarkers support precision diagnostics and new therapies - Personalized medicine against cancer (edición 23), (2011). Leverkusen, Alemania: Bayer Research Magazine. Recuperado de <http://www.research.bayer.com/en/23-personalized-medicine.pdf>.

Gilbert J., Norris M.D., Marshall G.M., and Harber M. (1997). Low specificity of PGP9.5 expression for detection of micrometastatic neuroblastoma. *Br J Cancer*, 75(12): 1779–81.

Giljer B., Nordgård O., Tjensvoll K., Borgen E., Synnestvedt M., Smaaland R., and Naume B. (2014). Comparison of molecular and immunocytochemical methods for detection of disseminated tumor cells in bone marrow from early breast cancer patients. *BMC Cancer*, 14:514.A the mainstream. *Experimental Hematology*, 30(6): 503–512.

Gimblett M.L., Wellings P.C., Lewis M., Balakrishnan V., Gupta R.K. (1995). Retinoblastoma with micrometastasis to CSF. *Pathology*, 27(1): 27–29.

Glantz M.J., Cole B.F., Glantz L.K., Cobb J., Mills P., Lekos A., Walters B.C., and Recht L.D. (1998). Cerebrospinal fluid cytology in patients with cancer: minimizing false-negative results. *Cancer*, 82(4):733–9.

Glubrecht D.D., Kim J.H., Russell L., Bamforth J.S., and Godbout R. (2009). Differential CRX and OTX2 expression in human retina and retinoblastoma. *J Neurochem*, 111(1):250-263.

Gobin Y.P., Dunkel I.J., Marr B.P., Brodie S.E., and Abramson D.H. (2011). Intra-arterial chemotherapy for the management of retinoblastoma: four-year experience. *Arch Ophthalmol*, 129(6):732-737.

Gomez D.E., and Alonso D.F. (1998), Introducción a la Oncología Molecular. Buenos Aires - Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de Quilmes.

Grabowski E.F., and Abramson D.H. (1987). Intraocular and extraocular retinoblastoma. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1(4): 721-735.

Greenberg M.L., and Goldberg L. (1977). The value of cerebrospinal fluid cytology in the early diagnosis of metastatic retinoblastoma. *Acta Cytol*, 21(6): 735–738.

Greene F., Page D.L., Fleming I.D., Fritz A.G., Balch C.M., Haller D.G., and Morrow M., (2002), *AJCC Manual for staging of cancer* (6th edition), Chicago, Illinois, Estados Unidos: Editorial: Springer.

Gündüz K., Müftüoğlu O., Günel I., Ünal E., and Taçyıldız N. (2006). Metastatic Retinoblastoma. Clinical Features, Treatment, and Prognosis. *Ophthalmology*, 113(9):1558–1566.

H

Hersey P., Jamal O., Henderson C., Zardawi I., and D'Alessandro G. (1988). Expression of the gangliosides GM3, GD3 and GD2 in tissue sections of normal skin, naevi, primary and metastatic melanoma. *Int J Cancer*, 41(3): 336–343.

Honavar S.G., Singh A.D., Shields C.L., Meadows A.T., Demirci H., Cater J., and Shields J.A. (2002). Postenucleation adjuvant therapy in high-risk retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*, 120(7): 923-931.

Hoon D.S., Kuo C.T., Wen S., Wang H., Metelitsa L., Reynolds C.P., and Seeger R.C. (2001). Ganglioside GM2/GD2 synthetase mRNA is a marker for detection of infrequent neuroblastoma cells in bone marrow. *Am J Pathol*, 159(2):493-500.

Howarth C., Meyer D., Hustu H.O., Johnson W.W., Shanks E., and Pratt C. (1980). Stage-related combined modality treatment of retinoblastoma. Results of a prospective study. *Cancer*, 45(5):851–858.

I

Indovina P., Acquaviva A., De Falco G., Rizzo V., Onnis A., Luzzi A., Giorgi F., Hadjistilianou T., Toti P., Tomei V., Pentimalli F., Carugi A., and Giordano A. (2010). Downregulation and aberrant promoter methylation of p16INK4A: a possible novel heritable susceptibility marker to retinoblastoma. *J Cell Physiol*, 223(1): 143-50.

J

Jaskiewicz E., Zhu G., Bassi R., Darling D.S., and Young Jr W.W. (1996). b1,4-N-Acetylgalactosaminyltransferase (GM2 Synthase) is released from Golgi membranes as a Neuraminidase-sensitive, disulfide-bonded dimer by a cathepsin D-like protease. *J Biol Chem*, 271(42): 26395-26403.

Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Murray T., and Thun M.J. (2008). Cancer statistics. *Cancer J Clin*, 58(2): 71–96.

Jiang Y., and Wang M. (2010). Personalized medicine in oncology: tailoring the right drug to the right patient. *Biomark Med*, 4(4):523-533.

K

Kaliki S., Shields C.L., Shah S.U., Eagle R.C. Jr, Shields J.A., and Leahey A. (2011). Postenucleation adjuvant chemotherapy with vincristine, etoposide, and carboplatin for the treatment of high-risk retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*, 129(11):1422-7.

Kaliki S., Tahilian P., Mishra D.K., Srinivasan V., Ali M.H., Reddy V.A. (2016). Optic nerve infiltration by retinoblastoma: Predictive Clinical Features and Outcome. *Retina*, 36(6):1177-83.

Karcioglu Z.A., and Huaman A.M. (1996). Angiogenesis in retinoblastoma. *Middle East journal of Ophthalmology*, 4(1): 17-25.

Killer H.E., Miller N.R., Flammer J., Meyer P., Weinreb R.N., Remonda L., Jaggi G.P. (2012). Cerebrospinal fluid exchange in the optic nerve in normal-tension glaucoma. *Br J Ophthalmol*, 96(4): 544–548.

Kimoto T., Inoue M., Tokimasa S., Yagyu S., Iehara T., Hosoi H., and Kawa K. (2011). Detection of MYCN DNA in the cerebrospinal fluid for diagnosing isolated central nervous system relapse in neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*, 56(5): 865–867.

Kivelä T. (1999). Trilateral retinoblastoma: a meta-analysis of hereditary retinoblastoma associated with primary ectopic intracranial retinoblastoma. *J Clin Oncol*, 17(6): 1829-37.

Kivelä T. (2009). The epidemiological challenge of the most frequent eye cancer: retinoblastoma, an issue of birth and death. *Br J Ophthalmol*, 93(9): 1129–1131.

Kleinerman R.A., Tucker M.A., Tarone R.E., Abramson D.H., Seddon J.M., Stovall M., Li F.P., and Fraumeni J.F.Jr. (2005). Risk of new cancers after radiotherapy in long-term survivors of retinoblastoma: an extended follow-up. *J Clin Oncol*, 23(10): 2272–2279.

Knudson A.G. (1971). Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68(4): 820-823.

Kramer K., Kushner B., Heller G., and Cheung N.K. (2001). Neuroblastoma metastatic to the central nervous system. The Memorial Sloan Kettering Cancer Center Experience and a literature review. *Cancer*, 91(8): 1510–1509.

Kuo C.T., Bostick P.J., Irie R.F., Morton D.L., Conrad A.J., Hoon D.S. (1998). Assessment of messenger RNA of beta 1,4-N-acetylgalactosaminyl transferase as a molecular marker for metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*, 4(2):411–418.

L

Lacroix J., and von Knebel Doeberitz M. (2001). Technical Aspects of Minimal Residual Disease Detection in Carcinoma Patients. *Seminars in Surgical Oncology*, 20(4): 252-264.

Laurent V.E. (2010). Detección Molecular de la GD2 Sintasa en el Retinoblastoma y su Utilidad Potencial como Marcador de la Enfermedad Mínimamente Diseminada (EMD), Universidad de Buenos Aires.

Laurent V.E., Otero L.L., Vazquez V., Camarero S., Gabri M.R., Labraga M., De Dávila M.T., Chantada G.L., Alonso D.F. (2010). Optimization of molecular detection of GD2 synthase mRNA in retinoblastoma. *Mol Med Rep*, 3(2):253-259.

Laurent V.E., Sampor C., Solernou V., Rossi J., Gabri M., Eandi-Eberle S., G. de Davila M.T., Alonso D.F., and Chantada G.L. (2013). Detection of minimally disseminated disease in the cerebrospinal fluid of children with high-risk retinoblastoma by reverse transcriptase-polymerase chain reaction for GD2 synthase mRNA. *European Journal of Cancer*, 49(13):2892-2899.

Laurent V.E., Torbidoni A.V., Sampor C., Ottaviani D., Vazquez V., Gabri M.R., García de Dávila M.T., Ramirez Ortiz M.A., Alonso C., Rossi J., Alonso D.F., and Chantada G.L. (2016). Minimal Disseminated Disease in Nonmetastatic Retinoblastoma With High-Risk Pathologic Features and Association With Disease-Free Survival, *JAMA Ophthalmology*, 134(12):1374-1379.

