

Retinoblastoma: análise cromossômica

Retinoblastoma: cytogenetic study

Clélia Maria Erwenne⁽¹⁾

Maria Cecília Menks Ribeiro⁽²⁾

Raquel Joffe⁽²⁾

Joyce A. D. Andrade⁽³⁾

José Carlos Gouvêa Pacheco⁽⁴⁾

RESUMO

O artigo refere o resultado da análise cromossômica de 27 portadores de retinoblastoma uni ou bilateral, de ambos os sexos, esporádicos ou familiares, virgens de tratamento ou após 6 meses do término de quimioterapia sistêmica, triados no Ambulatório de Oftalmologia do Hospital A.C. Camargo da Fundação Antônio Prudente/São Paulo. Foi dada preferência àqueles que apresentavam, no quadro clínico geral, malformações congênitas, alterações fenotípicas ou retardo mental. Encontrou-se cromossomopatia inespecífica em 2 pacientes submetidos à poliquimioterapia e cromossomopatia conhecidas em outros 3 (47,XX+G; 46,XY/47,XY+G;46,XY/46,XY13q-). Os autores discutem os resultados, a associação de cromossomopatia e retinoblastoma e a indicação do exame do cariótipo nesses pacientes.

Unitermos: retinoblastoma, tumor ocular, cariótipo

INTRODUÇÃO

Durante as duas últimas décadas, muita ênfase se deu ao estudo do cariótipo em pacientes com retinoblastoma, uma vez que Lele e col., em 1963, haviam descrito uma aberração do cromossomo 13 em portador dessa doença. Com o intuito de cobrir essa patologia em todos os seus aspectos realizamos a análise cromossômica de uma série desses pacientes provenientes do Serviço de Oftalmologia do Hosp. A.C. Camargo da Fundação Antônio Prudente, cujo resultado passamos a relatar.

MATERIAL E MÉTODO

Foram selecionados 27 portadores de retinoblastoma bilateral ou unilateral, familiar ou esporádico, virgens de tratamento sistêmico ou após um tempo mínimo de 6 meses do término de terapêutica quimioterápica (QT), dando preferência àqueles em cujo exame físico se detectou qualquer anormalidade fenotípica, malforma-

ção congênita, presença de retardo neuropsicomotor (RNPM) ou de recorrência familiar.

O estudo citogenético foi efetuado pela Disciplina de Genética da Escola Paulista de Medicina, a partir da cultura temporária de leucócitos de sangue periférico (Moorhead e col., 1960).

RESULTADOS

Nessa amostra, 15 pacientes eram do sexo feminino (55,6%) e 12 do masculino (44,4%); 12 eram portadores de retinoblastoma bilateral (44,4%), e 15 unilateral (55,6%); em 19, o caso era esporádico (70,4%) e em 8 havia recorrência familiar (29,6%); em 3 (11,1%) observaram-se anormalidades fenotípicas, em 2 (7,4%) o RNPM era evidente e em 1 (3,7%) duvidoso.

O exame citogenético detectou aberrações cromossômicas conhecidas em 3 (11,1%). Nos 24 restantes (88,9%) o cariótipo foi considerado normal. Destes, observaram-se ano-

Trabalho realizado pelo Serviço de Oftalmologia do Hospital A. C. Camargo e pela Disciplina de Genética da Escola Paulista de Medicina.

- (1) *Doutor em Oftalmologia. Titular do Serviço de Oftalmologia do Hospital A.C. Camargo/Fundação Antônio Prudente/São Paulo*
- (2) *Doutor em Genética. Colaboradora da Disciplina de Genética da Escola Paulista de Medicina*
- (3) *Doutor em Genética. Chefe da Disciplina de Genética da Escola Paulista de Medicina*
- (4) *Livre Docente em Oftalmologia. Titular e Chefe do Serviço de Oftalmologia do Hospital A.C. Camargo/Fundação Antônio Prudente/São Paulo*

Endereço para correspondência: Clélia M. Erwenne - Rua Escobar Ortiz, 730 - 04512 - São Paulo - Brasil.

