



Citogenética del Retinoblastoma

- Doctor Oscar Oliveros G., B.S.; M.Sc., Profesor Asistente, F. Medicina, U. Nacional.
- Doctora Josefina Cano C., B.S.; M.Sc..
- Doctor Emilio Yunis T., M.D., Profesor Titular, F. Medicina, U. Nacional.

Palabras Claves: Retinoblastoma, rearrreglo cromosómico, progresión tumoral, gen supresor tumoral.

El retinoblastoma se ha constituido en un paradigma de la genética de los tumores sólidos, principalmente por permitir el hallazgo de una nueva categoría de genes vinculados con procesos neoplásicos: los genes supresores tumorales o antioncogenes. El presente trabajo es un amplio análisis citogenético de 38 retinoblastomas primarios, e informa acerca de los rearrreglos cromosómicos comunes y sus frecuencias: polisomías de 1q (66%), copias adicionales de 6p (47%), deleción de 13q (21%), deleción de 16q (66%), deleción de 17p (26%), y presencia de regiones cromosómicas amplificadas (11%). Se discute el posible papel de cada uno de estos rearrreglos en consideración a recientes hallazgos moleculares de genes mapeados en los segmentos cromosómicos implicados.

deleción del cromosoma 13 a nivel constitucional, proponen que el gen RB1 se ubica en la banda 13q14 y su mutación es la responsable del desarrollo del retinoblastoma (2). Posteriormente, este hecho se demostró mediante el análisis de ligamiento entre los genes RB1 y Esterasa-D: se detectó ausencia de la enzima marcador en el tejido tumoral, lo que permitió postular que el gen RB1 se comporta de manera recesiva a nivel celular. A la vez, se sugirió que los dos eventos mutacionales que desencadenan la neoplasia corresponden a la pérdida de los dos alelos normales del gen RB1 (3-5).

INTRODUCCION

El retinoblastoma es un tumor intraocular de los primeros años de la vida. La teoría de la doble mutación, propuesta por Knudson en 1971 (1) es el resultado del análisis de la incidencia de este tumor, y explica las diferentes formas de su presentación: hereditaria, esporádica, y constitucional. La condición hereditaria se manifiesta por bilateralidad del tumor, o mejor por multifocalidad, surge como resultado de una primera mutación a nivel germinal o de aparición temprana, en tanto que el segundo evento mutacional es somático. En la forma constitucional del retinoblastoma la mutación germinal se evidencia como una deleción del brazo largo del cromosoma 13 que involucra la banda 13q14 (2-5), y la segunda mutación es siempre somática. El retinoblastoma esporádico es unilateral, o mejor, unifocal y se origina por dos eventos mutacionales a nivel somático, es decir sólo se produce en un retinoblasto (1).

La hipótesis de Knudson recibió sustentación por varias vías experimentales.

Análisis cromosómico y enzimático: Yunis y Ramsay en 1.978, al estudiar los casos que presentaban la

Análisis molecular: la utilización de fragmentos de restricción de longitud polimórfica -RFLPs- del cromosoma 13, permitió identificar pérdida de heterocigidad y postular los mecanismos cromosómicos que conducen a la inactivación del gen RB1 (6, 7). Así, se han encontrado en orden descendente de frecuencia los siguientes mecanismos a nivel del cromosoma 13, que conducen a la pérdida del alelo silvestre: no disyunción/duplicación cromosómica, mutación restringida al gen RB1, recombinación mitótica, y pérdida del cromosoma con el alelo RB1 normal (8).

Aislamiento del gen RB1: a partir de una sonda de DNA del cromosoma 13 obtenida por Dryja y col, tres grupos clonaron el gen RB mediante la técnica de caminar sobre el cromosoma. En 1.986 Friend y col, aislaron un gen que se transcribe en un mRNA de 4,7 Kb, ubicado en 13q14, cercano al gen Esterasa-D (9). A la vez, Lee y col aislaron un clón de cDNA que contiene el gen RB y que al evaluarse en seis retinoblastomas presentó anomalías en la transcripción, consistentes en ausencia total de mRNA o en copias de tamaño menor (10). Por procedimientos similares Fung y col, aislaron un fragmento de cDNA que contiene el gen RB y estudiaron 40 retinoblastomas, en-

contrando deleciones o alteraciones en su expresión (11). Han sido identificados varios mecanismos de alteración del gen *RBI* en células de retinoblastomas, siendo un fenómeno común a todos (12, 13).

