

RETINOBLASTOMA EN ARGENTINA: ESTUDIO DE VARIANTES GERMINALES DEL GEN *RB1*

MARÍA EUGENIA DUCATELLI¹, MARIANA LAVIA², ELIZABETH MARTINEZ¹, CANDELA FREYTES³,
NOELIA PIERGROSSI⁴, BÁRBARA CAMPOS⁴, MARÍA GABRIELA OBREGON²,
PEDRO ZUBIZARRETA³, CRISTINA ALONSO⁴, PATRICIA RUBIO¹

¹Laboratorio de Biología Molecular de Hematología y Oncología, ²Servicio de Genética, ³Servicio de Oncología,

⁴Laboratorio de Secuenciación Sanger, Coordinación de Laboratorios, Hospital de Pediatría

Prof. Dr. Juan P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina

Dirección postal: María Eugenia Ducatelli, Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan, Combate de los Pozos 1881, 1245 Buenos Aires, Argentina

E-mail: mducatelli@garrahan.gov.ar

Recibido: 18-VI-2025

Aceptado: 25-VIII-2025

Resumen

Introducción: El retinoblastoma es una neoplasia de origen embrionario de la retina en desarrollo. Representa el cáncer ocular más frecuente en pediatría. Su presentación puede ser unilateral, bilateral o trilateral. En pacientes con retinoblastoma bilateral se observan variantes germinales en el gen *RB1* en alrededor del 90%, mientras que en unilateral en un 10-25% de los casos. Es fundamental el estudio molecular para su asesoramiento genético familiar.

Materiales y métodos: Se estudiaron 60 pacientes con retinoblastoma que consultaron al Hospital Garrahan entre 2018-2022. Para el estudio de variantes puntuales, se realizó la amplificación por PCR y secuenciación Sanger del gen *RB1*. Para la detección de alteraciones en el número de copias se utilizó Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification.

Resultados: De los 60 pacientes, se detectaron 22 variantes puntuales y 6 delecciones heterocigotas en los bilaterales (n:32). En aquellos con retinoblastoma unilateral (n:28) se observaron 2 con alteraciones, siendo en un caso una variante puntual y en el otro una delección del gen completo. Cuando fue posible, se realizó la segregación familiar y se procedió a realizar el asesoramiento genético familiar.

Discusión: El presente trabajo permitió describir las variantes genéticas de *RB1* en pacientes con retinoblastoma en la población pediátrica Argentina, con una distribución y tipo de variante similares a series descriptas en otras poblaciones. Actualmente, se encuentra en

el proceso la incorporación de la secuenciación de nueva generación, con el fin de lograr describir variantes con tecnología de mayor rendimiento.

Palabras clave: retinoblastoma, *RB1*, variante germinal, secuenciación Sanger, asesoramiento genético

Abstract

Retinoblastoma in Argentina: study of germline variants of the RB1 gene

Introduction: Retinoblastoma is an embryonal origin neoplasm of the developing retina. It represents the most frequent ocular cancer in childhood. The presentation can be unilateral, bilateral or trilateral. In patients with bilateral retinoblastoma, germline variants in the *RB1* gene are observed in approximately 90%, while in unilateral retinoblastoma in 10-25% of cases. Molecular study is essential for familial genetic counseling.

Materials and methods: Sixty patients with retinoblastoma who consulted Garrahan Hospital between 2018-2022 were evaluated. For the study of single nucleotide variants, PCR amplification and Sanger sequencing of the *RB1* gene was performed. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification was used to detect copy number alterations.

Results: Of the 60 patients, 22 single nucleotide variants and 6 heterozygous deletions were detected in bilateral retinoblastoma (n:32). In 2 patients with uni-

lateral retinoblastoma (n:28) alterations were observed, being in one case a single nucleotide variant and in the other a deletion of the whole gene. Family segregation and genetic counseling were performed when feasible.

Discussion: This study allowed us to describe the genetic variants of the *RB1* gene in Argentine pediatric patients with retinoblastoma. The distribution and types of variants observed in this patient group are similar to those described in other populations. Currently, next-generation sequencing is in the process of being incorporated in order to describe variants with higher throughput technology.

Key words: retinoblastoma, *RB1*, germline variant, Sanger sequencing, genetic counseling

PUNTOS CLAVE

Conocimiento actual

- El retinoblastoma es el tumor ocular más común en pediatría. Las variantes germinales en el gen *RB1* están presentes en la mayoría de los casos bilaterales y en un menor porcentaje de los unilaterales. El análisis molecular es esencial para el asesoramiento genético familiar.

Contribución del artículo al conocimiento actual

- En este estudio se logró identificar y describir variantes moleculares del gen *RB1* en pacientes argentinos con retinoblastoma, confirmando hallazgos consistentes con series nacionales e internacionales. Permitió realizar estudios de segregación familiar y brindar asesoramiento genético. Resalta la necesidad de incorporar *Next Generation Sequencing* para mejorar la detección.

