



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SIENA
Scuola di Specializzazione in Genetica Medica
Direttore: Prof.ssa A. Renieri

**“DIFFERENZE MORFOLOGICHE,
IMMUNOISTOCHIMICHE E GENETICHE
TRA RETINOMA E RETINOBLASTOMA”**

Relatore: Prof.ssa A. Renieri

**Tesi di Specializzazione della:
Dr.ssa Epistolato Maria Carmela**

Anno Accademico 2006-2007

INDICE	
INTRODUZIONE	Pag. 2
Il retinoblastoma (RBT)	“ 2
Genetica del retinoblastoma	“ 3
pRb1/p105 e proteine correlate	“ 5
Clinica	“ 9
<i>Segni di presentazione</i>	“ 9
<i>Classificazione clinica</i>	“ 9
Anatomia patologica	“ 11
<i>Caratteri macroscopici</i>	“ 11
<i>Caratteri istologici</i>	“ 13
<i>Estensione extraoculare e metastasi</i>	“ 14
<i>Vie di disseminazione</i>	“ 16
<i>Fattori di rischio per malattia metastatica</i>	“ 16
Secondi tumori non oculari	“ 17
Il retinoma (RN)	“ 19
Retinoma e retinoblastoma	“ 20
MATERIALI E METODI	“ 23
Analisi istologica e immunoistochimica	“ 23
Laser capture ed estrazione del DNA	“ 23
Amplificazione del DNA	“ 24
RealTime-PCR semiquantitativa	“ 25
RISULTATI	“ 26
Descrizione clinica	“ 26
Esame istologico	“ 27
Immunoistochimica	“ 27
Analisi molecolare	“ 28
DISCUSSIONE	“ 30
BIBLIOGRAFIA	“ 38

INTRODUZIONE

Il retinoblastoma (RBT)

Il retinoblastoma è un tumore maligno che origina dalla retina immatura, ed è il risultato di una doppia mutazione oncogenica (Teoria del doppio colpo di Knudson)(1). Le mutazioni si possono verificare nel tempo che intercorre tra il terzo mese di gravidanza e il quarto anno di vita; questo infatti rappresenta il periodo finestra della comparsa, proliferazione e maturazione dei retinoblasti. La cellula di origine della neoplasia è molto probabilmente una cellula precursore dei neurorecettori (coni e bastoncelli) oppure un retinoblasto multipotente (2). La malattia perciò può presentarsi in un periodo compreso tra la vita del feto in utero e i quattro anni. L'età media di diagnosi è 7 mesi per i casi bilaterali e 24 mesi per quelli unilaterali (2).

Il retinoblastoma è un tumore maligno intraoculare dell'età pediatrica, con una incidenza di circa 1/20.000 nati vivi (3). L'incidenza è alta nei primi due anni di vita (4), dopo diminuisce e il tumore è diagnosticato solo in casi eccezionali dopo i 10 anni (5). L'incidenza annua del retinoblastoma varia tra i 7 per milione di abitanti della popolazione Africana, dove rappresenta il 10-15% delle neoplasie infantili, ai 3-6 per milione in Europa e USA, dove il retinoblastoma è responsabile del 2-4% dei tumori infantili, e si abbassa a 3 per milione nelle popolazioni asiatiche (6). Il suo sviluppo non ha predilezione di sesso o razza, nè è legato alla presenza di particolari fattori ambientali o socioeconomici (2). Secondo alcuni autori un fattore che potrebbe giocare un ruolo importante nello sviluppo di questo tumore è rappresentato dall'età dei due genitori, in particolare quella paterna (7,8). Pur essendo una malattia relativamente rara, il retinoblastoma rappresenta l'80% di tutti i tumori oculari primari nei bambini al di sotto dei 15 anni (9), l'1% di tutti i tumori mortali (10) ed il secondo fra i tumori oculari in tutte le età (11). E' un'affezione esclusivamente dell'infanzia, ma in casi eccezionali è stato diagnosticato sia nel feto (12) sia in giovani adulti (13), dove la diagnosi giunge tardiva, nonostante i chiari segni d'allarme (2).

Il retinoblastoma rappresenta un modello di cancro ereditario (14,15) in cui mutazioni di entrambi gli alleli del gene *RBI* (teoria del doppio colpo di Knudson)(1), primo gene oncosoppressore ad essere stato identificato, portano alla trasformazione neoplastica. La scoperta di *RB* ha condotto alla scoperta di tutta una nuova classe di geni oncosoppressori, responsabili di altri tumori solidi nei bambini.

Il tumore pur essendo estremamente maligno è curabile e in alcuni casi mostra addirittura una regressione spontanea (14). Comunque nella forma ereditaria rimane il rischio di sviluppare altre neoplasie maligne non oculari (secondo tumore), che spesso risulta molto più letale del retinoblastoma stesso (16). La predisposizione alla trasformazione maligna può portare allo sviluppo di un tumore neuroblastico intracranico primario, in particolare di un pinealoblastoma, il cosiddetto retinoblastoma trilaterale (2).