TABELA I
Caracterização de uma amostra de portadores de retinoblastoma quanto ao sexo, lateralidade, recorrência familiar, malformações congênitas e tratamento sistêmico.

| Caso | Sexo | Lateralidade do TU | Recorrência Familiar | Malf.Assoc. R.N.P.M. | Trat. Anterior | | Cariótipo |
|------|------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------|--------|------------------|
| | | | | | QT | Virgem | |
| 1 | M | Uni | - | - | - | SIM | 46,XY |
| 2 | F | Bi | SIM | - | 28m | - | 46,XX |
| 3 | M | Uni | SIM | - | 28m | - | 46,XY |
| 4 | M | Bi | - | - | 8m | - | 46,XY |
| 5 | F | Bi | - | - | - | SIM | 46,XX |
| 6 | F | Bi | - | - | 27m | - | 46,XX |
| 7 | M | Uni | - | - | - | SIM | 46,XY |
| 8 | M | Bi | - | ? | - | SIM | 46,XY/47,XY+G |
| 9 | F | Bi | SIM | - | - | - | 46,XX |
| 10 | F | Bi | SIM | - | - | - | 46,XX |
| 11 | F | Uni | - | - | - | SIM | 46,XX |
| 12 | F | Uni | - | SIM | 15m | - | 47,XX+G |
| 13 | F | Uni | SIM | - | - | - | 46,XX |
| 14 | F | Bi | - | - | - | SIM | 46,XX |
| 15 | F | Uni | - | - | 14m | - | 46,XX |
| 16 | F | Uni | - | - | 18m | - | 46,XX |
| 17 | M | Bi | - | - | 48m | - | 46,XY |
| 18 | F | Uni | - | - | - | SIM | 46,XX |
| 19 | M | Uni | - | - | 18m | - | 46,XY |
| 20 | M | Uni | - | - | - | SIM | 46,XY |
| 21 | M | Uni | - | - | 72m | - | 46,XY |
| 22 | M | Bi | - | SIM | 18m | - | 46,XY/46,XY,13q- |
| 23 | M | Uni | SIM | - | - | - | 46,XY |
| 24 | M | Uni | - | SIM | 22m | - | 46,XY |
| 25 | F | Bi | - | - | - | SIM | 46,XX |
| 26 | F | Bi | SIM | - | - | - | 46,XX |
| 27 | F | Uni | SIM | - | - | SIM | 46,XX |

| | | | |
|-----|------------------|---------|---------------------------------|
| M | = Sexo masculino | TU | = Tumor |
| F | = Sexo feminino | R.N.P.M | = Retardo neuropsicomotor |
| Uni | = Unilateral | QT | = Quimioterapia prévia ao exame |
| Bi | = Bilateral | | |

malias estruturais ou numéricas esporádicas em 5 (20,8%).

Os dados estão sumariados nas tabelas I e II.

DISCUSSÃO

Nessa amostra, a proporção de sexos e de tumores bilaterais ou unilaterais foi semelhante. A avaliação desses parâmetros foi puramente

casual, uma vez que o sexo ou a lateralidade do tumor não tiveram qualquer preferência na seleção dos pacientes. Em grandes séries da literatura, o retinoblastoma não mostra qualquer predileção por sexo (Vogel, 1979) e, em relação à lateralidade, classicamente é bilateral em 30% dos casos (Minoda, 1978). A frequência de casos familiares (29,6%) elevada em relação aos dados de François et col. (1978), que os estimou em 6%,

é justificada pela preferência que tiveram estes casos na seleção da amostra; o mesmo se pode dizer em relação à presença do retardo mental e das anormalidades fenotípicas.

Aberrações citogenéticas conhecidas foram detectadas nos casos de números 8, 12 e 22. O caso 8 correspondeu a uma criança de raça amarela, com 2 anos e 3 meses de idade, que chegou ao nosso serviço em mau estado geral, com retinoblastoma bilateral, com invasão da órbita causando proptose do lado direito e tomando totalmente o globo ocular esquerdo. Pareceu-nos apática, sendo discutível a presença de retardo mental. A família não dominava a língua portuguesa e nos foi difícil um levantamento familiar adequado. Procedemos ao exame ocular dos pais e de um irmão que os acompanhava, todos normais. O exame clínico não acusou qualquer malformação. O exame radiológico do crânio mostrou uma braquicefalia com suturas abertas, discreta hipoplasia da região nasomaxilar e aumento da órbita direita com desvio dos seios esfenoidais. O exame citogenético do sangue periférico obtido antes da exposição a qualquer quimioterápico (caso virgem) mostrou um mosaico celular. Em 14 células estudadas, 3 eram normais (46,XY), 8 apresentavam um cromossomo acrocêntrico pequeno a mais, classificado com 21 (47,XY,+G), e as outras 3 eram hipodiplóides, consideradas como células rompidas, sendo que em duas se identificou o cromossomo G adicional. O diagnóstico citogenético 46,XY/47,XY,+G é compatível com a síndrome de Down em mosaico. A criança submeteu-se a exenteração da órbita D e enucleação do olho E. Iniciou QT com reações clínicas adversas vindo a falecer. A porcentagem de células com a trissomia G no sangue periférico foi elevada (71,4%), no entanto o exame clínico do paciente não acusou fenótipo compatível com esse mosaico. Tal fato pode ser decorrente da presença de um mosaico baixo em outros tecidos, ou, como acreditamos,