Leal-Leal C.A., Rivera-Luna R., Flores-Rojó M., Juárez-Echenique J.C., Ordaz J.C., Amador-Zarco J. (2006). Survival in extra-orbital metastatic retinoblastoma: treatment results. *Clin Transl Oncol*, 8(1): 39–44.

Levin M.H., Gombos D.S., and O'Brien J.M. (2011). Intra-arterial chemotherapy for advanced retinoblastoma: is the time right for a prospective clinical trial? *Arch Ophthalmol*, 129(11):1487-1489.

Liotta L.A., and Kohn E.C. (2001). The microenvironment of the tumourhost interface. *Nature*, 411(6835): 375-379.

Livak K.J., and Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)) method. *Methods* 25(4):402-8.

Lloyd K.O., and Furukawa K. (1998). Biosynthesis and functions of gangliosides: recent advances. *Glycoconj J*, 15(7): 627-636.

Lo Piccolo M.S., Cheung N.K., and Cheung I.Y. (2001). GD2 synthase: a new molecular marker for detecting neuroblastoma. *Cancer*, 92(4):924-931.

Lodish H., Baltimore D., Berk, A., Zipursky S.L., Matsudaira P., and Darnell J., (2002), *Biología Celular y Molecular* (4ta Edición), España: Editorial Médica Panamericana.

Lohmann DR. (1999). RB1 Gene Mutations in Retinoblastoma. *Hum Mutat*, K(4): 283-288.

Lohmann S., Herold A., Bergauer T., Belousov A., Betzl G., Demario M., Dietrich M, Luistro L., Poignée-Heger M., Schostack K., Simcox M., Walch H., Yin X., Zhong H., and Weissner M. (2013). Gene expression analysis in biomarker research and early drug development using function tested reverse transcription quantitative real-time PCR assays. *Methods*, 59(1), 10–19.

Lumbroso-Le Rouic L., Aerts I., Levy-Gabriel C., Dendale R., Sastre X., Esteve M., Asselain B., Bours D., Doz F., and Desjardins L. (2008). Conservative treatments of intraocular retinoblastoma. *Ophthalmology*, 115(8):1405–1410.

M

MacKay C.J., Abramson D.H., and Ellsworth R.M. (1984). Metastatic patterns of retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*, 102(3): 391-6.

MacKenzie J.M. (1996). Malignant meningitis: a rational approach to cerebrospinal fluid cytology. *J Clin Pathol*, 49(6): 497–9.

Magrann I., Abramson D.H., Ellsworth R.M. (1989). Optic nerve involvement in retinoblastoma. *Ophthalmology*, 96(2):217-22.

Mammoser A.G., and Groves M.D. (2010). Biology and therapy of neoplastic meningitis. *Curr Oncol Rep*, 12(1):41–49.

Manzitti J., and **Mansilla M.C. (2010)**. Descripción del caso presentado en el número anterior: Retinoblastoma. *Arch Argent Pediatr*, 108(3): 255-257.

Martinez C., Hofmann T.J., Marino R., Dominici M., and Horwitz E.M. (2007). Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood*, 109(10): 4245–4248.

Martinez P., and **Blasco M.A. (2011)**. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat Rev Cancer*, 11(3):161-176.

McShane L.M., Altman D.G., Sauerbrei W., Taube S.E., Gion M., and Clark G.M. (2005). REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Br J Cancer*, 93(4): 387–391.

Meng S., Tripathy D., Frenkel E.P., Shete S., Naftalis E.Z., Huth J.F., Beitsch P.D., Leitch M., Hoover S., Euhus D., Haley B., Morrison L., Fleming T.P., Herlyn D., Terstappen L.W.M.M., Fehm T., Tucker T.F., Lane N., Wang J., and Uhr J.W. (2004). Circulating Tumor Cells in Patients with Breast Cancer Dormancy. *Clin Cancer Res*, 10(24):8152-62.

Mocellin S., Keilholz U., Rossi C.R., and Nitti D. (2006). Circulating tumor cells: the “leukemic phase” of solid cancers. *Trend Mol Med*, 12(3): 130-1139.

Mocellin S., Rossi C.R., and Marincola F.M. (2003). Quantitative Real-Time PCR in Cancer Research. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 51(5): 301–313.

Modak S., and **Cheung N.K. (2007)**. Disialoganglioside directed immunotherapy of neuroblastoma. *Cancer Invest*, 25(1):67-77.