Genetica del retinoblastoma

La trasformazione neoplastica degli elementi precursori della retina è correlata alla mutazione di entrambi gli alleli del gene *RBI* (1). Il gene, localizzato sul cromosoma 13q1.4, sintetizza per una fosfoproteina, pRb1/p105, di 110kD. Essa regola il ciclo cellulare e secondo questa teoria (1), per trasformare una cellula retinica normale in neoplastica, è necessario e sufficiente che ambedue i geni omologhi codificanti per la proteina siano alterati (1). Infatti, le mutazioni del gene *RBI* responsabili dell'inattivazione dei due alleli sono eventi cruciali nello sviluppo del tumore: una prima mutazione (M1) predispone a questa condizione, e la seconda mutazione (M2) è richiesta per sviluppare il tumore stesso (1) (Fig 1a).

Il retinoblastoma è un tumore ereditario nel 40% dei casi e sporadico nel 60% dei casi (17). L'intera casistica viene anche suddivisa in tumori bilaterali e/o multifocali nel 30% dei casi e in tumori monolaterali nel 70% dei casi (17). I casi di RBT sporadici presentano sempre tumori monolaterali, ma non tutti i tumori monolaterali (70% dei casi) sono sporadici in quanto esiste una quota di circa il 10-15%, che rappresenta i tumori monolaterali ereditari (17).

Non esistono sostanziali differenze tra maschi e femmine (18) e l'età media di diagnosi è approssimativamente attorno ai 13 mesi di vita.

Nei casi ereditari, i pazienti presentano una mutazione germinale, inattivante un allele di *RBI* in tutte le cellule dell'organismo e una perdita somatica del secondo allele di *RBI* nelle cellule retiniche. Le mutazioni germinali di *RBI* con un'alta penetranza (>90%) riguardano tutti i pazienti con RBT bilaterale, come pure il 15% dei pazienti con forme monolaterali ereditarie. Nei casi sporadici, entrambi gli alleli di *RBI* sono

inattivati somaticamente nella singola cellula retinica progenitrice. In questi casi, il RBT è sempre unilaterale e monofocale (19).

Nei casi sporadici di retinoblastoma, si presentano due eventi mutazionali nelle cellule somatiche dell'occhio, e nessuno di questi eventi è presente nel DNA delle cellule dello zigote (20-22).

Circa il 15% dei pazienti affetti monolateralmente hanno una mutazione germinale di *RBI*, che rappresenta un rischio di ricorrenza del 45% per la prole (23). Nelle forme familiari e bilaterali di RBT, il primo evento mutazionale (M1) è una mutazione germinale, trasmessa come tratto autosomico dominante ad alta penetranza (circa del 90%) da un genitore affetto, oppure acquisito durante la gametogenesi(1,24). L'inattivazione del secondo allele di *RBI* è un'alterazione somatica (M2), e risulta in tumori multipli e spesso bilaterali.

Fin dal 1986, quando Friend et al. (25) hanno clonato il gene *RBI*, numerosi studi mutazionali hanno dimostrato un ampio spettro di alterazioni genetiche presenti nel RBT (21,26-30). Le sostituzioni a singola base sono gli eventi M1 più frequenti, in circa il 40% delle mutazioni confermate, seguite da piccole e grandi delezioni (20,21,26). Il secondo evento M2 o "colpo" può essere associato ad una perdita di eterozigosità (LOH), da ipermetilazione del promotore del gene, o da una seconda sostituzione a singola base indipendente dalla prima. La maggior parte degli eventi M2 riguardano la perdita di eterozigosità (LOH), presente nel 60% dei tumori (31-33), originati da una ricombinazione mitotica, da una non-disgiunzione cromosomica, o da piccole delezioni del braccio lungo del cromosoma 13 (32).

Richter et al. hanno dimostrato che la metilazione del promotore di *RBI* silenzia l'espressione del gene nell'8% degli alleli *RBI* (30). Questo evento è comunemente osservato nei retinoblastomi insieme alla perdita di eterozigosità (LOH), così che se l'evento mutazionale M1 è una metilazione del promotore di *RBI*, l'evento M2 sarà una LOH (30,34). La metilazione del promotore di *RBI* risulta essere un evento molto più comune nei retinoblastomi sporadici che in quelli ereditari (30).