Es un hecho conocido que la mayoría de las células cancerosas, si no todas, poseen rearrreglos genómicos evidenciables como alteraciones cromosómicas (14). Tales rearrreglos se consideran la expresión de la mayor inestabilidad genómica de la célula tumoral, y permiten explicar el surgimiento de nuevas variantes celulares, de las cuales se seleccionaran las más agresivas (15, 16). El análisis citogenético de las células de retinoblastoma ha permitido establecer la constancia de algunos rearrreglos cromosómicos: deleciones totales o parciales del cromosoma 13, copias supernumerarias del brazo largo del cromosoma 1, pérdidas del brazo largo del cromosoma 16, copias adicionales del brazo corto del cromosoma 6, regiones homogéneamente coloreadas (RHCs) y minidiplo-cromosomas (MDCs) (17-27).

Presentamos los resultados del análisis citogenético directo realizado en 38 retinoblastomas, la serie individual más amplia de la literatura. Comparamos las frecuencias de los diferentes rearrreglos con los informes de otros autores, y discutimos el significado de dichas alteraciones en los procesos de la evolución tumoral.

MATERIALES Y METODOS

Inmediatamente después de la enucleación, el tejido tumoral se colocó en medio de cultivo estéril (MEM o Dulbecco). Se segmentó en pequeños pedazos que fueron disgregados hasta obtener una suspensión celular. La suspensión celular se sometió a vortex, se lavó dos veces en PBS y se procesó para la obtención de cromosomas mediante el método directo (28), con algunas modificaciones. Las células se resuspendieron en 5 ml de medio Dulbecco que contiene EDTA (0,04 %), colcemid (2 µg/ml) y bromuro de etidio (10 µg/ml), y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Se centrifugaron y el sedimento se resuspendió en 5 ml de solución hipotónica (suero bovino fetal : KCl-0.05 M, 1:4) durante 15 minutos. La fijación se hizo en frío (metanol : ácido acético, 7:3).

Los extendidos metafásicos fueron procesados para la obtención de bandas Q (29), C (30), G (31), y R (32). Se elaboraron y analizaron entre cuatro y treinta cariotipos para cada caso.

La caracterización electroforética de la Esterasa D se realizó en el tejido tumoral y en sangre periférica

según el método de Hopkinson (33). Tejido tumoral: la suspensión de células tumorales se lavó en medio de cultivo y se resuspendió en solución de lisis (triton X 1%, 0,2 ml de mercaptoetanol, 50 mg EDTA). Eritrocitos: aproximadamente 1 ml de sangre periférica se lavó dos veces en solución isotónica y se centrifugó para obtener el paquete de células rojas. La lisis total de las células tumorales y sanguíneas se realizó mediante un proceso de congelación-descongelación. Entre 10-20 µl de lisado tumoral y 5 µl del hemolisado se colocaron en un gel de almidón 9%, y se corrió la electroforesis horizontal durante 17 horas, a 85 voltios y 5 mA. El gel se reveló con acetato de 4-metilumberiferil 0,02% disuelto inicialmente en acetona (10 ml) y posteriormente en acetato de sodio pH 5,2, en un volumen final de 100 ml. La fotografía se tomó con película plus X pan (Kodak) bajo luz ultravioleta.

RESULTADOS

Se analizaron citogenéticamente por el método directo (pocas horas después de la enucleación) 38 retinoblastomas procedentes de 36 pacientes. La tabla 1 resume la información clínica y citogenética de los pacientes.

En cuanto al número de cromosomas, la mayoría de los retinoblastomas fueron diploides o pseudodiploides, siendo la excepción los tumores 034U y 080U que fueron cercanos a la tetraploidia, y el caso 122U que presentó un número modal de 75 cromosomas. El caso 031B tenía dos poblaciones celulares, una de ellas poliploide y la otra con un número modal cromosómico de 51. El cultivo *in vitro* de este tumor durante un año mostró el predominio total de la población poliploide.

Los casos 043U y 046U presentaron, cada uno, dos poblaciones celulares con dos cariotipos claramente diferentes y que designamos como a y b: **043U-a**: 46, XY, -16, +der(16)t(1;16)(16pter →16qh::1q32 →cen-?), y **043U-b**: 44, XY, -10, +der(10)t(1;10)(10pter →10qter::1qh→1qter), -17, -18.

046U-a: 48, Y, -X, -3, +i(6p), +i(6p), -9, +der(9)t(1q;9q), -14, +der(14)t(1q;14p), -15, -16, -22, +M1, +M2, +M3, +M4, +M5, y **046U-b**: 49, XY, -1, +der(1)(1qter →1q33::1q11 →1qter), -5, +der(5)(5pter→5q23::5pter→5qter), +i(6p), +der(9)t(9pter →9qter::cen), -16, +M1, +M2; (Figura 1).