Moreno F. (2015). *Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino (ROHA): incidencia 2000-2013, tendencia temporal de incidencia 2000-2013 Sobrevida 2000-2009*. (1ra Edición) - Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Instituto Nacional del Cáncer.

Moreno F., Sinaki B., Fandiño A., Dussel V., Orellana L., and Chantada G. (2014). A Population-Based Study of Retinoblastoma Incidence and Survival in Argentine Children. *Pediatr Blood Cancer*, 61(9):1610-1615.

Morrison T.B., Weis J.J., and Wittwer C.T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24(6):954-8, 960, 962).

Mul D., Schouten-van Meeteren A.Y.N., van Kamp G.J., and Tan K.E.W.P. (1999). Tumor Markers in Retinoblastoma. *Medical and Pediatric Oncology*, 32(2):146–147.

Munier F.L., Gaillard M.C., Balmer A., and Beck-Popovic M. (2013). Intravitreal chemotherapy for vitreous seeding in retinoblastoma: Recent advances and perspectives. *Saudi J Ophthalmol*, 27(3):147-150.

Murphree A.L. (2005). Intraocular retinoblastoma: The case for a new group classification. *Ophthalmol Clin North Am*, 18(1):41–53.

N

Nagata Y., Yamashiro S., Yodois J., Lloyd K.O., Shiku H., and Furukawa K. (1992).. Expression cloning of β -1,4 N-Acetylgalactosaminyltransferase cDNAs that determine the expression of GM2 and GD2 Gangliosides. *J Biol Chem*, 267(17): 12082-12089.

Naseripour M., Nazari H., Bakhtiari P., Modarres-zadeh M., Vosough P., and Ausari M. (2009). Retinoblastoma in Iran: outcomes in terms of patients' survival and globe survival. *Br J Ophthalmol*, 93(1): 28-32.

Neves E.C.M. (2006). Why do some breast cancer cells remain dormant? *Gynecol Endocrinol*, 22(4):190-197.

Nordling C. (1953). A New Theory on the Cancer-inducing Mechanism. *Br J Cancer*, 7(1): 68-72.

Nowell P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell population. *Science*, 194(4260): 23-8.

O

O'Byrne K.J., Dalglish A.G., Browning M.J., Steward W.P., and Harris A.L. (2000). The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease. *Eur J Can*, 36(2):151–69.

Osborne M.P., Asina S., Wong G.Y., Old L.J., and Cote R.J. (1989). Immunofluorescent monoclonal antibody detection of breast cancer in bone marrow: Sensitivity in a model system. *Cancer Res*, 49(9):2510-2513.

Ozdemir H., Tacyildiz N., Unal E., Yavuz G., Ugur H., and Gunduz K. (2007). Clinical and epidemiological characteristics of retinoblastoma: correlation with prognosis in a Turkish pediatric oncology center. *Pediatr Hematol Oncol*, 24(3): 221-231.

P

Palma J., Sasso D.F., Dufort G., Koop K., Sampor C., Diez B., Richard L., Castillo L., Chantada G.L. (2012). Successful treatment of metastatic retinoblastoma with high-dose chemotherapy and autologous stem cell rescue in South America. *Bone Marrow Transplant*, 47(4): 522–7.

Pantel K., and Alix-Panabières C. (2014). Bone marrow as a reservoir for disseminated tumor cells: a special source for liquid biopsy in cancer patients. *BoneKEy Reports*, 3(584).

Parma D., Dalamon V.K., Fernández C., Szijan I., and Damel A. (2009). Importancia de los estudios de biología molecular en el asesoramiento genético de familias argentinas con retinoblastoma. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 84(11): 557-562.

Patel A.S., Allen J.E., Dicker D.T., Peters K.L., Sheehan J.M., Glantz M.J., and El-Deiry W.S. (2011). Identification and enumeration of circulating tumor cells in the cerebrospinal fluid of breast cancer patients with central nervous system metastases. *Oncotarget*, 2(10): 752–760.

Paulson J.C., and Colley K.J. (1989). Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem*, 264(30): 17615-17618.

Personalized Medicine Coalition, (2014), *The case for Personalized Medicine* (4ta edición), Washington DC, Estados Unidos, Recuperado de www.personalizedmedicinecoalition.org.

Pfaffl M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29:e45.

Pfaffl M.W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*, 26(6): 509–515.

Pine S.R., Yin C., Matloub Y.H., Sabaawy H.E., Sandoval C., Levendoglu-Tugal O., Ozkaynak M.F., and Jayabose S. (2005). Detection of central nervous system leukemia in children with acute lymphoblastic leukemia by real-time polymerase chain reaction. *J Mol Diagn*, 7(1): 127–132.