Secondo il modello dei "due colpi" di Knudson (1), finora usato per spiegare lo sviluppo del retinoblastoma, sono necessarie e sufficienti alterazioni di ambedue i geni omologhi codificanti per la proteina pRb1. Negli ultimi anni, però, molti studi (35,36) hanno evidenziato come la perdita di funzione di pRb1 nelle cellule retiniche non sia

sufficiente a sviluppare la forma maligna del tumore. Per esempio, è stata osservata l'espressione mutata del gene *RBI* nella neoplasia benigna "retinoma", definito come precursore del retinoblastoma (35). Inoltre, queste masse retiniche benigne, ben distinte, potrebbero non trasformarsi in RBT durante tutta la vita del paziente, anche se risultano essere suscettibili alla trasformazione maligna (36). I retinomi, infatti, sono patologie oculari comuni, che non sono riconosciute in fase iniziale ma solo quando si è sviluppato un retinoblastoma (37). Quasi tutti i RBT mostrano una instabilità genomica, non solo nel locus del gene *RBI* sul cromosoma 13, ma anche in altre regioni cromosomiche importanti (38,39). Uno specifico riarrangiamento cromosomico, osservato in circa il 60% dei retinoblastomi attraverso studi di citogenetica, è l'isocromosoma del 6p, i(6p) (40).

Negli ultimi anni, sono stati svolti numerosi studi su casi di RBT utilizzando tecniche convenzionali o di arrayCGH, Ibridazione genomica comparativa, oppure PCR quantitative (qPCR) per definire le "copy number variation" (CNV), cioè le alterazioni del numero delle copie dei geni all'interno del genoma in esame. In particolare, sono state osservate delle perdite (loss) o delle acquisizioni (gain) di geni nelle regioni cromosomiche 1q32, 2p24, 6p22 e 16q22 (41-47). La caratterizzazione di questi riarrangiamenti ha permesso di identificare oncogeni candidati e oncosoppressori: *MDM4* e *KIF14* all'1q32, *MYCN* e *DDX1* al 2p24, *E2F3* e *DEK* al 6p22, *CDH11* e *RBL2* al 16q (41). Proprio sulla base delle frequenze di queste ricorrenti alterazioni genomiche, è stato proposto un nuovo modello di progressione del retinoblastoma, definito come multistep (41). In questo modello, la perdita di entrambi gli alleli di *RBI* (M1-M2) non è sufficiente a dare il via allo sviluppo del tumore (Fig 1b). Le alterazioni successive più frequenti (M3-M4) sono state trovate nelle regioni cromosomiche 1q32 e 6p22, ma altri due eventi molecolari M3 ed M4 possono essere necessari per la trasformazione neoplastica. Perdite nella regione 16q22 e gain/amplificazioni nella regione 2p24 sono meno frequenti, ma nel modello multistep sono state riportate ulteriori eventi molecolari, come M5, responsabili della progressione del tumore (41).

pRb1/p105 e proteine correlate

Il controllo del ciclo cellulare è un processo fondamentale che governa la proliferazione cellulare, e la proteina oncosoppressore pRb1 è un componente cruciale della macchina che regola il ciclo cellulare. La perdita o l'inattivazione di pRb1 è il

meccanismo principale da cui le cellule del cancro traggono un vantaggio nella crescita durante la tumorigenesi. Vari studi hanno dimostrato i molteplici ruoli di *RB1* nel controllo del ciclo e nella proliferazione cellulare (48-50), ma anche nella differenziazione cellulare e nel processo di apoptosi (51,52).

I membri della famiglia del retinoblastoma, pRb/p105, pRb2/p130 e p107, sono proteine strutturalmente e biochimicamente simili ed hanno funzioni simili. Entrambi i geni Rb/p105 e Rb2/p130 mappano su due aree dei cromosomi umani, rispettivamente 13q14 e 16q12.2 (53-55), in cui delezioni o mutazioni eterozigoti costituzionali sono state riscontrate in neoplasie maligne (56-59). Il gene p107 mappa su una regione cromosomica (20q11.2) raramente trovata alterata (60); di per sè, p107 non è considerato un gene oncosoppressore, sebbene mostri proprietà di soppressione della crescita quando sovraespresso in linee cellulari umane (61,62).

Le proteine della famiglia RB sono costituite da due domini essenziali per le interazioni proteina-proteina e per le funzioni di soppressori della crescita cellulare: questi domini sono le regioni pocket e la regione C-terminale (Fig 2a).

Le proteine RB presentano grandi regioni di omologia, specialmente nella regione pocket, che è costituita strutturalmente da due domini funzionali conservati (A e B) separati da uno spacer (J), che invece differisce nelle tre proteine RB. In questa regione, pRb2/p130 e p107 sono strettamente correlate tra loro (circa il 50% di identità amminoacidica) rispetto a pRb/p105 (30-35% di identità). La regione pocket conservata è responsabile di molte delle interazioni proteina-proteina e caratterizza l'attività funzionale di queste proteine nell'omeostasi del ciclo cellulare (49,63-65). Un certo numero di proteine bersaglio è stato visto interagire con i domini pocket A e B, inclusi i membri della famiglia dei fattori trascrizionali E2F, proteine cellulari fisiologicamente importanti che legano RB (66-68), così come proteine che presentano il motivo peptidico LXCXE, come le cicline tipo-D (60) e le istondeacetilasi (HDACs) (69-71). Il dominio pocket di pRb/p105 è stato trovato mutato o deletato in un gran numero di tumori (50,56,57,72).