La Tabla 2, presenta las frecuencias de los rearrreglos cromosómicos comunes en nuestra serie y las obtenidas por varios autores en 82 tumores primarios y en dos líneas celulares de retinoblastoma (27).

Tabla 1: Lateralidad, edad de diagnóstico y número modal de los retinoblastomas analizados.

Caso	Edad de diagnóstico* (meses)	Número modal cromosómico	Número de cariotipos analizados
023B	2	46	5
024U	4	45	7
031B	7	51	30
034U	54	86	10
035B	34	47	30
036U	16	47	6
041B	--	44	4
042U	12	47	12
043U-a	12	46	4
043U-b	12	44	4
044B	48	48	8
045B	20	48	5
046U-a	28	48	5
046U-b	28	49	4
048U	45	44	6
050U	5	46	6
051U	24	45	8
060B	8	45	8
062U	10	47	4
064U	10	46	5
065U	40	47	6
070U	24	47	26
071B	8	46	3
072U	12	45	3
080U	9	94	8
089U	--	48	9
090U	18	47	10
093U	23	49	9
096U	10	49	11
098U	--	46	8
099U	20	48	10
103U	20	44	18
108U	13	46	27
111U	26	44	35
115U	6	49	10
118B	--	44	8
122U	48	75	8
123U	4	46	4

*: La edad de diagnóstico en algunos casos es realmente la edad en la cual se practicó la enucleación. En Colombia la edad de diagnóstico es tardía por razones de cubrimiento hospitalario.
 --: Información no disponible. -a, -b: subpoblaciones tumorales citogenéticamente diferentes presentes en el mismo retinoblastoma.

Las polisomías del brazo largo del cromosoma 1 (66%) resultaron de ganancia de un cromosoma 1, formación de un isocromosoma 1q, duplicación en tandem de 1q y translocaciones de 1q al mismo cromosoma 1 o a otro cromosoma. En la mayoría de los casos el punto de ruptura se situó en la heterocromatina centromérica (Figura 2).

Las copias adicionales de 6p se encontraron en 47% de los casos y correspondieron a la formación de uno o dos isocromosomas 6p, a tetrasomía 6, a ganancia de un derivado 6q- o a translocaciones de 6p con otro

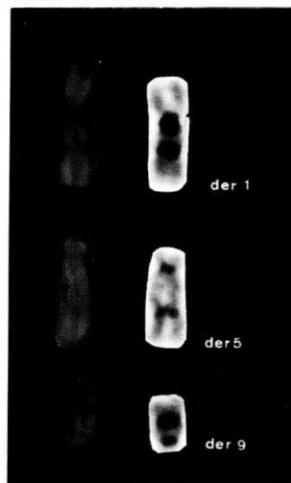
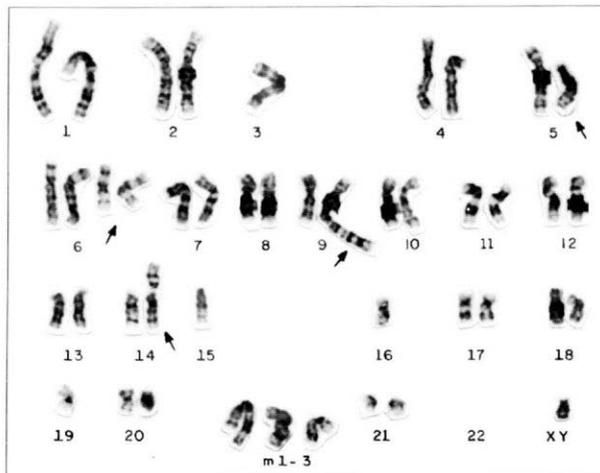


Figura 1.
A. Cariotipo con bandeamiento G del caso 046Ua. Nótese la presencia de dos copias de i(6p) y cuatro copias de 1q.
B. Se ilustran los principales marcadores de la población designada como 046b, del mismo paciente, con bandas Q y C. La calidad y los rearrreglos cromosómicos son diferentes.

Tabla 2: Rearreglos cromosómicos específicos en retinoblastomas.

	(1)%	(2)%
Deleción de 13q o monosomía 13	21	21
Copias adicionales de 1q	66	44
Copias adicionales de 6p	47	45
Monosomía 16, deleción 16q	66	18
Monosomía 17, deleción 17p	26	9
Amplificación génica (RHC, MDC)	11	9

(1) Nuestros resultados, basados en el análisis de 38 tumores primarios;
 (2) 82 tumores primarios y dos líneas celulares informados en la literatura (27).

cromosoma (Figura 3). El isocromosoma i(6p) es considerado un rearrreglo casi exclusivo de retinoblastoma, pero hasta el momento no se le ha asignado un papel específico. A este respecto, hemos identificado que copias adicionales de 6p están presentes en retinoblastomas indiferenciados que invaden el nervio óptico, correlación que se discute ampliamente en otro trabajo (34).