Plon S.E. (2006), *Cancer Genetics and Molecular Oncology.* (Chapter) Principles of Molecular Medicine (2nd Edition). Chapter 4: pp.27-33, Estados Unidos, Humana Press Inc.

Portoukalian J., David M.J., Gain P., and Richard M. (1993). Shedding of GD2 gangliosides in patients with retinoblastoma. *Int J Cancer*, 53(6): 948-951.

Potter S.L., Berg S., Ingle A.M., Krailo M., Adamson P.C., and Blaney S.M. (2012). Phase 2 clinical trial of intrathecal topotecan in children with refractory leptomeningeal leukemia: a Children's Oncology Group trial (P9962). *Pediatr Blood Cancer*, 58(3):362-365.

Pratt C.B., Meyer D., Chenaille P., and Crom D.B. (1989). The use of bone marrow aspirations and lumbar punctures at the time of diagnosis of retinoblastoma. *J Clin Oncol*, 7(1): 140–143.

Pratt C.B., Fontanesi J., Lu X., Parham D.M., Elfervig J., and Meyer D. (1997). Proposal for a new staging scheme for intraocular and extraocular retinoblastoma based on an analysis of 103 globes. *Oncologist*, 2(1):1–5.

Pratt C.B. (1998). Topical topic: use of chemotherapy for retinoblastoma. *Med Pediatr Oncol*, 31(6): 531-533.

R

Radhakrishnan V., Kashyap S., Pushker N., Sharma S., Pathy S., Mohanti B.K., Vishnubhatla S., Ghose S., and Bakhshi S. (2012). Outcome, Pathologic Findings, and Compliance in Orbital Retinoblastoma (International Retinoblastoma Staging System Stage III) Treated with Neoadjuvant Chemotherapy: A Prospective Study. *Ophthalmology*, 119(7): 1470–1477.

Real-Time PCR Handbook, (sin fecha)., Estados Unidos: Life Technologies, Recuperado de <http://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>.

Reynolds, P. (2014). Childhood cancer research – what are the barriers?. London, UK: Cancer Research UK. Recuperado de <http://scienceblog.cancerresearchuk.org/2014/09/18/childhood-cancer-research-what-are-the-barriers/>.

Rodríguez-Cruz M., del Prado M., and Salcedo M. (2005). Perspectivas en la genómica del retinoblastoma: Implicaciones del gen supresor de tumor RB1. *Rev Invest Clín*, 57(4), 572-581.

Rodriguez-Galindo C., Wilson M., Chantada G., Fu L., Qaddoumi I., Antoneli C., Leal-Leal C., Sharma T., Barnoya M., Epelman S., Pizzarello L., Kane J., Barfield R., Merchant T., Robison L., Murphree L., Chevez-Barrios P., Dyer M., O'Brien J., Ribeiro R.C., Hungerford J., Helveston E., Barret G.H., and Wilimas J. (2008). Retinoblastoma: One world, one vision. *Pediatrics*, 122(3): 763-770.

Rouzier R., Boustyn E., Grozier F., Berger A., Louvard D., and Robine S. (2001). Immunocytochemical Detection of Bone Marrow Micrometastases in Colorectal Carcinoma Patients, Using a Monoclonal Antibody to Villin. *Cytometry*, 46(5):281–289.

S

Sánchez, C. (2013). Knowing and understanding the cancer cell: physiopathology of cancer. *Rev. Med. Clin. Condes*, 24(4) 553-562.

Santagata S., Maire C.L., Idbaih A., Geffers L., Correll M., Holton K., Quackenbush J., and Ligon K.L. (2009). CRX is a Diagnostic Marker of Retinal and Pineal Lineage Tumors. *PLoS One*, 4(11):e7932.

Sastre X., Chantada G.L., Doz F., Wilson M.W., de Davila M.T., Rodríguez-Galindo C., Chintagumpala M., and Chévez-Barrios P. (2009). Proceedings of the Consensus Meetings From the International Retinoblastoma Staging Working Group on the Pathology Guidelines for the Examination of Eucleated Eyes and Evaluation of Prognostic Risk Factors in Retinoblastoma. *Arch Pathol Lab Med*, 133(8): 1199-1202.

Schmidt-Kittler O., Ragg T., Daskalakis A., Granzow M., Ahr A., Blankenstein T.J., Kaufmann M., Diebold J., Arnholdt H., Muller P., Bischoff J., Harich D., Schlimok G., Riethmuller G., Eils R., and Klein C.A. (2003). From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(13): 7737–7742.