La regione C-terminale differisce in lunghezza tra pRb/p105 e gli altri due membri della famiglia (p107, pRb2/p130). Questa regione è funzionalmente importante poichè contiene il segnale di localizzazione nucleare (NLS) e i domini responsabili per il legame delle istondeacetilasi1 (HDAC1) e dei complessi ciclina/cdks. Il trasporto

delle proteine RB nel nucleo interfase avviene sotto il controllo del segnale NLS costituito da due cluster di residui separati da una catena di amminoacidi che solitamente includono residui di prolina (73). La sostituzione di due amminoacidi nei siti NLS delle proteine RB, o la delezione dell'intero segnale NLS, determina uno spostamento della loro localizzazione dal nucleo al citoplasma, danneggiando fortemente la loro funzione nella regolazione del ciclo cellulare (58,74,75).

Le istone deacetilasi (HDACs) sono associate all'inibizione trascrizionale e formano complessi co-repressori (76). Esse comprendono una famiglia di sette proteine di cui la HDAC1 è il partner di legame funzionale di pRb/p105 e pRb2/p130 (70,71). Nelle cellule di mammifero, E2F, pRb/p105, pRb2/p130 e HDAC1 vanno a formare un complesso in quanto i siti di legame per E2F e HDAC1 sono distinti l'uno dall'altro (65,77). Questo dato suggerisce che le proteine RB funzionano da ponte fisico che lega l'attività di HDAC1 a E2F e, l'associazione di queste ultime ai promotori E2F-sensibili. La iporegolazione dei geni del ciclo cellulare E2F-dipendenti dovuta ai complessi pRb/p105- e pRb2/p130-HDAC1 è fondamentale per il mantenimento di un fenotipo quiescente. L'interazione tra HDAC1 e le proteine RB può rappresentare un legame tra l'architettura cromatinica e il controllo del ciclo cellulare ed essere, così, un punto di inizio per i processi oncogenici.

Lo stato di fosforilazione di ogni membro della famiglia del retinoblastoma è fondamentale per la sua regolazione funzionale ed è orchestrata dal legame con specifici complessi ciclina/cdk al dominio C-terminale delle proteine RB (63,78-80).

La progressione del ciclo cellulare è controllata da una precisa sequenza di eventi, che determina la decisione per la cellula di continuare la proliferazione o uscire dal ciclo e rientrare nello stato quiescente. Il prodotto del gene retinoblastoma (pRb/p105) e le proteine ad esso strettamente correlate (pRb2/p130 e p107) sono bersagli critici per cicline e CDK, e la loro sequenziale fosforilazione è richiesta per la progressione della cellula dalla fase G1 alla fase S (81). Le proteine RB non fosforilate sono regolatori negativi del ciclo cellulare, in quanto bloccano le cellule durante la fase G1 mediante la repressione della trascrizione dei geni richiesti per l'avanzamento G1/S. Quando le cellule passano attraverso le fasi G1/S, le proteine RB diventano sequenzialmente fosforilate e perdono la loro funzione di soppressione della crescita (48,82). L'iperfosforilazione della pRb1 permette alle cellule di entrare nella fase S e

procedere con la divisione cellulare o passare alla morte cellulare (Fig 2b). E' stato dimostrato che l'espressione di pRb2/p130 correla con un aumento di apoptosi nel retinoblastoma umano, ma non sappiamo attraverso quale meccanismo (83).

I maggiori bersagli delle proteine RB sono la famiglia dei fattori trascrizionali E2F (68,84), che hanno siti di legame nei promotori dei geni del ciclo cellulare importanti per la progressione delle cellule dalla fase G1 alla S. Una diminuzione nell'attività degli E2F avviene durante l'arresto del ciclo cellulare e il differenziamento.

Le proteine RB sono soppressori della crescita in modo cellula-specifico, e l'alterazione dei circuiti regolatori della crescita dovuta ad alterazione funzionale dei geni oncosoppressori *RB* è cruciale per la trasformazione neoplastica (60,62,85-87). In colture primarie di cellule T umane o di fibroblasti di topo, il mantenimento della quiescenza è dovuto a pRb2/p130, che sopprime efficientemente l'attività trascrizionale mediata da E2F4. Il fattore di trascrizione E2F1, che è regolato da pRb/p105, non è evidenziato in estratti di linfociti T in fase G0 (88). D'altra parte, in topi mancanti di pRb2/p130, i linfociti T pRb2/p130 $-/-$ proliferano normalmente in coltura e mostrano *in vivo* normali funzioni immuno cellulo-mediate. Questi linfociti esprimono un elevato livello di p107, che lega con efficacia il fattore trascrizionale E2F4. Interessante notare che E2F4, in linfociti T pRb2/p130 $-/-$ e p107 $-/-$, forma un complesso con pRb/p105, suggerendo così una compensazione funzionale tra le proteine RB nel mantenere uno stato di quiescenza (89).