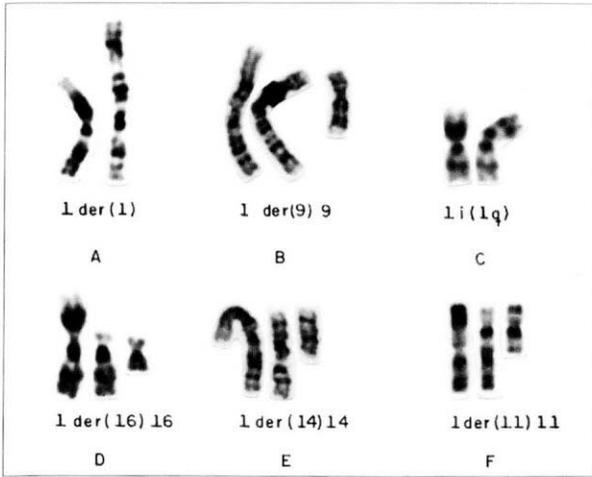


Figura 2. La composición fotográfica ilustra los diferentes rearrreglos cromosómicos que conducen a copias adicionales del brazo largo del cromosoma 1. **A:** *der(1): t(1;1)(1qter→1pter::1q25→1qter)* del caso 098U. **B:** *der(9): t(1q;9q)* del caso 046Ua. **C:** Isocromosoma 1q del caso 070U. **D:** *der(16): t(1;16)(1qter→1qh::16qh→16pter)* del caso 090U. **E:** *der(14): t(1q;14p)* del caso 046Ua. **F:** *der(1): t(1;13)* del caso 031B. Tinción con bandas G, excepto F, teñido con bandas R.

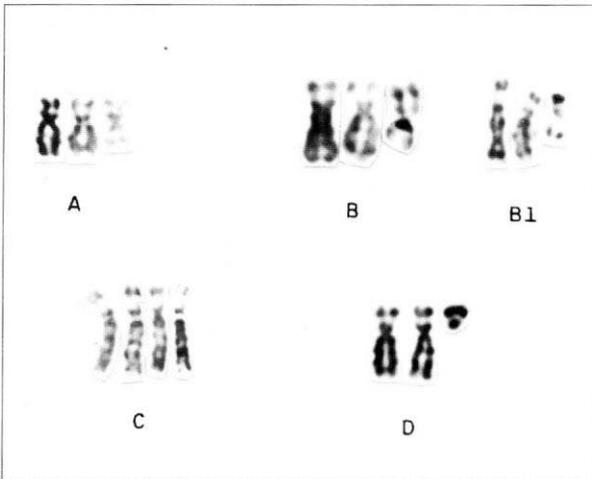


Figura 3. Mecanismos cromosómicos que conducen a copias adicionales del brazo corto del cromosoma 6. **A:** isocromosoma *i(6p)* del caso 089U. **B:** translocación *(6p;16q)* del caso 098U. **B1:** translocación *(6p;17q)* del caso 093U. **C:** tetrasomía 6 del caso 080U. **D:** derivado *6q* del caso 090U.

Las pérdidas totales o parciales del cromosoma 13 se encontraron en ocho casos. El caso más interesante para destacar es el 031B, pues la paciente presentó a

nivel constitucional una translocación X:13. El cromosoma X translocado se inactivó en la mayoría de las células y la inactivación se extendió a algunas bandas del cromosoma 13, observación realizada mediante estudio de replicación cromosómica con pulsos terminales de incorporación de bromodeoxiuridina (resultado no ilustrado). El estudio de la esterasa D demostró la presencia de un sólo alelo a nivel constitucional. En tejido tumoral encontramos la misma translocación, un cromosoma 13 citogenéticamente normal, otro cromosoma 13 translocado a un cromosoma 1 y ausencia de alelos de esterasa D (Figura 4).

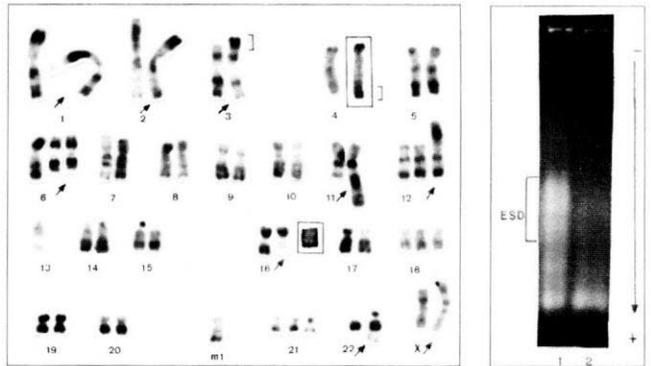


Figura 4.