El retinoblastoma es una neoplasia de origen embrionario que afecta a las células de la retina en desarrollo durante la primera infancia, siendo el cáncer ocular más frecuente en pediatría. Según el Registro Oncológico Hospitalario Argentino (ROHA), en el país se diagnostican aproximadamente 45 nuevos casos por año, lo que representa el 3.4% de todos los diagnósticos de cáncer en la edad pediátrica¹. Su presentación clínica puede ser unilateral, bilateral, cuando

afecta a ambos ojos o, excepcionalmente trilateral, cuando afecta al sistema nervioso central. Cuando la historia familiar de enfermedad es negativa, es importante diferenciar los casos unilaterales unifocales vs. multifocales, dado que en los últimos se identifican mayor porcentaje de variantes germinales (14% vs. 14-95% respectivamente)².

La proteína *RB1*, codificada por el gen del mismo nombre, actúa como un supresor de tumores y desempeña un rol importante en la regulación del ciclo celular, sobre todo en la transición G1/S. El retinoblastoma se caracteriza por la inactivación bialélica del gen *RB1*, localizado en el cromosoma 13 (13q14.2), es decir que resulta de dos alteraciones genéticas, una en cada alelo, que pueden incluir una variante germinal y otra somática, lo que frecuentemente conduce al desarrollo de retinoblastoma bilateral o trilateral (40%). Alternativamente, puede ocurrir que las dos variantes estén presentes solo a nivel somático, situación que se observa en la mayoría de los pacientes con retinoblastoma unilateral (60%)³. En los casos de retinoblastoma bilateral se observa una variante germinal en aproximadamente el 90% de los pacientes, en cambio, en los de presentación unilateral en un 10-25% de los casos⁴.

Desde el punto de vista del asesoramiento genético, es relevante determinar la presencia de variantes germinales en *RB1*, dado que pueden ser heredadas y transmitirse a la descendencia. Por otro lado, pueden predisponer a la aparición de otros tipos de neoplasia, tales como los osteosarcomas, entre otros⁵.

Entre las alteraciones genéticas descritas en este gen, se encuentran las variantes puntuales de tipo sin sentido (*nonsense*), que son alteraciones de cambio de nucleótido que llevan a la generación de un codón de terminación prematuro en la proteína; aquellas con cambio de sentido (*missense*), que implica un cambio de nucleótido que genera un cambio de un aminoácido por otro diferente; corrimiento de marco de lectura (*frameshift*) que incluye delecciones o duplicaciones/insersiones de pocos nucleótidos que desencadenan la generación de un codón de terminación prematura en la proteína; o de *splicing*, que implica un cambio de un nucleótido por otro en el sitio dador o acceptor de *splicing* que puede conducir a su alteración. Por otro

lado, se encuentran las grandes delecciones del gen que involucran desde uno o varios exones hasta el gen completo, pudiendo abarcar genes contiguos a RB1.

El propósito del presente trabajo es describir las variantes germinales en el gen RB1 evidenciadas en un grupo de pacientes diagnosticados con retinoblastoma en un hospital pediátrico de Argentina para abordar un correcto asesoramiento genético familiar.

Materiales y métodos

Pacientes

Fueron incluidos en este trabajo un total de 60 pacientes consecutivos que consultaron al Servicio de Genética del Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. Prof. Dr. Juan P. Garrahan para asesoramiento genético familiar en el período comprendido entre enero de 2018 y mayo de 2022. Del total de los niños estudiados, 32 presentaban retinoblastoma bilateral y 28 unilateral. El origen étnico de nuestra población resulta de la combinación de genes nativos con otros de origen principalmente europeos, en su mayoría provenientes de Italia y España.

Muestra estudiada

A todos los pacientes se les realizó extracción de ADN, a partir de 3 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), mediante la utilización del equipo automatizado de extracción de ácidos nucleicos Chemagic™360 (Perkin Erlmer®, Massachusetts, Estados Unidos). Para el estudio de variantes puntuales se utilizó una solución de trabajo de 10 ng/μl y para el de variantes en el número de copias una solución de 20 ng/μl. Se identificó para el presente trabajo cada paciente con su número de UPN (sigla del inglés *unique patient number*).

Estudio de variantes en el número de copias mediante MLPA (amplificación de sondas tras ligación múltiple)

Se utilizó el kit MLPA SALSA P047-RB1 (MRC Holland®, Amsterdam, Países Bajos), siguiendo las indicaciones del protocolo provisto por el fabricante. Para la separación electroforética de los fragmentos se utilizó el equipo de secuenciación capilar Applied Biosystems 3500 Series Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) y el software Fragment Analysis®. Para la interpretación de los resultados se utilizó el Software Coffalyzer (MRC Holland, Amsterdam, Países Bajos).

Estudio de variantes puntuales mediante PCR y secuenciación Sanger

Se realizó la amplificación por PCR de la región promotor, los 27 exones del gen RB1 y sus regiones intrónicas flanqueantes (+/-25pb) utilizando oligonucleótidos de diseño propio. Luego de verificar en un gel de agarosa al 1.75% el peso molecular de la banda del producto obtenido, se realizó su registro fotográfico. Seguidamente, los productos de amplificación obtenidos fueron procesados para la secuenciación Sanger con ExoSAP-IT® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) para lograr su purificación, y luego se procedió a la reacción de secuenciación. Se utilizó un equipo de secuenciación capilar Applied Biosystems ABI 3500 Series Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) y el software Sequencing Analysis, previo tratamiento con Big Dye Xterminator Purification Kit de Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

Análisis de variantes

Para la identificación de las variantes se comparó la secuencia de cada región estudiada con la secuencia de referencia genómica: NG_009009.1 y los resultados fueron expresados según la secuencia de referencia del transcripto NM_000321.3, y de la proteína NP_000312.2, siguiendo recomendaciones internacionales definidas por expertos⁶.