Utilizzando modelli murini, è stato dimostrato che la mutazione eterozigote di pRb/p105 (pRb $+/-$) non è sufficiente a sviluppare il retinoblastoma, mentre topi portatori di mutazioni pRb $+/-$ e p107 $-/-$ sviluppano una displasia retinica, indicando che p107 è capace di prevenire questo tipo di tumore in topi pRb $+/-$ e perciò agisce come un oncosoppressore (90).

Il processo multi-step della carcinogenesi implica l'acquisizione progressiva di mutazioni e anomalie epigenetiche nell'espressione di geni multipli che svolgono funzioni molto diverse, ma hanno in comune lo stesso obiettivo finale: il controllo della crescita e della divisione cellulare. Le proteine della famiglia RB sono i regolatori chiave del ciclo cellulare e sono funzionalmente inattivati dalla fosforilazione, come pure da mutazioni, metilazioni. Ne deriva che qualsiasi irregolarità a monte, che porti ad

una inappropriata fosforilazione delle proteine RB, potrebbe avere gli stessi effetti funzionali come le mutazioni inducendo la trasformazione maligna.

Clinica

Segni di presentazione

La leucocoria è il più comune segno clinico nei pazienti affetti da retinoblastoma, ed è osservata in circa il 60% dei casi. La leucocoria è un riflesso bianco che si nota all'interno della pupilla degli occhi affetti da retinoblastoma. Questo classico segno viene molto spesso notato dai genitori dei piccoli pazienti nelle immagini fotografiche. È un segno tardivo anche se ha un tasso di sopravvivenza alto, circa dell'88% a 5 anni, ma il tasso si abbassa per quanto riguarda la conservazione del globo oculare (91). La leucocoria non è un segno specifico per il retinoblastoma: si pone in diagnosi differenziale con altre patologie oculari come ad esempio la malattia di Coats oppure la persistenza di vitreo primario (13).

In ordine di frequenza, il secondo segno clinico è lo strabismo (20% dei casi), segno precoce che è il risultato del coinvolgimento maculare. In questo caso vi è un alto tasso di sopravvivenza con buone possibilità di salvare anche il globo oculare (91). Nel rimanente 20% dei casi si hanno segni atipici, spesso di origine infiammatoria, che risultano essere tardivi, comportando una prognosi peggiore sia per la sopravvivenza che per il salvataggio dell'occhio (92,93). L'emorragia vitreale, il microftalmo e la cellulite orbitaria sono, invece, segni di presentazione molto rari nel retinoblastoma (94).

Classificazione clinica

La classificazione di Reese-Ellsworth, sviluppata nel 1963, rimane il sistema di classificazione clinica universalmente riconosciuto e più usato in tutto il mondo (95). Sebbene quella vecchia sia ovviamente superata, nessuno dei molti sistemi di classificazione proposti in questi ultimi anni ha trovato il consenso e l'approvazione della comunità medica mondiale. La classificazione Reese-Ellsworth si basa sullo sviluppo intraoculare del tumore e sulla speranza di salvare il globo oculare, dopo irradiazione esterna, mentre la sopravvivenza del paziente non viene presa in considerazione. Il fallimento della radioterapia esterna nel trattamento dei tumori più periferici e la difficoltà nel trattamento del seeding vitreale a quell'epoca, resero questi

due elementi determinanti per la stadiazione della gravità di malattia. Recentemente è stata proposta una nuova classificazione, ABC classification (International Intraocular Retinoblastoma Classification), molto usata in questo momento e di grande valore prognostico (96).

Questa classificazione suddivide i tumori intraoculari in base alla loro prognosi dopo first-line chemioterapia e terapia focale adiuvante, effettuata con trattamenti di Argon laser e Crioterapia. E' composta da cinque gruppi diversi (A, B, C, D, E), in ordine decrescente di prognosi favorevole, prendendo in considerazione la grandezza del tumore, la sua vicinanza alla macula e al nervo ottico, il livello di disseminazione, la presenza o meno di un distacco di retina e in ultimo le complicanze tardive.

CLASSIFICAZIONE PROGNOSTICA DI REESE-ELLSWORTH, 1963

GRUPPO I Molto favorevole

- a) Tumore unico, di diametro $< 4dp$, posto all'equatore del bulbo o dietro.
- b) Tumori multipli, di diametro $< 4 dp$, posti all'equatore del bulbo o dietro.

GRUPPO II Favorevole

- a) Tumore unico, di diametro tra 4-10 dp, posto all'equatore del bulbo o dietro.
- b) Tumori multipli, di diametro 4-10 dp, posti all'equatore del bulbo o dietro.

GRUPPO III Dubbia

- a) Ogni tumore anteriore all'equatore.
- b) Tumore unico, di diametro $>10 dp$, posto all'equatore del bulbo.

GRUPPO IV Sfavorevole

- a) Tumori multipli, qualcuno di diametro $> 10 dp$.
- b) Ogni tumore che si estende anteriormente all'ora serrata.