A. Cariotipo con bandas R representativo del caso 031B: $49, X, -X, +der(X) t(X;13) (p22;p11), -1, +der(1) t(1;13), rea(2p), 3p+RHC, 4q+RHC, -6, +i(6p), +i(6p), -11, +der(11) t(1;11) (q11; q23), +12p+, -13, 16q-, +18, +21, +22q+, +M1$. Los cromosomas en el recuadro fueron tomados de otras metafases para resaltar la región homogéneamente coloreada en el cromosoma 5 y la delección del brazo largo del cromosoma 16. Las flechas indican los rearrreglos mencionados; nótese la translocación X:13, causante de la inactivación del cromosoma 13 translocado.

B. Patrón electroforético de la Esterasa D: carril 1 presenta la condición hemizigótica en sangre periférica, y el carril 2 muestra la ausencia de los dos alelos en tejido tumoral.

Los rearrreglos del cromosoma 16 fueron eventos muy frecuentes en los retinoblastomas analizados (66%), consistentes en ausencia de los dos cromosomas 16, pérdida de un cromosoma 16 y delección del brazo largo del homólogo (más frecuentemente a nivel de la banda 16q22), monosomía 16, delección del brazo largo o translocación 1:16 (Figura 2D)

La delección del brazo corto del cromosoma 17 o la monosomía 17 se presentaron con frecuencia del 26%.

Las regiones homogéneamente coloreadas (RHCs) se presentaron en los cromosomas 3 y 4 del caso 031B, y en el cromosoma 5 en el caso 044B. Los casos 035B y 123U presentaron en un 5% de las células un promedio de 10 minidiplocromosomas (MDCs). (Figura 5).

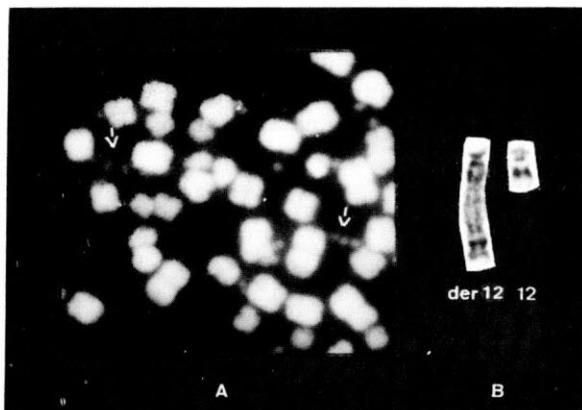


Figura 5. Composición fotográfica para ilustrar la amplificación génica. **A.** Bandeamiento Q del caso 035B que presenta minidiplocromosomas (flechas). **B.** Bandas G del caso 044B señalando una clara región homogéneamente coloreada.

DISCUSION

El retinoblastoma es un tumor que presenta un número cromosómico cercano a la diploidia. Nuestros resultados confirman este hecho pues en su mayoría los tumores tienen entre 45 y 47 cromosomas. Existen excepciones, tales como los casos 034U, 080U y 122U con 86, 94 y 75 cromosomas, respectivamente. Por tratarse de análisis directos podemos sugerir que la condición diploide es inicial y exitosa en la mayoría de los casos.

La existencia de dos poblaciones celulares claramente definidas y sin marcadores comunes en los casos 043U y 046U, nos permite inferir que se trata de dos focos tumorales diferentes. La multifocalidad define un caso como familiar. Sin embargo, en ambos pacientes el tumor se presentó en forma unilateral y sin antecedentes familiares. Debemos suponer entonces que la primera mutación fue transmitida por un progenitor portador asintomático o que se trata de una primera mutación nueva. Por cualquiera de las vías, la primera mutación lesionó todos los retinoblastos, hecho evidenciado en la existencia de dos focos tumorales diferentes, es decir dos tumores. Esta demostración de retinoblastomas familiares en pacientes con presentación unilateral, de gran trascendencia en

la consejería genética, sólo es posible mediante el análisis citogenético, puesto que nos permite identificar rearrreglos cromosómicos específicos de las poblaciones presentes en un tumor.

El porcentaje de tumores con pérdida del brazo largo del cromosoma 13 corresponde a lo informado en la literatura (27). El caso 031 es una interesante demostración de recesividad a nivel del tejido tumoral: la translocación X:13 presente a nivel constitucional es el primer evento mutacional ocasionado por extensión de la inactivación del cromosoma X al segmento autosómico de 13q; el análisis electroforético de la esterasa D - gen ligado al de retinoblastoma-, confirma la hemizigocidad a nivel constitucional. En tejido tumoral, la ausencia de los dos alelos de esterasa D permite inferir la pérdida del segundo alelo del gen RB, a pesar de que exista un cromosoma 13 citogenéticamente normal y de que no haya sido posible realizar ensayos para detectar la pérdida del gen RB1 por hibridación con RFLPs de ésta región. Un hallazgo similar ha sido informado sólo en una ocasión en la literatura (35, 36).