| TABELA II | | | | |
|--|-----------------|---|---------------|--------|
| Anormalidades citogenéticas encontradas em pacientes com retinoblastoma (sangue periférico). | | | | |
| Caso | Anormalidades % | Cariótipo das células anômalas | Nº de células | Obs. |
| 02 | 9,09 | 45, XX, -D | 1 | QT |
| 03 | 35,3 | 46 XY, -12, +17 | 1 | QT |
| | | 46 XY, -8, +2 DIC | 1 | |
| | | + 1 fragmento acêntrico | 1 | |
| | | 47, XY, -1, +E, +1 DIC, | 1 | |
| | | 48, XY, -2, -D, -F, +1 DIC, +3 fragmentos acêntricos + +1 acrocêntrico pequeno | 1 | |
| 46, XY, 17 quebras cromatídicas, 18 p- | 1 | | | |
| 45, XY, -9 | 1 | | | |
| 04 | 8,3 | 40, -1, -2, -3, -B, -E, -2F, -2C, + acrocêntrico grande + +1 fragmento acêntrico +1 DIC | 1 | QT |
| 05 | 18,2 | 45, XX + fragmento acêntrico, 45, XX -G | 1 1 | VIRGEM |
| 08 | 71,4 | 45, -D | 1 | VIRGEM |
| | | 45, -C, -E +G | 1 | |
| | | 46 XY, -E, +G | 1 | |
| | | 47, XY, +G | 8 | |
| | | 47, XY +G/46XY | 3 | |
| 46, XY | 3 | | | |
| 12 | 100 | 47, XX G + | 11 | QT |
| 22 | 65 | 46, XY/46, XY13q- | 92 | QT |
| QT = quimioterapia prévia ao exame. | | | | |

de idade, o RNPM era evidente. O eletroencefalograma apresentou atividade irritativa difusa. Ao exame clínico, observamos que os cabelos eram duros e de implantação baixa, raiz nasal larga, nariz bulboso, micrognatia, filtrum largo, lábio superior fino, orelhas grandes com lobos aumentados, clino e camptodactilia dos dedos das mãos. O exame dos cromossomos mostrou a presença de deficiência intersticial parcial do cromossomo 13, em mosaico, sendo o cariótipo 46XY/46,XY,del(13)(q12q21.3) (Figura 1).

No retinoblastoma, a deficiência parcial do braço longo do cromossomo 13 é relativamente rara. Atualmente há cerca de 140 casos descritos com esta alteração (Munier, F. et col., 1989). O quadro clínico se caracteriza sempre pela presença do retinoblastoma com RNPM e alterações fenotípicas (Vogel, 1979, Motegi e col., 1983). Têm sido observados: palato ogival, palato fendido, úvula bífida, polegar hipoplásico ou ausente, clino e camptodactilia, estenose de esôfago e ânus, orientação mongolóide de fendas palpebrais, microftalmia, cologoma de iris, hi-

decorrente da condição de saúde geral da criança no momento em que entrou no Hospital, aliada às características raciais próprias (amarela), dificultando a caracterização clínica da síndrome de Down.

O caso 31 correspondeu a uma criança do sexo feminino, com quadro fenotípico característico da síndrome de Down e cariótipo mostrando a aneuploidia correspondente à clínica (trissomia 21 universal).

O caso 22 correspondeu a uma criança do sexo masculino, portadora de retinoblastoma bilateral, diagnosticado aos sete meses de idade; teve seu olho E enucleado e foi encaminhada para tratamento conservador, por apresentar massa tumoral única no quadrante temporal superior do olho D. Tinha antecedentes obstétricos negativos e apresentava sinais de retardo do desenvolvimento neuropsicomotor (não sustentava a cabeça aos 6 meses de idade). Aos 10 meses