Schumacher-Kuckelkorn R., Hero B., Ernestus K., Berthold F. (2005). Lacking immunocytological GD2 expression in neuroblastoma: report of 3 cases. *Pediatr Blood Cancer*, 45(2): 195–201.

Schvartzman E., Chantada G., Fandiño A., de Dávila M.T., Raslawski E., Manzitti J. (1996). Results of a stage-based protocol for the treatment of retinoblastoma. *J Clin Oncol*, 14(5):1532-1536.

Shen H., Tang Y., Xu X., Tang H. (2012). Detection of the GD2+/CD56+/CD45- Immunophenotype by Flow Cytometry in Cerebrospinal Fluids from a Patient with Retinoblastoma. *Pediatr Hematol Oncol*, 30(1): 30–2.

Shields C.L., Shields J.A., Baez K., Cater J.R., and De Potter P. (1994). Optic nerve invasion of retinoblastoma. Metastaticpotential and clinicalriskfactors. *Cancer*, 73(3): 692–698.

Shields C.L., Mashayekhi A., Demirci H., Meadows A.T., and Shields J.A. (2004). Practical approach to management of retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*, 122(5): 729–735.

Shields C.L., Fulco E.M., Arias J.D., Alarcon C., Pellegrini M., Rishi P., Kaliki S., Bianciotto C.G., and Shields J.A. (2013). Retinoblastoma frontiers with intravenous, intra-arterial, periocular, and intravitrealchemotherapy. *Eye (Lond)*, 27(2):253-64.

Shields C.L., Manjandavida F.P., Lally S.E., Pieretti G., Arepalli S.A., Caywood E.H., Jabbour P., and Shields J.A. (2014). Intra-arterial chemotherapy for retinoblastoma in 70 eyes: outcomes based on the international classification of retinoblastoma. *Ophthalmology*, 121(7):1453-1460.

Shields J.A., Shields C.L., and Meadows A.T. (2005). Chemoreduction in the management of retinoblastoma. *Am J Ophthalmol*, 140(3): 505–506.

Shiozawa Y., Eber M.R., Berry J.E., and Taichman R.S. (2015). Bone marrow as a metastatic niche for disseminated tumor cells from solid tumors. *Bonekey Rep*, 4:689.

Situación del cáncer infantil en Argentina, (sin fecha). Buenos Aires, Argentina: Fundación Natalí Dafne Flexer de ayuda al niño con cáncer. Recuperado de: <http://www.fundacionflexer.org/cancer-infantil-en-argentina.html>

Slade M.J., and Coombes R.C. (2007). The clinical significance of disseminated tumor cells in breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 4(1):30-41.

Smith B., Selby P., Southgate J., Pittman K., Bradley C., and Blair G.E. (1991). Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet*, 338(8777): 1227-1229.

Smith-McCune K.K., and Weidner N. (1994). Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res*, 54(3): 800-804.

Stark B., Avigad S., Luria D., Manor S., Reshef-Ronen T., Avrahami G., and Yaniv I. (2009). Bone Marrow Minimal Disseminated Disease (MDD) and Minimal Residual Disease (MRD) in Childhood T-Cell Lymphoblastic Lymphoma Stage III, Detected by Flow Cytometry (FC) and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RQ-PCR). *Pediatr Blood Cancer*, 52(1): 20-25.

Stutterheim J., Gerritsen A., Zappeij-Kannegieter L., Kleijn I., Dee R., Hooft L., van Noesel M.M., Bierings M., Berthold F., Versteeg R., Caron H.N., van der Schoot C.E., and Tytgat G.A. (2008). PHOX2B is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma. *J Clin Oncol*, 26(33):5443-9.

Stutterheim J., Gerritsen A., Zappeij-Kannegieter L., Yalcin B., Dee R., van Noesel M.M., Berthold F., Versteeg R., Caron H.N., van der Schoot C.E., and Tytgat G.A. (2009). Detecting minimal residual disease in neuroblastoma: the superiority of a panel of real-time quantitative PCR markers. *Clin Chem*, 55(7): 1316–1326.

Stutterheim J., Zappeij-Kannegieter L., Ora I., van Sluis P.G., Bras J., den Ouden E., Versteeg R., Caron H.N., van der Schoot C.E., and Tytgat G.A. (2012). Stability of PCR targets for monitoring minimal residual disease in neuroblastoma. *J Mol Diagn*, 14(2):168-175.