El presente trabajo se trata de un estudio observacional retrospectivo sobre prácticas médicas habituales en nuestra institución y cuenta con la aprobación del protocolo de registro por parte del Comité revisor y de ética en investigación de la institución, el cual eximió del consentimiento informado.

Resultados

Fueron analizadas muestras de sangre periférica pertenecientes a 60 pacientes que consultaron al Servicio de Genética del Hospital de Pediatría S.A.M.I.C. Prof. Dr. Juan P. Garrahan para asesoramiento genético familiar, de ellas, 32 correspondieron a niños con retinoblastoma bilateral y 28 a unilateral. En las Tablas 1 y 2 se puede observar la descripción detallada de las variantes halladas en cada grupo de pacientes. Se detectaron variantes germinales en el 50% de los niños estudiados.

En el grupo de pacientes con retinoblastoma bilateral, se evidenciaron variantes en el 88% de los casos (n: 28 niños), de las cuales 22 (57%) fue-

Tabla 1 | Variantes puntuales evidenciadas en el gen *RB1*

UPN	Lateralidad	Exón	Cambios a nivel del ADN (NM_000321.3)	Cambio a nivel de proteína (NP_000312.2)	Herencia
2134,1	Bilateral	12	c.1215+1G>A	<i>Splicing</i>	<i>De novo</i>
4249,1	Bilateral	4	c.473T>A	p.(Leu158X)	<i>De novo</i>
4253,1	Bilateral	9	c.929G>A	p.(Gly310Glu)	Materna
4274,1	Bilateral	17	c.1633T>G	p.(Glu545X)	Materna
4281,1	Bilateral	20	c.2011_2014del	p.(Glu672Thrfs*4)	ND
4312,1	Bilateral	18	c.1735C>T	p.(Arg579X)	<i>De novo</i>
4183,1	Bilateral	14	c.1351del	p.(Arg451Alafs*6)	Mamá sin variante
2405,3	Bilateral	23	c.2425dup	p.(Leu809Profs*6)	ND
2056,4	Bilateral	18	c.1735C>T	p.(Arg579X)	<i>De novo</i>
3124,4	Bilateral	12	c.1216+2T>C	<i>Splicing</i>	ND
4594,1	Bilateral	18	c.1770del	p.(Pro591Leufs*20)	ND
4728,1	Bilateral	*	Sin variantes	*	*
4848,1	Bilateral	18	c.1811A>G	p.(Asp604Gly)	<i>De novo</i>
4874,1	Bilateral	*	Sin variantes	*	*
4893,1	Bilateral	2	c.171del	p.(Phe57Leufs*8)	ND
4901,1	Bilateral	12	c.1215+1G>A	<i>Splicing</i>	ND
4944,1	Bilateral	22	c.2288_2289del	p.(Arg763Thrfs*31)	ND
2190,2	Bilateral	17	c.1694C>A	p.(Ser565X)	<i>De novo</i>
5213,1	Bilateral	11	c.1072C>T	p.(Arg358X)	ND
5326,1	Bilateral	14	c.1363C>T	p.(Arg455X)	Mamá sin variante
5339,1	Bilateral	14	c.1389+5G>A	<i>Splicing</i>	<i>De novo</i>
5348,1	Bilateral	14	c.1363C>T	p.(Arg455X)	Paterna
5417,1	Bilateral	14	c.1363C>T	p.(Arg455X)	ND
5578,1	Bilateral	20	c.2087del	p.(Arg696Lysfs*9)	ND
5579,1	Bilateral	*	Sin variantes	*	*
5582,1	Bilateral	*	Sin variantes	*	*
4212,1	Unilateral	20	c.1961T>A / c.1964A>G	p.(Val654Glu)/p.(Tyr655Cys)	Paterna
4265,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
4279,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
4297,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
2767,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
4157	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
2975,4	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
4436,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
4557,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
3146,4	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
4664,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
4690,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
4717,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
4741,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
4777,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
4821,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
4849,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
4871,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
4892,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
4900,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
5108,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
5350,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
5364,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
5442,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
5481,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
5506,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*
5600,1	Unilateral	*	Sin variantes	*	*

UPN: unique patient number; ND: no determinada

ron alteraciones puntuales y 6 (43%) variantes en el número de copias (CNV). Todas ellas fueron delecciones heterocigotas. De las CNV, 2 presentaron delección completa del gen *RB1* y 4 pacientes delecciones parciales, afectando los exones 1, 8, 16 en tres pacientes, y un caso adicional con una delección que abarcaba los exones 22 y 23.