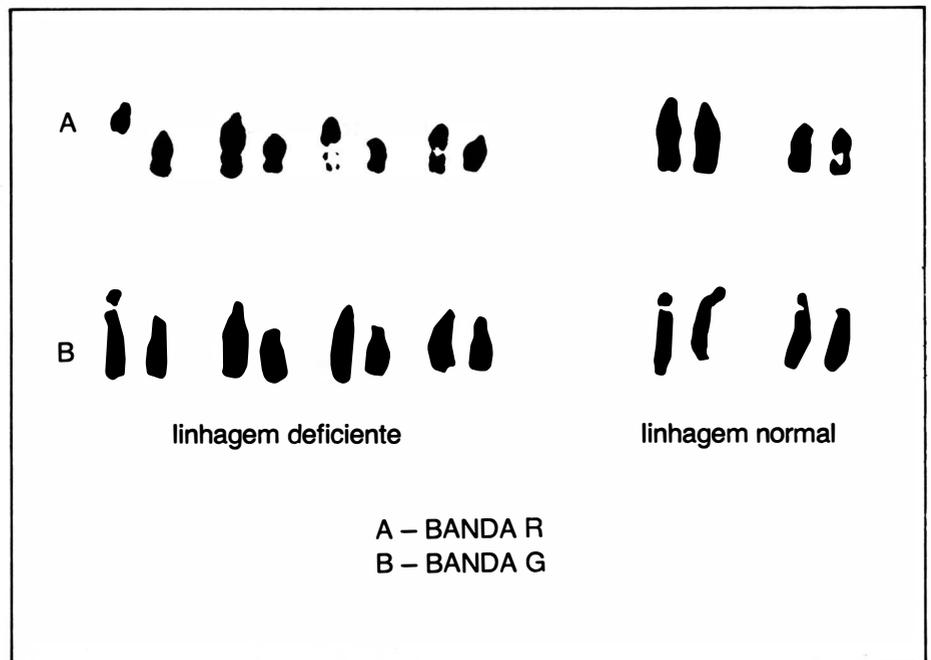


Fig.1 - Detalhe do cariótipo do paciente nº 22, mostrando as duas linhagens celulares 46XY/46, XY, del(13)(q12q21.3).

pertrofia do lobo da orelha, microgmatia e malformações esqueléticas. Não se definiu um quadro sindrômico, parecendo ser a variação fenotípica uma função da extensão do segmento cromossômico perdido, entretanto, Motegi e col. (1983) admitem a presença de um padrão facial comum a este grupo, caracterizado pela presença de sobrelhas proeminentes, base nasal achatada, nariz bulboso, boca grande com lábio superior estreito e "filtrum" longo. O paciente em pauta enquadra-se perfeitamente no padrão proposto para os portadores da deleção parcial do braço longo do cromossomo 13 e o seu estudo bioquímico mostrou níveis da enzima Esterase D no sangue compatíveis com esse achado (Erwenne, CM e col., 1983). O cariótipo de ambos os pais do afetado era normal.

Aberrações citogenéticas estruturais ou numéricas esporádicas foram detectadas nos casos 2, 3, 4, 5 e 24. No caso 2, encontrou-se apenas 1 célula hipomodal em 11 (45,XX,-D), que pode ser considerada célula rompida por artefato de técnica. O caso 3 mostrou 35,3% de anomalias. Uma célula era hipodiplóide e as demais apresentavam, além de variações numéricas, várias anomalias tais como fragmentos acêntricos, quebras cromatídicas e cromossomos dicêntricos. Não havia alterações morfológicas dos cromossomos 13. No caso 4, encontramos uma célula anormal em 12 (8,3%). Nesta, havia 49 cromossomos mais um fragmento acêntrico, um cromossomo dicêntrico e um acrocêntrico grande (tabela II).

As várias alterações citogenéticas encontradas nos pacientes expostos anteriormente a quimioterápicos podem ser efeitos secundários dessas drogas. Os pacientes estudados receberam o sulfato de vincristina e a ciclofosfamida aproximadamente durante 2 anos. O sulfato de vincristina é um inibidor do fuso cariocinético, atuando, provavelmente, por ligação às proteínas dos microtúbulos do fuso, durante a cariocinese. Interfere,

portanto, no processo intrínseco de divisão celular. A ciclofosfamida atua diretamente no DNA, principalmente durante o processo da replicação. O caso 3 foi tratado também com a actinomicina D, usada em conjunto com as duas drogas acima referidas. A actinomicina D também atua no DNA, provavelmente por ligação direta à sua molécula, interferindo na síntese do DNA durante a replicação, atuando também na síntese do RNA. Há muito tempo se sabe que aberrações cromossômicas numéricas e estruturais, dos mais variados tipos, são produzidas por drogas. Schinzel & Schmid (1976) em revisão sobre efeitos produzidos por mutagênicos químicos em linfócitos, incluindo as três drogas aqui referidas, referem alterações cromossômicas e cromatídicas. Entre as primeiras, citam variações numéricas e estruturais, com a presença de dicêntricos e acêntricos e entre as cromatídicas descrevem quebras e gaps. Todas as alterações citogenéticas em linfócitos de sangue periférico encontradas nos pacientes que se enquadram neste grupo podem ser devidas às drogas utilizadas.