Sugita Y., Fujiwara Y., Hoon D.S., Miyamoto A., Sakon M., Kuo C.T., and Monden M. (2002). Overexpression of beta 1,4N-acetylgalactosaminyl- transferase mRNA as a molecular marker for various types of cancers. *Oncology*, 62(2): 149-56.

T

Terry J., Calicchio M.L., Rodriguez-Galindo C., and Perez-Atayde A.R. (2012). Immunohistochemical expression of CRX in extracranial malignant small round cell tumors. *Am J Surg Pathol*, 36(8):1165-1169.

Torbidoni A.V., Laurent V.E., Sampor C., Ottaviani D., Vazquez V., Gabri M.R., Rossi J., de Dávila M.T., Alonso C., Alonso D.F., and Chantada G.L. (2015). Association of cone-rod homeobox transcription factor messenger mRNA with pediatric metastatic retinoblastoma. *JAMA Ophthalmol*, 133(7):805-12.

Tucker T., and Friedman J.M. (2002). Pathogenesis of hereditary tumors: beyond the "two-hit" hypothesis. *Clin Genet*, 62(5): 345-57.

Tumor Markers, (2015), Estados Unidos: National Cancer Institute. Recuperado de <http://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet>.

U

Urbanits S., Griesmacher A., Hopfinger G., Stockhammer G., Karimi A., Müller M.M., Pittermann E., and Grisold W. (2002). FACS analysis – a new and accurate tool in the diagnosis of lymphoma in the cerebrospinal fluid. *Clin Chim Act*, 317(1–2): 101–107.

V

Vandhana S., Deepa P.R., Jayanthi U., Biswas J., and Krishnakumar S. (2011). Clinico-pathological correlations of fatty acid synthase expression in retinoblastoma: an indian cohort study. *Experimental and Molecular Pathology*, 90(1): 29–37.

von Knebel Doeberitz M., and Lacroix J. (1999). Nucleic acid based techniques for the detection of rare cancer cells in clinical samples. *Cancer Metastasis Rev*, 18(1):43-64.

W

Weston C.L., Glantz M.J., and Connor J.R. (2011). Detection of cancer cells in the cerebrospinal fluid: current methods and future directions. *Fluids Barriers CNS*, 8(1):14.

What is personalized medicine? (sin fecha) Connecticut, Estados Unidos: The Jackson Laboratory. Recuperado de <https://www.jax.org/genetics-and-healthcare/personalized-medicine/what-is-personalized-medicine>.

What is precision medicine? (2016), Bethesda, MD , Estados Unidos: US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health. Recuperado de <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/precisionmedicine/definition>.

Wikman H., Vessella R., and Pantel K. (2008). Cancer micrometastasis and tumour dormancy. *APMIS*, 116(7-8): 754-770.

Wilson M.W., Qaddoumi I., Billups C., Haik B.G., and Rodriguez-Galindo C. (2011). A clinicopathological correlation of 67 eyes primarily enucleated for advanced intraocular retinoblastoma. *Br J Ophthalmol*, 95(4):553-8.

Wolff J.A., Boesel C., and Ellsworth R. (1978). Extraocular retinoblastoma. Childrens Cancer Study Group – Protocol CCSG 962. Childrens Cancer Group, New York.

X

Xu X.L., Fang Y., Lee T.C., Forrest D., Gregory-Evans C., Almeida D., Liu A., Jhanwar S.C., Abramson D.H. and Cobrinik D. (2009). Retinoblastoma has properties of a cone precursor tumor and depends upon cone-specific MDM2 signaling. *Cell*, 137(6): 1018-1031.

Y

Yamane S., Shirai C., Arimoto A., Komura E., Ohmisono Y., Sawada T., and Matsumura T. (1999). Disseminated retinoblastoma successfully treated with myeloablative chemotherapy-implication for molecular detection of minimal residual disease. *Bone Marrow Transplantation*, 23(9): 971-974.

Yamashiro S., Haraguchi M., Furukawa K., Takamiya K., Yamamoto A., Nagata Y., Lloyd K.O., Shiku H., and Furukawa K. (1995). Substrate specificity of beta 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase in vitro and in cDNA-transfected cells. GM2/GD2 synthase efficiently generates asialo-GM2 in certain cells. *J Biol Chem*, 270(11): 6149-6155.