En el grupo de pacientes con retinoblastoma unilateral, 2 niños (7%) presentaron variantes en el gen *RB1*, siendo una de ellas una alteración puntual (doble missense que se segregó como un haplotipo en varios integrantes de esa familia) y la segunda una delección completa del gen. Esta distribución se puede observar en las Figuras 1 y 2. En ambos casos no pudo ser descripto su compromiso unifocal o multifocal por no contar con dicha información.

De las 22 variantes puntuales detectadas en grupo de pacientes con retinoblastoma bilateral, 9 fueron variantes del tipo sin sentido (41%), 2 con cambio de sentido (9%), 7 frameshift (32%) y 4 fueron en el sitio dador/aceptor de splicing (18%).

Respecto a la distribución de las variantes a lo largo del gen, se pudo observar una tendencia de las variantes a agruparse entre los exones 12 y 18, con una mayor frecuencia de variantes en el exón 14 (23%), luego en el exón 18 (18%) y el exón 12 (14%), la distribución puede observarse en la Figura 3. En cuanto a las variantes de splicing, 3 de las 4 descriptas ocurrieron en el exón 12.

Segregación familiar de los hallazgos

En los 18 casos que fue posible, se realizó la segregación de la variante detectada en todos

Tabla 2 | Variantes en el número de copias en el gen *RB1*

UPN	Lateralidad	Alteración	Herencia
4226,1	Bilateral	Del het de <i>RB1</i>	<i>De novo</i>
4356,1	Bilateral	Del het de <i>RB1</i>	ND
4486,1	Bilateral	Del het E16	Materna
4644,1	Bilateral	Del het Ex 22 y 23	Materna
5165,1	Bilateral	Del het Ex 1	Materna
5486,1	Bilateral	Del het Ex 8	Mamá sin variante
4530,1	Unilateral	Del het de <i>RB1</i>	ND

UPN: unique patient number; Del: delección; Het: heterocigota; Ex: exón; ND: no determinado

Figura 1 | Tipo de alteración detectada en pacientes con retinoblastoma bilateral y unilateral