Dos 12 pacientes submetidos anteriormente à quimioterapia 6 apresentaram alterações cromossômicas, porém só 2 (16,6%) foram considerados por nós como possivelmente decorrentes desse tipo de tratamento.

Outros 2 foram considerados artefatos de técnica pertinentes às características próprias da preparação citológica para exame e nos 2 restantes o quadro clínico era sugestivo e foi compatível com o diagnóstico citogenético. Desta forma podemos dizer que 16,6% dos pacientes expostos à quimioterapia apresentaram alterações citogenéticas possivelmente decorrentes da exposição a drogas.

O tempo decorrido entre o término da quimioterapia e o estudo citogenético foi de 28 meses e 8 meses nesses 2 casos. Outros 6 pacientes (50,0%) utilizaram as mesmas drogas e não apresentaram qualquer anor-

malidade citogenética, num tempo que variou de 14 meses a 72 meses após o término do tratamento.

No caso 5, o cariótipo foi determinado antes de qualquer exposição à quimioterapia. Em 11 células estudadas, 9 eram normais, uma hipodiplóide (45,XX,-G) e uma com 46 cromossomos, sendo um deles um fragmento acêntrico. Essas alterações podem ser consideradas como artefato de técnica, a primeira por perda cromossômica e a segunda por fragmentação. Esses dados são insuficientes para caracterização de instabilidade cromossômica acentuada neste paciente.

No estudo citogenético do paciente 24, observamos variantes cromossômicas nos pares 13, 16 e 22, que causavam diferenças de tamanho entre esses homólogos. A técnica de banda C evidenciou serem essas variações de tamanho causadas por aumento da heterocromatina constitutiva. O exame físico da criança revelou prega transversal completa nas mãos, hiperplasia do lóbulo da orelha, palato alto e estreito, braquidactilia de mãos e pés e joelho valgo direito. Seu pai também apresentava braquidactilia e prega transversal completa unilateral.

As aberrações cromossômicas ocorreram tanto em casos unilaterais (37,5%) como em bilaterais (62,5%) e tanto em familiares (25%) como em esporádicos (75%), não se podendo fazer qualquer correlação entre a bilateralidade ou a recorrência familiar e a presença dessas alterações.

Já era do nosso conhecimento que o cariótipo de paciente com retinoblastoma em sangue periférico não mostra alterações cromossômicas evidenciáveis pelas técnicas atuais, a não ser quando o quadro clínico está associado a retardamento mental e múltiplas anormalidades fenotípicas, motivo pelo qual nesta amostra demos preferência aos casos em que se detectou qualquer anormalidade fenotípica ou RNPM. Verificamos realmente que, quando esses sinais clínicos estão presentes em portadores de retinoblastoma, a análise cro-

mossômica torna-se imperiosa.

O encontro da deficiência do cromossomo 13 é um dado importante na orientação da família. Em muitos casos estudados, esta deficiência estava presente em forma equilibrada, no cariótipo dos pais da criança afetada (Sparkes e col., 1979; Michalova e col., 1982), o que possibilitou o diagnóstico pré-natal para o próximo filho do casal.

Vários autores detectaram mosaicos cromossômicos em retinoblastoma: Taylor (1970) relatou mosaicismo Dq- em uma menina portadora de retinoblastoma bilateral, retardo mental e malformações congênitas; Sparkes e col. (1980) verificaram um mosaico 13q- com perda das bandas q14 a q22 em portadora de retinoblastoma unilateral, discreto retardo mental e ausência de malformações congênitas. A presença da deficiência parcial do cromossomo 13 em mosaico sugere que o mecanismo de origem do retinoblastoma bilateral possa envolver um fenômeno pós-zigótico.