Yamashita N., Nishiuchi R., Oda M., Tomiyama Y., Eguchi N., Endo C., Manki A., and Seino Y. (2001). Molecular detection of metastatic retinoblastoma cells by reverse transcription polymerase reaction for interphotoreceptor retinoid-binding protein mRNA. *Cancer*, 91(8): 1568-73.

Yang Y., Xiao X., Wu K., Wang J., Zhou L., Yang H., Li Y., He D., and Zhang P. (2007). Detection of serum biomarkers for retinoblastoma using surface enhanced laser desorption/ionization protein chip system. *Yan Ke Xue Bao*, 23(3):136-42.

Yáñez Y., Grau E., Oltra S., Cañete A., Martínez F., Orellana C., Noguera R., Palanca S., Castel V. (2011). Minimal disease detection in peripheral blood and bone marrow from patients with non-metastatic neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 137(8):1263-1272.

Yates A.J., Thompson D.K., Boesel C.P., Albrightson C., and Hart R.W. (1979). Lipid composition of human neural tumors. *J Lipid Res*, 20(4): 428-436.

Yu C.L., Tucker M.A., Abramson D.H., Furukawa K., Seddon J.M., Stovall M., Fraumeni Jr J.M., and Kleinerman R.A. (2009). Cause-Specific Mortality in Long-Term Survivors of Retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst*, 101(8): 581-591.

Yuyama Y., Dohi T., Morita H., Furukawa K., and Oshima M. (1995). Enhanced expression of GM2/GD2 synthase mRNA in human gastrointestinal cancer. *Cancer*, 75(6):1273–80.

Z

Zeinel A.K., and Huaman A.M. (1996). Angiogenesis in retinoblastoma. *Middle East Journal of Ophthalmology*, Vol 4(1): 17-25.

Zhao J., Dimaras H., Massey C., Xu X., Huang D., Li B., Chan H.S.L., and Gallie B.L. **(2011)**. Pre-Enucleation Chemotherapy for Eyes Severely Affected by Retinoblastoma Masks Risk of Tumor Extension and Increases Death From Metastasis. *J Clin Oncol*, 29(7):845-51.

Zubizarreta P., and Chantada G. **(1999)**. Circulating retinoblastoma cells in a patient with metastatic disease. *Ophthalmic Genet*, 20(3): 189-191.

ANEXO - Publicaciones derivadas de esta tesis

Los resultados presentados en este trabajo dieron lugar a las siguientes publicaciones:

Revistas Internacionales (con referato)

"Minimal Disseminated Disease in Nonmetastatic Retinoblastoma With High-Risk Pathologic Features and Association With Disease-Free Survival", Viviana E Laurent; Ana V Torbidoni; Claudia Sampor; Daniela Ottaviani; Valeria Vazquez; Mariano R Gabri; Maria T de Davila; Marco Ramirez-Ortiz; Cristina Alonso; Jorge Rossi; Daniel F Alonso; Guillermo Chantada, JAMA Ophthalmology, Vol 134(12):1374-1379, 2016.

"The cone-rod homeobox transcription factor (CRX) mRNA as a molecular marker in metastatic retinoblastoma", Ana V. Torbidoni, Viviana E. Laurent, Claudia Sampor, Daniela Ottaviani, Valeria Vazquez, Mariano R. Gabri, Jorge Rossi, María T. de Dávila, Cristina Alonso, Daniel F. Alonso, Guillermo L. Chantada, JAMA Ophthalmology, Vol 133(7): 805-12, 2015.

"Detection of minimally disseminated disease in the cerebrospinal fluid of children with high-risk retinoblastoma by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for GD2 synthase mRNA", Autores: Viviana Laurent, Claudia Sampor, Veronica Solernou, Jorge Rossi, Mariano Gabri, Silvia Eandi-Eberle, Maria T. de Davila, Daniel F Alonso, Guillermo Luis Chantada, European Journal Of Cancer, Vol 49(13): 2892-9, 2013.

Comunicaciones breves (con referato)

"Uso del CRX como marcador linaje-específico en la detección molecular de células de retinoblastoma en sitios metastásicos"
Autores: Torbidoni A, Laurent V, Ottaviani D, Alonso C, De Dávila M, Alonso D, Chantada G. Medicina (Buenos Aires), Vol.73 (Supl. 3):190, 2013.

Mención del primer trabajo listado en este Anexo en un "Invited commentary" de referentes internacionales en Retinoblastoma

"Detection of Retinoblastoma at Risk for Metastasis Using Clinical and Histopathologic Features and Now mRNA"
Autores: Shields CL, Leahey AM, Vol.134 (Supl. 12): 1380-1381, 2016.