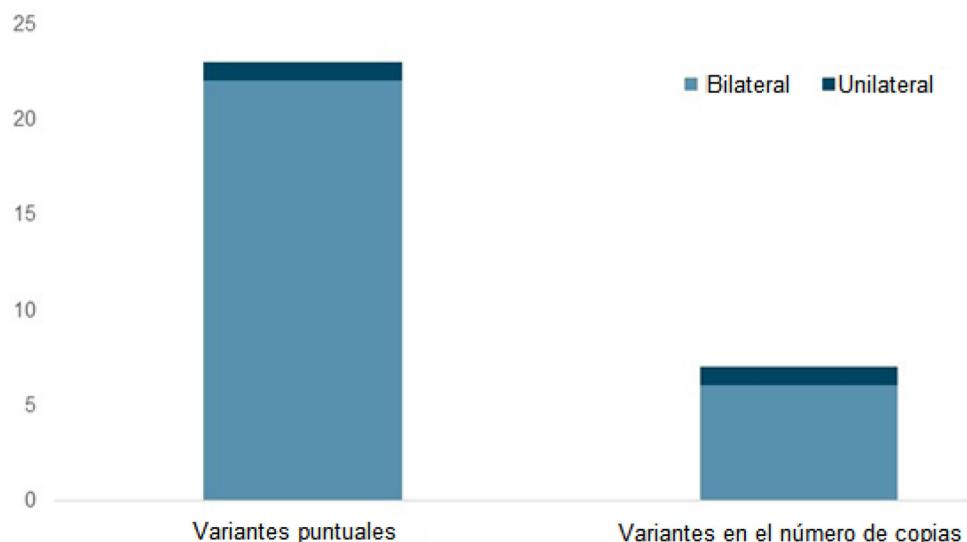
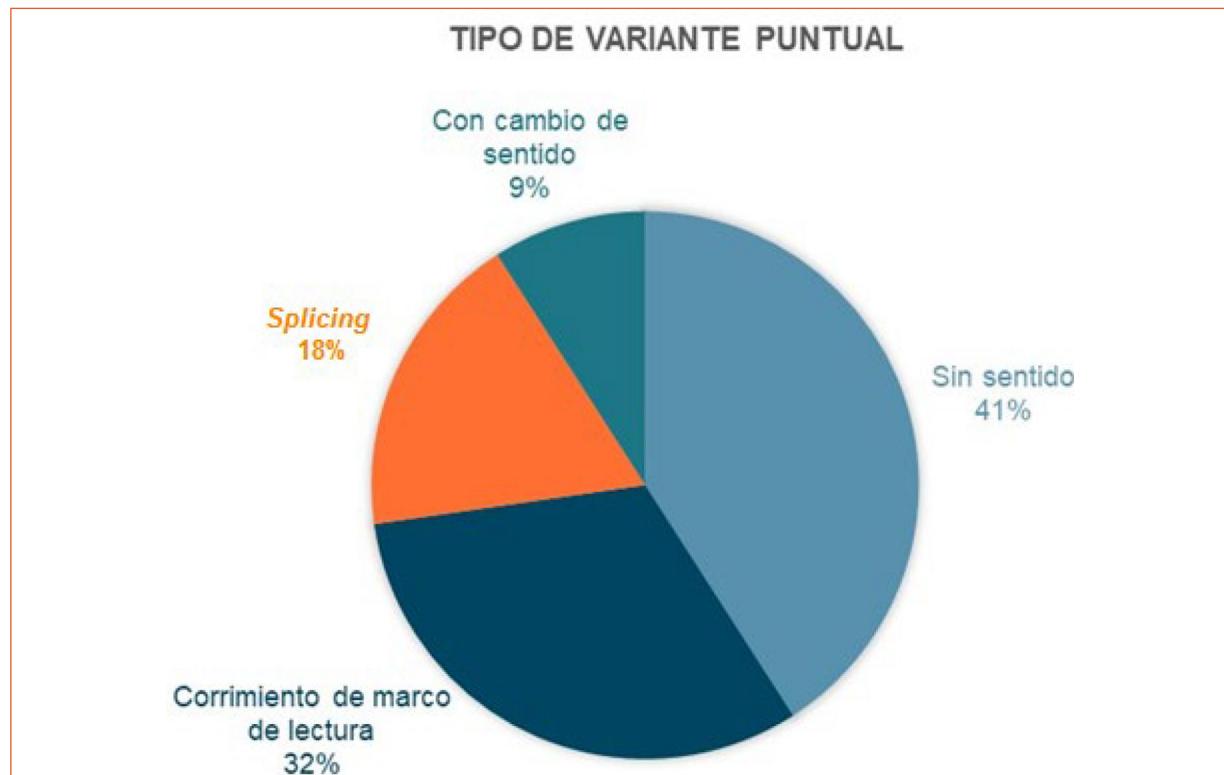
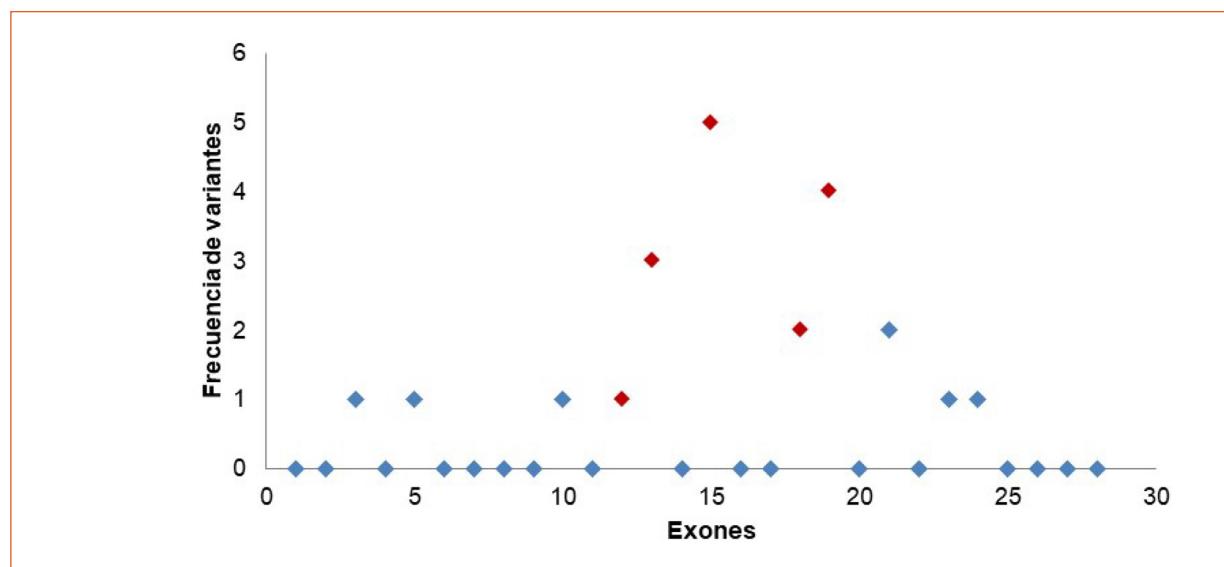
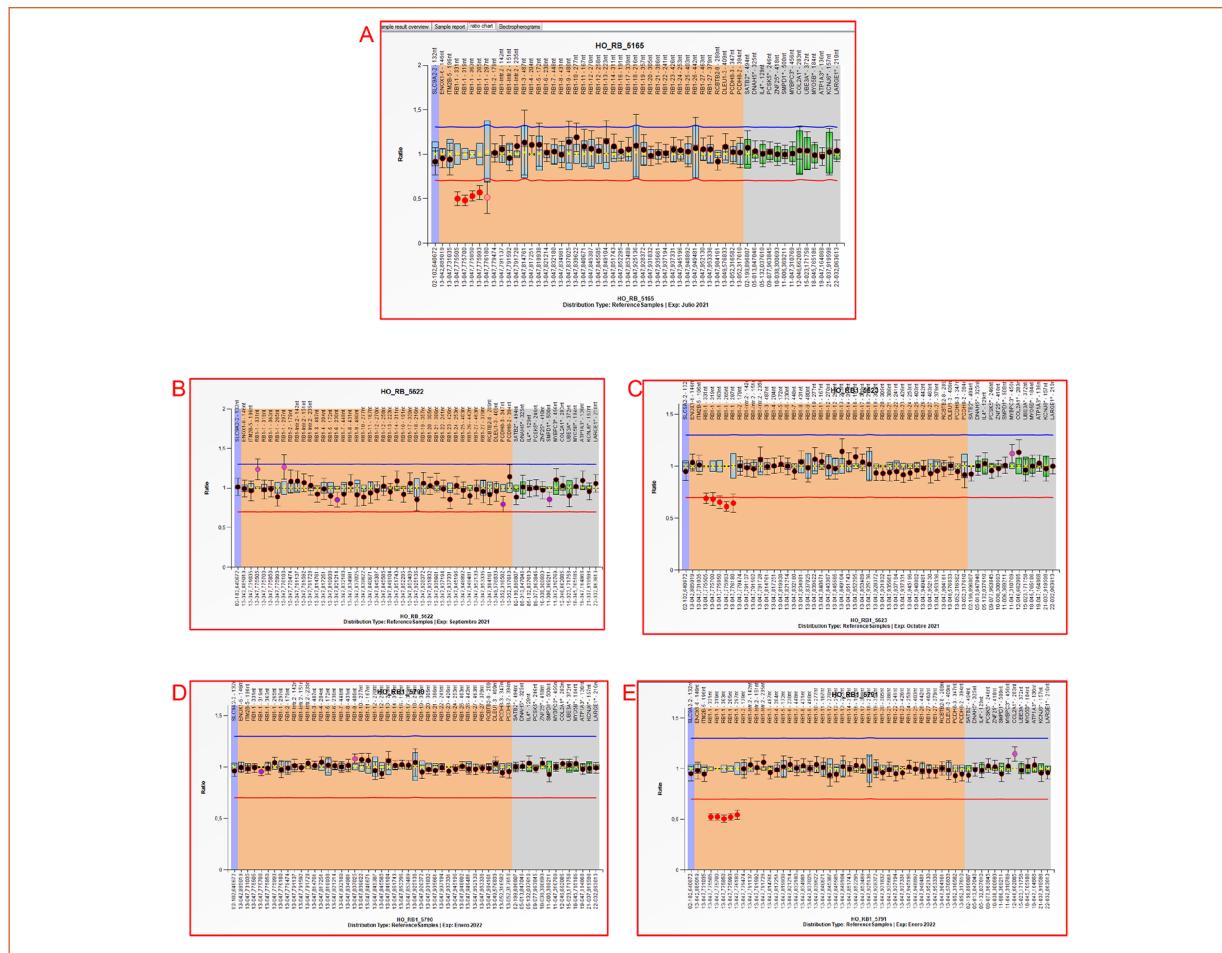