As outras alterações encontradas (síndrome de Down e mosaico de Down) são aneuploidias cromossômicas que alguns autores referem ser frequentes em portadores de retinoblastoma (Jensen e Miller, 1971; Cernea e col., 1973 e Wilson e col., 1977). É discutível se a presença de aneuploidia induz o aparecimento de outras aberrações cromossômicas, se aumenta o risco de um evento mutacional, ou, ainda, se favorece a instabilidade cromossômica. Para Wilson e col. (1977), a observação prática sugere que o retinoblastoma é mais frequente entre os portadores de aneuploidia que em indivíduos com cariótipo normal.

SUMMARY

The article refers to the karyotype analysis of 27 unilateral or bilateral retinoblastoma patients from both sexes, sporadic or familial, before systemic chemotherapy or at least 6 months after it, selected at A.C. Camargo Hospital/Antonio Prudente Foundation - São Paulo. Patients with congenital malformations, phenotypic alterations or mental retardation were the priority for this examination. Inespecific chromosomopathy was founded in 2 patients who were exposed to multiple chemotherapy. In other 3 known alterations were seen (47,XX+G; 46,XY/47,XY+G; 46,XY/46XY,13q-). The authors discussed these associations and the indications of karyotype analysis in retinoblastoma patients.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CERNEA, P.; TEODORESCU, F.; ANGHILONI, T. - Rétinoblastome à mosaïcisme chromosomien 46, XX/47, XX G+. *Ann. Oculist (Paris)*, 206: 607-611, 1973.
2. ERWENNE, C.M.; RIBEIRO, M.C.M.; CONSTANZI, E.; ANDRADE, J.A.D.; SILVA, M.E.; GOUVÊA PACHECO, J.C. - Estudo cromossômico e bioquímico em paciente com retinoblastoma. *Rev. Bras. Oftalmol.*, 42(5): 324-7, 1983.
3. FRANÇOIS, J.; BIE, S.; MATTON-VAN LEUVEN, M. Th. - Genesis and genetics of retinoblastoma. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 22: 301-306, 1978.
4. JENSEN, R.D. & MILLER, R.W. - Retinoblastoma: epidemiologic characteristics. *New Engl. J. Med.*, 285: 307-301, 1971.
5. LELE, K.P.; PENROSE, L.S.; STALLARD, H.B. - Chromosome deletion in a case of retinoblastoma. *Ann. Hum. Genet.*, 27: 171-174, 1963.
6. MICHALOVÁ, K.; KLOUCEK, F.; MUSILOVÁ, J. - Deletion of 13q in two patients with retinoblastoma. One probability due to 13q - mosaicism in the mother. *Hum. Genet.*, 61: 264-266, 1982.
7. MINODA, K. - The International Symposium on Retinoblastoma. *Jap. J. Ophthalmol.*, 22: 299-300, 1978.
8. MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMANN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. - Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, 20: 613-616, 1960.
9. MOTEGI, T.; KAGA, M.; YANAGAWA, Y.; KADOWAKI, H.; WATANABE, K.; INOUE, A.; KOMATSU, M.; MINODA, K. A recognizable pattern of the midfare of retinoblastoma patients with interstitial deletion of 13q. *Hum. Genet.*, 64: 160-162, 183.
10. MUNIER, F.; PESCIA, G.; JOTTERANDBELLOMO, M.; BALMER, A.; GAILLOUD, C.; THONNEY, F. - Constitutional Karyotype in retinoblastoma. Case report and review of literature. *Ophthalmic paediatrics and genetics*, 10(2): 129-150, 1989.
11. SCHINZEL, A. & SCHIMID, W. - Lymphocyte chromosome studies in humans exposed to chemical mutagens. *Mutation Res.*, 40: 139-166, 1976.
12. SPARKES, R.S.; MULLER, H.; KLISAK, I. - Retinoblastoma with 13q - chromosomal deletion associated with maternal paracentric inversion of 14q. *Science* 203(9): 1027-1029, 1979.
13. SPARKES, R.S.; SPARKES, M.C.; WILSON, M.C.; TOWNER, J.W.; BENEDICT, W.; MURPHREE, A.C.; YUNIS, J.J. - Regional assignment of gene for human esterase D and retinoblastoma to chromosome band 13q14. *Science*, 208: 1042-1044, 1980.
14. TAYLOR, A.I. - Dq-, Dr and retinoblastoma. *Humangenetik*. 10: 209-217, 1970.
15. VOGEL, E. - Genetics of retinoblastoma. *Hum. Genet.* 52: 1-54, 1979.
16. WILSON, I.G.; EBBIN, A.J.; TOWNEE, J.W.; SPENCER, W.H. - Chromosomal anomalies in patients with retinoblastoma. *Clin. Genet.*, 12: 1-8, 1977.