La polisomía del brazo largo del cromosoma 1 es hallazgo común en muchas neoplasias. La frecuencia de trisomía 1q informada para retinoblastoma corresponde a 44%; también se indica una alta frecuencia también para leucemias y otras neoplasias (37,38). Tal parece que no existe especificidad en cuanto a copias adicionales de 1q y que más bien podría pensarse que esta región está involucrada en el mantenimiento del proceso neoplásico, independientemente del tipo celular.

En este estudio la frecuencia de trisomía 1q correspondió a 66%, y la región consenso fue desde 1q25 hasta 1qter. Encontramos diferentes vías cromosómicas que llevan a copias adicionales de esta región. La vía más frecuente es la duplicación total o parcial de 1q sobre el mismo cromosoma 1, ya sea en su brazo corto o mediante la formación de un isocromosoma 1q o duplicación en tandem. Con una frecuencia menor ocurre la translocación 1:16 que produce trisomía 1q y deleción 16q, consiguiéndose así mediante un sólo evento, dos rearrreglos importantes en células de retinoblastoma. Se presentan igualmente translocaciones de 1q con otros cromosomas que en orden de compromiso son 9q, 11q, 8q, 9p, 10q, 12q, 16p, 20p. Este hecho nos señalaría, en principio, que existen sitios del genoma humano más propicios para permitir rearrreglos (bien sea por compartir regiones homólogas que faciliten la recombinación), o que lo observado es el fruto de la selección de movimientos aleatorios de los cromosomas durante la evolución tumoral. Puesto que la trisomía del brazo largo del cro-

mosoma 1 finalmente causa su efecto por el aumento de dosis de una región o banda específica, suponemos que los cromosomas involucrados en dichos rearrreglos se comportarían como aceptores temporales. A estos cromosomas receptores los denominamos cromosomas "trampolines".

El gran número de retinoblastomas con monosomía del cromosoma 16 o deleción a nivel de la banda 16q22 (66% en nuestro estudio vs 18% en la literatura) podría deberse al amplio escrutinio realizado en nuestro análisis. La elevada frecuencia de esta alteración en este tumor, sugiere la presencia de un gen supresor tumoral en esa región cromosómica, asociación aún no evaluada.

La deleción 17p o monosomía 17, no ha sido presentada hasta el momento como un rearrreglo común en retinoblastoma, a pesar de que en la literatura se describe en 7 de 82 tumores (27). Consideramos que puede ser un rearrreglo de importancia debido a que la encontramos con una frecuencia ligeramente mayor a la deleción 13q. Además, el gen supresor tumoral p53 está ubicado en 17p (39), y las pérdidas alélicas de p53 son muy frecuentes en tumores del adulto (40). Por todo esto, sugerimos evaluar la pérdida de heterocigocidad de este antioncogen en retinoblastoma.

Las regiones homogéneamente coloreadas y los mini-diplocromosomas son rearrreglos de amplificación génica (41) que, en algunas neoplasias como neuroblastoma, se asocian con mayor agresividad tumoral (42); en retinoblastoma se ha demostrado que corresponden a copias múltiples del oncogen N-Myc (43), pero se desconoce su implicación en esta neoplasia.

Como se señaló inicialmente, la búsqueda del gen RB1 y su posterior caracterización, se originó en el hallazgo de la deleción en el brazo largo del cromosoma 13 en sangre periférica de pacientes con retinoblastoma hereditario, y posteriormente en el tejido tumoral. La trascendencia de los estudios cromosómicos es evidente al encontrarnos en este momento con un amplio conocimiento a nivel molecular de la acción del gen RB1.

La proteína de retinoblastoma está involucrada en el control del ciclo celular a nivel del paso de G1 a S, es decir, permite la entrada a los procesos de proliferación (44-47). Algunas oncoproteínas virales forman complejos con la proteína Rb, fenómeno que la inac-

tiva de manera similar a las alteraciones genéticas por deleción que se dan en tumores primarios (48-51). Igualmente interesantes son los hallazgos de formación de complejos entre RB y E2F, este último un factor regulador de la transcripción de genes vinculados con la síntesis del DNA (c-Myc, N-Myc, c-Myb, DHFR, entre otros) (52, 53); RB controlaría la actividad del factor transcripcional E2F. Así, cuando E2F es liberado, este puede activar genes responsables para la entrada al ciclo celular (54). En términos generales, la proteína del retinoblastoma es un regulador del ciclo celular normal en todos los tipos celulares humanos.