Figura 2 | Distribución del tipo variante puntual (N: 22)**Figura 3** | Distribución de variantes puntuales en el gen *RB1*

Puntos rojos: exones con mayor frecuencia de variantes detectadas

Figura 4 | Estudio familiar paciente con delección del exón 1. A: Caso índice: delección del exón 1. B: Padre: estudio de CNV normal. C: Madre: delección del exón 1. D: Abuela rama materna: estudio de CNV normal. E: Hermana: delección del exón 1



CNV: variantes en el número de copias

Resultado familiar de variantes en el número de copia del paciente 5165

los miembros disponibles de cada familia. De este análisis se pudo conocer que, en el grupo de pacientes con retinoblastoma bilateral, 8 fueron variantes puntuales de novo y 3 habían heredado la alteración de alguno de sus progenitores. En 11 pacientes no fue posible realizar el estudio de segregación por no contar con muestras disponibles.

De las delecciones heterocigotas del gen completo, se pudo observar que una de ellas fue heredada y la otra de novo. Por otro lado, pudo ser confirmado que las delecciones parciales de los exones 1, 16 y la de los exones 22-23 fueron heredadas, mientras que la delección del exón 8 resultó ser una alteración de novo.

En el estudio familiar del paciente identificado como UPN: 5165 que presentó una delección

del exón 1, se pudo corroborar la presencia de la misma alteración en su madre (30 años) y una hermana (4 años), ambas sin diagnóstico de retinoblastoma al día del estudio. Además, se pudo estudiar al padre y a la abuela por rama materna quienes no presentaron la alteración descripta (Fig.4).

Respecto a la familia del paciente UPN: 4486, que presentó delección del exón 16, se observó la misma alteración en un hermano y en su madre, ambos pacientes con retinoblastoma bilateral. En la genealogía se destaca también una tía por rama materna de 29 años con antecedente de retinoblastoma bilateral (sin descendencia al momento de la consulta).

En la madre del paciente identificado como UPN: 4644, diagnosticada en su infancia de re-

tinoblastoma bilateral, resultó portadora de la misma delección en los exones 22 y 23 que su hijo.

En el paciente UPN: 5486, quien portaba delección del exón 8, no se evidenció la alteración en el número de copias en sus padres.