GRUPPO V Molto sfavorevole

- a) Tumori massivi invadenti che coinvolgono più della metà della retina.
- b) Disseminazione vitreale.

dp: diametro papillare che corrisponde a 1,5mm

CLASSIFICAZIONE DI LINN MURPHREE A, 2005

Gruppi da A-C: tumori a prognosi favorevole confinati alla retina

GRUPPO A: tumori piccoli < 3mm e a distanza di <2dp dal disco o dalla fovea e con seeding vitreale assente.

GRUPPO B: focolai senza seeding o solocon minimo seeding vitreale; assenza di distacco di retina a <5 mm da base della neoplasia

GRUPPO C: fine diffuso seeding vitreale; distacco retina maggiore del gruppo B o totale; diametro tumorale >15mm

Gruppi D-E: tumori a prognosi sfavorevole

GRUPPO D: massivo seeding vitreale o subretinico; Distacco retina maggiore del gruppo B o totale; tumore che occupa oltre il 50% della superficie retinica.

GRUPPO E: nessuna possibilità di visus residuo oppure presenza di uno o più dei seguenti quadri clinici:

- a) tumore in camera anteriore
- b) glaucoma secondario con neovascolarizzazione
- c) emorragia intravitrea
- d) occhio ftisico o preftisico
- e) ipoema o pseudoipopion con impronta sull'endotelio corneale
- f) pseudo-cellulite orbitaria
- g) tumore a livello della membrana jaloidea anteriore

dp: diametro papillare che corrisponde a 1,5mm

Anatomia patologica

Anche nel retinoblastoma staging e grading rappresentano un indice dell'aggressività del tumore e della gravità della malattia neoplastica. I dati morfologici più importanti sono fondamentali per impostare la terapia post-enucleazione e per formulare un giudizio prognostico (97-101). Tra questi le modalità di crescita, la differenziazione, l'invasione della coroide e della sclera, e del nervo ottico.

Caratteri macroscopici

Le caratteristiche macroscopiche del retinoblastoma intraoculare dipendono dal pattern di crescita del tumore. Sono stati individuati cinque diversi pattern di crescita: endofitico, esofitico, misto esofitico ed endofitico, diffusamente infiltrante e regressione

spontanea completa. Queste spiegano certe variazioni cliniche come pure differenze nelle modalità di estensione intraoculare ed extraoculare del tumore.

Retinoblastoma endofitico: cresce soprattutto nella superficie interna della retina nell'umor vitreo. Perciò, nell'esame oftalmoscopico, il tumore si vede direttamente. Poiché i tumori endofitici crescono molto e diventano friabili, le cellule tumorali sono sparse nel vitreo dove crescono divise in minuscole masse sferoidali che appaiono come palle di lanugine o di cotone (seeding vitreale). Le masse sferoidali di tumore possono mimare condizioni infiammatorie simili ad endoftalmiti micotiche o da nematodi. Le cellule tumorali nel vitreo si possono impiantare sulla superficie interna della retina ed invaderla. E' importante distinguere il retinoblastoma multicentrico dalla disseminazione retinica perché la presenza di tumori multipli indica la presenza di una mutazione germinale (retinoblastoma ereditario) anche nei casi monolaterali. Le cellule tumorali nel vitreo possono essere anche sparse nella camera posteriore e successivamente raggiungere la camera anteriore tramite il flusso dell'umor acqueo. Possono essere osservati depositi secondari nel cristallino, nell'epitelio del corpo ciliare, nell'iride, nell'endotelio corneale e nel trabecolato e le cellule tumorali possono seguire le vie di deflusso dell'umor acqueo fuori dall'occhio (102). In questi casi, i cambiamenti della camera anteriore possono essere male interpretati clinicamente come iridociclitiche granulomatose (103).

Retinoblastoma esofitico: cresce soprattutto dalla superficie esterna della retina verso la coroide, provoca dall'inizio un sollevamento e poi il distacco della retina. All'esame oftalmoscopico, il tumore viene visto attraverso la retina e i vasi retinici lo attraversano. Quando il tumore cresce abbastanza, può provocare il sollevamento fino al totale distacco della retina e le cellule tumorali possono invadere l'essudato sottoretinico. Si sviluppano quindi impianti secondari che possono invadere la retina ed eventualmente infiltrare la coroide attraverso la membrana di Bruch. L'invasione della coroide permette alle cellule tumorali di entrare in contatto con i vasi coroidei, che sono al di fuori della membrana emato-retinica, rendendo più agevole la disseminazione ematogena a distanza. L'infiltrazione della coroide a tutto spessore rende anche possibile l'infiltrazione della sclera e successivamente dell'orbita e della congiuntiva. Da qui, le cellule tumorali, possono avere accesso a vasi sanguigni e linfatici e dare metastasi ai linfonodi regionali.

Tumore misto endofitico-esofitico: è probabilmente più comune degli altri due tipi, specialmente tra i tumori di grandi dimensioni. Le caratteristiche di crescita di entrambi, endofitico ed esofitico combinate, caratterizzano questi tumori.