Con el presente trabajo, queremos señalar que posteriores estudios moleculares dirigidos a los cromosomas 1, 6, 16 y 17, indicarán vías importantes y desconocidas en la progresión del retinoblastoma, con consecuencias de enorme trascendencia no solo en investigación básica sino también para el pronóstico y el tratamiento de esta neoplasia.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se desarrolló, en parte, con la financiación del Fondo de Investigaciones del Banco de la República, y de Ciencias (Cod. 1101-05-240-89).

Su realización fue posible gracias a la colaboración de las siguientes Instituciones o sus Servicios de Oftalmología, mediante el envío de muestras de retinoblastomas: Instituto Barraquer de América, Instituto Nacional de Cancerología, Fundación Oftalmológica de Santander, Hospital San Vicente de Paul de Medellín, Hospital Militar Central, Clínica San Rafael, Clínica de la Policía, Clínica de Colsubsidio, Hospital de la Misericordia.

SUMMARY

Retinoblastoma permitted the description of a new category of genes related to oncogenesis (antioncogenes or tumor suppressor genes) and thus it became paradigmatic in genetics of solid tumors. We have analyzed cytogenetically 38 primary retinoblastoma tumors, and we report chromosomal rearrangements and their frequencies: 1q polysomy (66%), 6p supernumerary (47%), 16q deletion (66%), 17p deletion (26%), 13q deletion (21%), amplification of chromosomal regions (11%). We discuss the probable role of these chromosomal rearrangements in the light of new findings of molecular mapping.

REFERENCIAS

1. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-823.
2. Yunis JJ, Ramsay N. Retinoblastoma and sub-band deletion of chromosome 13. *Am J Dis Child* 1978; 132: 161-163.
3. Sparkes RS, Sparkes MC, Wilson MG, et al. Regional assignment of genes for human esterase D and Retinoblastoma to chromosome band 13q14. *Science* 1980; 208: 1042-1044.
4. Sparkes RS, Murphree AL, Lingua RW, et al. Gene for hereditary retinoblastoma assignment to human chromosome 13 by linkage to esterase D. *Science* 1983; 219: 971-973.
5. Benedict WF, Murphree AL, Banerjee A, et al. Patient with 13 chromosome deletion: evidence that the retinoblastoma gene is a recessive cancer gene. *Science* 1983; 219: 973-975.
6. Dryja TP, Rapaport JM, Joyce JM, Petersen RA. Molecular detection of deletions involving band q14 of chromosome 13 in retinoblastomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 7391-7394.
7. Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, et al. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 1983; 305: 779-784.
8. Scrabble HJ, Sapienza C, Cavenee W. Genetic and epigenetic losses of heterozygosity in cancer predisposition and progression. *Advances in Cancer Research* 1990; 54: 25-61.
9. Friend H, Horowitz J, Gerber M, et al. Deletions of DNA sequence in retinoblastoma and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9059-9063.
10. Lee W-H, Bookstein R, Hong F, et al. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 1987; 235: 1934-1939.
11. Lee W, Shew J, Hong FD, et al. The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature* 1987; 329: 642-645.
12. Dunn JM, Philips RA, Becker AJ, Gallie BL. Identification of germline and somatic mutations affecting the retinoblastoma gene. *Science* 1988; 241: 1797-1800.
13. Horowitz JM, Park SH, Bogenmann E, et al. Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2775-2779.
14. Yunis JJ. Genes and chromosomes in human cancer. *Adv Oncol* 1992; 6: 3-7.
15. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23-28.
16. Kendall WS, Frost P. Genomic instability, tumor heterogeneity and progression. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1988; 233: 1-4.
17. Inoue S, Ravindranath Y, Ottenbreit OJ, et al. Chromosomal analysis of metastatic retinoblastoma cells. *Hum Genet* 1974; 25: 111-118.
18. Hossfeld D. Chromosome 14q+ in retinoblastoma. *Int J Cancer* 1978; 21: 720-723.
19. Balaban G, Gilbert F, Nichols W, et al. Abnormalities of chromosome No. 13 in retinoblastomas from individuals with normal constitutional karyotypes. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; 6: 213-221.
20. Gardner HA, Gallie BL, Knight LA, Phillips RA. Multiple karyotypic changes in retinoblastoma tumor cells: normal chromosome No. 13 in most tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; 6: 201-211.
21. Kusnetsova LE, Prigonina EL, Pogosianz HE, Belkina B. Similar chromosomal abnormalities in several retinoblastomas. *Hum Genet* 1982; 61: 201-204.
22. Benedict WF, Banerjee A, Mark C, Murphree AL. Nonrandom chromosomal changes in untreated retinoblastomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1983; 8: 311-333.
23. Chaum E, Ellsworth RM, Abramson DH, et al. Cytogenetic analysis of retinoblastoma: evidence for multifocal origin and in vivo gene amplification. *Cytogenet Cell Genet* 1984; 38: 82-91.
24. Squire J, Gallie BL, Phillips RA. A detailed analysis of chromosomal changes in heritable and non-heritable retinoblastoma. *Hum Genet* 1984; 70: 291-301.
25. Squire J, Phillips RA, Boyce S, et al. Isochromosome 6p, a unique chromosomal abnormality in retinoblastoma: Verification by standard staining techniques, new densitometric methods, and somatic cell hybridization. *Hum Genet* 1984; 66: 46-53.
26. Workman ML, Soukup SW. Chromosomes features of two retinoblastomas. *Cancer Gene Cytogenet* 1984; 12: 365-370.
27. Potluri V, Helson, Ellsworth R, et al. Chromosomal abnormalities in human Retinoblastoma. *Cancer* 1986; 58: 663-671.
28. Atkin NB, Baker M. Chromosome preparations from fresh retinoblastoma. *Cancer* 1979;44:604-613.
29. Caspersson T, Lomakka G, Zech L. The 24 fluorescence patterns of the human metaphase chromosomes distinguishing characters and variability. *Hereditas* 1971; 68: 89-102.
30. Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expt Cell Res* 1972; 75: 304-306.

31. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 1971; 2: 971.
32. Schested JA. A simple method for R banding of human chromosomes, showing a pH depend connection between R and G. *Hum Genet* 1974; 21: 55-58.
33. Hopkinson DA, Mestriner MA, Cortner I, Harris H. Esterase D: A new human polymorphism. *Ann Hum Genet* 1973; 37: 119-137.
34. Cano J, Oliveros O, Yunis E. Additional copies of 6p and malignancy in retinoblastoma. Submitted to *Cancer Genetics & Cytogenetics* 1993.
35. Cross HE, Hansen RC, Morrow G, Davis JR. Retinoblastoma in a patient with a 13pXp translocation. *Am J Ophthalmol* 1977; 84: 548-554.
36. Mohandas T, Sparkes RS, Shapiro LJ. Genetic evidence for the inactivation of a human autosomal locus attached to an inactive X chromosome. *Am J Hum Genet* 1982; 34: 81-817.
37. Douglass EC, Green AA, Hayes FA, et al. Chromosome 1 abnormalities: a common feature of pediatric solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1985; 75: 51-54.
38. Atkin NB. Chromosome 1 aberrations in cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 21:279-285.
39. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
40. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorrectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 217-221.
41. Cowell JK. Double minute and homogeneously staining regions. Gene amplification in mammalian cells. *Ann Rev Genet* 1982;16:21- 59.
42. Brodeur GM, Seeger RC, Sather H, et al. Clinical implications of oncogen activation in human neuroblastomas. *Cancer* 1986; 58: 541-545.
43. Lee W-H, Murphree AL, Benedict WF. Expression and amplification of the N-MYC gene in primary retinoblastoma. *Nature* 1984; 309: 458-460.
44. Mihara K, CAO X-R, Yen A, et al. Cell cycle-dependent regulation of phosphorylation of human retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 46: 1300-1303.
45. Buchkovich K, Duffy LA, Harlow E. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 1989; 58: 1097-1105.
46. DeCaprio JA, Ludlow JW, Lynch D, et al. The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* 1989; 58: 1085-1095.
47. Goodrich DW, Wang NP, Qian Y-W, et al. The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 1991; 67: 293-302.
48. DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, et al. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 1988; 54: 137-146.
49. Whyte P, Buchkovich, Horowitz M, et al. Association between an oncogene and anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1988; 334: 124-129.
50. Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243: 934-937.
51. HU Q, Dyson N, Harlow E. The regions of the retinoblastoma protein needed for binding to adenovirus E1A or SV40 large T antigen are common sites for mutations. *The EMBO Journal* 1990; 9: 1147-1155.
52. Shirodkar S, Ewen M, DeCaprio JA, et al. The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107- cyclin A complex in a cell cycle-regulated manner. *Cell* 1992; 68: 157-166.
53. Cao L, Faha B, Dembski M, et al. Independent binding of the retinoblastoma protein and p107 to the transcription E2F. *Nature* 1992; 355: 176-179.
54. Nevins JR. E2F: A link between the RB tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 1992; 258: 424-429.