Con respecto al estudio familiar en los pacientes con alteraciones puntuales, se confirmó que el único paciente con retinoblastoma unilateral que presentó una variante puntual, la había heredado del padre quien hasta el momento no tenía diagnóstico de retinoblastoma. Además, fue posible estudiar a dos primas de este niño, ambas con diagnóstico de retinoblastoma bilateral que presentaron las mismas variantes heredadas por rama paterna. Este hallazgo fue considerado como un haplotipo que segregó en la familia tanto en múltiples integrantes afectados con expresión variable como en familiares sanos.

En el paciente identificado como UPN:4274, quien presentó retinoblastoma bilateral, se evidenció la misma variante en su madre, que tenía diagnóstico de retinoblastoma unilateral; y en el paciente UPN:5348 se demostró que heredó la variante de su padre, quien tenía diagnóstico de retinoblastoma bilateral. La paciente identificada como UPN:4253 presentó una variante del tipo cambio de sentido que se evidenció también en su madre, quien no tiene fenotipo de retinoblastoma.

Discusión

El presente trabajo describe la distribución y el tipo de variantes génicas evidenciadas en el gen RB1 de 60 pacientes con diagnóstico de retinoblastoma que consultaron al Hospital de Pediatría Garrahan para asesoramiento genético familiar.

En el grupo de pacientes con retinoblastoma bilateral se evidenciaron variantes germinales en un alto porcentaje de los casos (88%), mientras que, en el grupo de unilaterales, solo el 7% presentó alteraciones en el gen. Este hallazgo concuerda con lo esperado, ya que la literatura postula que aproximadamente el 90% de los pacientes con retinoblastoma bilateral presenta variantes germinales y solo lo presentan entre un 10-25% de los niños con retinoblastoma unilateral^{3,4}.

Dentro del grupo de variantes puntuales, se evidenció un predominio de variantes del tipo cambio de sentido/sin sentido seguido de alteraciones de tipo *frameshift* y de *splicing*, lo cual coincide con los datos reportados en la literatura tanto de nuestro país^{7,8} como en otros grupos internacionales⁹⁻¹¹.

Cabe destacar que 3 de las 4 variantes de *splicing* observadas afectaron el exón 12. Particularmente, la variante c.1215+1G>A que se encontró en 2 de estos pacientes, se encuentra registrada en alta frecuencia en la base de datos Leiden Open Variation data base (LOVD) tanto en pacientes con retinoblastoma unilateral como bilateral¹². Ambos resultados, llevan a pensar que el exón 12 podría ser una región muy susceptible a este tipo de variantes, ya que diversas alteraciones de *splicing* en este mismo sitio han sido descriptas en LOVD.

Si bien en la mayoría de las publicaciones donde se describen variantes en el gen RB1 destacan el hecho de que no existe una región hotspot, en este trabajo se puede observar una tendencia hacia una región más Enriquecida en variantes, comprendida entre los exones 12 y 20. Esto concuerda con lo publicado por grupos reconocidos en el área, los cuales describen que el 65% de sus variantes se localizan entre los exones 12 y 23, sitio que codifica para una región pocket necesaria para la regulación transcripcional de la proteína^{3,7}. Además, estos autores reportan que el 31% de las variantes se sitúa entre los exones 12-18 correspondientes al dominio A y el 35% afecta a los exones 19-23 del dominio B^{4,6}.

Respecto a los estudios de segregación familiar de las variantes observadas, fue posible identificar a los familiares que requirieron asesoramiento genético por presentar la misma variante que el caso índice. De acuerdo a los resultados observados en estos casos, se evidencia que esta enfermedad puede presentar penetrancia incompleta con expresividad variable, dado que hay individuos en una misma familia, con la misma variante sin manifestación clínica y casos con retinoblastoma bilateral y unilateral¹³⁻¹⁵. Por otro lado, en los casos que no pudo realizarse el estudio de segregación familiar fue debido a la falta de acceso al material de los progenitores. Resulta fundamental poder disponer de dicho material para completar el correcto

asesoramiento familiar. Una sugerencia a tener en cuenta sería la posibilidad de hacer hincapié en la importancia de estudiar a la familia en el momento de la firma del consentimiento informado, o bien directamente obtener muestra biológica de los padres en el mismo momento que se recepciona la de los pacientes y guardarla en un biobanco para su uso en caso de necesidad.

Si bien en los pacientes con retinoblastoma unilateral la frecuencia de detección de variantes germinales es baja, resulta fundamental su estudio. El riesgo de recurrencia familiar de casos unilaterales varía del 6% (lesiones unifocales) al 50% (lesiones multifocales); ante la dificultad para establecer la focalidad de la lesión en muchos casos, el estudio genético es primordial para poder asesorar correctamente al paciente y su familia. Por otro lado, la identificación de una variante germinal provee las herramientas necesarias para poder estudiar tanto a los progenitores como a otros familiares en riesgo. Sin embargo, se trata de un enfoque que requiere un esfuerzo considerable y un extenso tiempo para su realización.