Retinoblastoma diffusamente infiltrante: è il meno comune e spesso presenta grande difficoltà nella diagnosi clinica (104-106). Questo tumore cresce diffusamente dentro la retina senza ispessirla. Le cellule tumorali sono rilasciate nel vitreo, spesso infiltrando la camera anteriore e provocando pseudoipopion. Poiché non si forma una massa, questo tipo di retinoblastoma può essere scambiato per retinite o endoftalmite da Toxocara. Con il coinvolgimento della camera anteriore può essere sospettata una irite iperacuta con ipopion, oppure uno xantogranuloma giovanile (106).

Regression spontanea completa: si pensa che sia tanto frequente nel retinoblastoma quanto nelle altre neoplasie maligne (35). Tipicamente è presente una severa reazione infiammatoria seguita da ftisi bulbare (107). Il meccanismo, o i meccanismi, attraverso il quale avviene la regressione è sconosciuto.

Caratteri istologici

Istologicamente, il retinoblastoma è un tumore maligno neuroblastico che può originare da ogni strato nucleato della retina. Le cellule predominanti hanno un grande nucleo basofilo, di dimensione e forma variabile e scarso citoplasma. Le figure mitotiche sono tipicamente numerose (108).

La formazione delle rosette di Flexner-Wintersteiner è altamente indicativa di retinoblastoma. Le sole altre neoplasie in cui sono state osservate queste rosette sono il pineoblastoma e il medulloepitelioma. Le rosette di Flexner-Winterstainer rappresentano una forma di differenziazione parziale del tumore, ma le cellule delle rosette sono cellule maligne. Caratteristicamente, le rosette di Flexner-Winterstainer si ritrovano con aree di cellule maligne indifferenziate con attività mitotica e le cellule che formano le rosette possono anche contenere figure mitotiche. Alcune rosette non sono completamente formate e le cellule si trovano mischiate alle circostanti cellule indifferenziate (108,109).

Le tipiche rosette di Flexner-Winterstainer sono formate da cellule cuboidali alte che circoscrivono un lume apicale dove si aggettano proiezioni citoplasmatiche. La microscopia elettronica ha dimostrato che queste proiezioni rappresentano il segmento

primitivo interno ed esterno e, perciò, queste cellule rappresentano un tentativo del tumore di formare cellule fotorecetrici (108).

Ts'o e coll. (108) hanno descritto diverse caratteristiche ultrastrutturali supplementari delle cellule che formano le rosette di Flexner-Winterstainer condivise con i recettori retinici: la zonula ocludens che forma la membrana limitante del lume è simile a quella che forma la membrana limitante esterna della retina, i microtubuli citoplasmatici, le cilia con pattern 9+0, e le strutture membranose lamellari sembrano i dischi dei segmenti esterni dei bastoncelli. Anche studi di immunoistochimica hanno supportato il concetto che il retinoblastoma insorge da cellule retiniche indifferenziate che possono differenziarsi in cellule simili a fotorecettori (110-112).

Le rosette di Homer-Wright sono meno comuni e meno specifiche per il retinoblastoma delle rosette di Flexner-Winterstainer. Sono comuni ad altre neoplasie maligne a derivazione neuroblastica e possono essere ad esempio molto frequenti nel medulloblastoma cerebellare (113). In queste rosette, le cellule non sono distribuite intorno ad un lume ma hanno processi citoplasmatici che formano un groviglio nel centro delle rosette.

Nel retinoblastoma è stata descritta una differenziazione gliale (114-116), ma è difficile riconoscerla dalla gliosi reattiva. Supporto più convincente per il concetto che le cellule del retinoblastoma possono differenziarsi sia in cellule neuronali che gliali, è fornito da studi su cellule di retinoblastoma indifferenziato in terreni di coltura. Variazioni nella composizione del mezzo di coltura inducono le cellule indifferenziate a subire una differenziazione neuronale con la formazione di processi di tipo neuritico e di rosette, mentre altre alterazioni nel mezzo di coltura inducono differenziazione gliale (117).

Estensione extraoculare e metastasi

La maggior parte dei retinoblastomi mostra una crescita inesorabilmente progressiva, rapidamente invasiva, caratteristica dei tumori blastici infantili. Se non trattati, questi normalmente crescono nell'occhio e distruggono completamente la struttura interna del bulbo.

La via di progressione più comune è l'invasione attraverso il disco del nervo ottico, soprattutto nei tumori posteriori. Una volta nel nervo, il tumore si diffonde

direttamente lungo i fasci di fibre nervose verso il chiasma ottico o infiltra lo spazio subaracnoideo attraverso la pia madre. Dallo spazio subaracnoideo le cellule tumorali sono trasportate dal fluido cerebrospinale nel SNC e nel midollo spinale (118-121).

Dalla retina il tumore supera la membrana di Bruch ed invade la coroide, entrando in contatto con i vasi ematici di questa struttura riccamente vascolarizzata. Una volta che il tumore ha invaso la coroide, può inoltre diffondere nell'orbita attraverso i canali sclerali o infiltrando massivamente la sclera (120).