En cuanto a la metodología utilizada en el presente trabajo para la detección de variantes puntuales, se trata de una técnica robusta y accesible para todo laboratorio de biología molecular que cuente con un equipo de secuenciación capilar. Sin embargo, es un método muy laborioso que requiere de un tiempo considerable para su realización. Además, al tratarse de un trabajo artesanal resulta ser muy costoso comparado con métodos de nueva generación. La tecnología de Next Generation Sequencing (NGS) resulta una

excelente alternativa porque permite obtener una gran cantidad de información en tiempos relativamente cortos. Adicionalmente, debido a la mayor sensibilidad de esta técnica, se podría llegar a identificar variantes germinales en un mayor número de pacientes, así como detectar variantes en mosaico¹⁶⁻¹⁸. Es por esto que a partir de la adquisición de equipamiento para NGS, en el Hospital de Pediatría Garrahan se ha decidido migrar la metodología utilizada para la caracterización de los pacientes hacia la tecnología de NGS esperando lograr optimizar los resultados del laboratorio y, en consecuencia, mejorar el alcance del asesoramiento familiar en un gran porcentaje de familias con retinoblastoma del país.

En este estudio, se lograron identificar y describir las variantes moleculares en el gen RB1 en una serie de pacientes diagnosticados con retinoblastoma en un hospital público pediátrico de Argentina. En varios casos también fue posible analizar la segregación de las variantes en los progenitores. Todos los hallazgos fueron fundamentales para brindar el adecuado asesoramiento genético a las familias.

Agradecimientos: Agradecemos especialmente al Dr. Walter Cacciavillano por su colaboración para la realización de la presente publicación. Se extiende, además, el agradecimiento a los pacientes y a sus familiares que han participado en este estudio, a los médicos de otras instituciones quienes derivan pacientes a nuestra Institución y a todos los profesionales y técnicos del Hospital Garrahan que trabajan en los estudios y atención de estos pacientes.

Conflictos de intereses: Ninguno para declarar

Bibliografía

1. Moreno, Florencia. Registro oncopediátrico hospitalario argentino / Florencia Moreno; María Agustina Chaplin. - 7a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Instituto Nacional del Cáncer, 2021. En: <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/bancos/2022-07/07-22-Registro-oncopedi%C3%A1trico-argentino.pdf>; consultado mayo 2025.
2. Lohmann DR, Gallie BL. Retinoblastoma. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., eds., 2000. GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, p 1993-2025.
3. Nguyen HH, Nguyen HTT, Vu NP, et al. Mutational screening of germline RB1 gene in Vietnamese patients with retinoblastoma reveals three novel mutations. *Mol Vis* 2018; 24:231-8.
4. Xiaolian F, Jun C, Yizhuo W, et al. RB1 germline mutation spectrum and clinical features in patients with unilateral retinoblastomas. *Ophthalmic Genetics* 2021; 42:593-9.
5. Gomez-Mariano G, Hernandez-SanMiguel E, Fernandez-Prieto, et al. Mosaicism and intronic variants in RB1 gene revealed by next generation sequencing in a cohort of Spanish retinoblastoma patients. *Exp Eye Res* 2025; 251:110233.

6. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat* 2016; 37:564-9.
7. Parma D, Ferrer M, Luce L, Giliberto F, Szijan I. *RB1* gene mutations in Argentine retinoblastoma patients. Implications for genetic counseling. *PLoS One* 2017; 12:e0189736.
8. Ottaviani D, Parma D, Giliberto F, et al. Spectrum of *RB1* mutations in argentine patients: 20-years' experience in the molecular diagnosis of retinoblastoma. *Ophthalmic Genet* 2013; 34:189-98.
9. Lan X, Xu W, Tang X, et al. Spectrum of *RB1* germline mutations and clinical features in unrelated Chinese patients with retinoblastoma. *Front Genet* 2020; 11:142.
10. Tomar S, Sethi R, Sundar G, Quah TC, Quah BL, Lai PS. Mutation spectrum of *RB1* mutations in retinoblastoma cases from Singapore with implications for genetic management and counselling. *PLoS One* 2017; 12:e0178776.
11. Kalsoom S, Wasim M, Afzal S, et al. Alterations in the *RB1* gene in Pakistani patients with retinoblastoma using direct sequencing analysis. *Mol Vis* 2015; 21:1085-92.
12. Dommering CJ, Mol BM, Moll AC, et al. *RB1* mutation spectrum in a comprehensive nationwide cohort of retinoblastoma patients. *J Med Genet* 2014; 51:366-74.
13. Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, et al. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat* 2011; 32:557-63.
14. Luong H, Abruzzo T, Ramasubramanian A. Low penetrance retinoblastoma. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2024; 61:152.
15. Harbour JW. Molecular basis of low-penetrance retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2001; 119:1699-704.
16. Zou Y, Li J, Hua P, Liang T, Ji X, Zhao P. Spectrum of germline mutations in *RB1* in Chinese patients with retinoblastoma: Application of targeted next-generation sequencing. *Mol Vis* 2021; 27:1-16.
17. Rushlow D, Piovesan B, Zhang K, et al. Detection of mosaic *RB1* mutations in families with retinoblastoma. *Hum Mutat* 2009; 30:842-51.
18. Amitrano S, Marozza A, Somma S, et al. Next generation sequencing in sporadic retinoblastoma patients reveals somatic mosaicism. *Eur J Hum Genet* 2015; 23:1523-30.