Approssimativamente occorrono 6 mesi dai primi sintomi all'invasione extraoculare (122). Questa aumenta drammaticamente le probabilità di disseminazione ematogena e permette l'accesso ai linfatici congiuntivali e le metastasi ai linfonodi regionali.

Il retinoblastoma si diffonde attraverso 4 vie principali: infiltrazione diretta, dispersione vitreale, disseminazione ematogena e diffusione linfatica.

I vasi della retina, provenienti dall'arteria centrale della retina, branca dell'arteria carotide interna, sono contenuti all'interno della cosiddetta "barriera emato-retinica", che ostacola l'invasione vascolare da parte delle cellule neoplastiche (123-126). Inoltre, all'interno dell'occhio, non ci sono linfatici, così come nel sistema nervoso centrale. Anche la sclera provvede a formare una barriera meccanica alla diffusione delle cellule neoplastiche intraoculari.

Quando la neoplasia ha invaso la coroide ed è entrata in stretto contatto con i vasi fuori della barriera emato-retinica, le possibilità di diffusione ematogena a distanza aumentano drammaticamente. La aumentata potenzialità metastatica delle neoplasie che infiltrano la coroide è ben descritta dal paragone con il melanoma maligno uveale, il più frequente tumore intraoculare dell'adulto, che infiltra precocemente la coroide stessa. Il melanoma può dare origine a metastasi ematogene a distanza più frequentemente del retinoblastoma attraverso i vasi coroidei (che sono fuori dalla barriera emato-retinica) o può avanzare fuori dall'occhio invadendo l'orbita, generalmente lungo i canali emissari delle vene vorticosi, delle arterie ciliari e dei nervi (127). L'invasione extraoculare aumenta drammaticamente le possibilità di disseminazione ematogena e permette l'accesso ai linfatici congiuntivali e le metastasi ai linfonodi regionali.

Questa via di invasione attraverso la sclera è più raramente riscontrata nel retinoblastoma, almeno in Occidente. Le vie di metastatizzazione più frequentemente

riportate sono l'invasione del nervo ottico direttamente al SNC e l'invasione dei vasi coroidei con disseminazione ematogena (128,129). Nei casi avanzati può essere infiltrata la sclera a tutto spessore ed essere invasa l'orbita.

Vie di disseminazione

Le cellule del retinoblastoma sono per natura scarsamente coesive ed hanno un alto indice mitotico, inoltre possiedono una spiccata tendenza ad invadere prontamente gli spazi accessibili e cioè il vitreo, il fluido sottoretinico, il segmento anteriore e le guaine meninge del nervo ottico.

Quindi il retinoblastoma può svilupparsi in tre differenti direzioni:

- Anteriormente, attraverso il vitreo o lo spazio sottoretinico, al segmento anteriore raggiungendo il corpo ciliare e la camera anteriore, dando origine così ad uno pseudoipopion.
- Posteriormente, risalendo il nervo ottico e diffondendo attraverso il liquido cefalo-rachidiano, si possono sviluppare disseminazioni intracraniche.
- Estensioni extraoculari all'orbita, tramite la coroide e la sclera.

Superata la barriera della lamina cribrosa, l'infiltrazione può continuare lungo la porzione retrolaminare del nervo ottico fino allo spazio subaracnoideo e ulteriormente, veicolata dal liquido cefalo-rachidiano, alle varie strutture cerebrali. Un'altra via di disseminazione metastatica è quella vascolare (coroide, sclera, orbita, nervo ottico) oppure quella linfatica (congiuntiva, palpebre). Infine il tumore può anche invadere l'orbita direttamente attraverso la sclera o seguendo i canali orbitali delle arterie ciliari e dei nervi.

Fattori di rischio per malattia metastatica

I fattori di rischio più importanti per malattia metastatica sono l'invasione da parte di cellule tumorali del nervo ottico e della regione orbitaria (130,131). Il rischio di metastasi attraverso il nervo ottico dipende dallo stadio di presentazione del tumore al momento della diagnosi. Il rischio di mortalità è di circa il 50-85% (132) se le cellule maligne hanno raggiunto la linea di resezione chirurgica, mentre diminuisce fino al 13-69% se l'infiltrazione raggiunge la lamina cribrosa ma non la linea di resezione del nervo ottico fino a divenire insignificante se anteriore alla lamina cribrosa.

Ci sono 4 sottogruppi per classificare il coinvolgimento del nervo ottico:

- 1) invasione del nervo assente;
- 2) coinvolgimento prelaminare, cioè anteriore alla lamina cribrosa;
- 3) retrolaminare, entro oppure al di là della lamina cribrosa, senza invasione della linea di resezione o dello spazio subaracnoideo;
- 4) invasione della linea di resezione o dello spazio subaracnoideo (98).

L'altro fattore di rischio universalmente riconosciuto è la massiva invasione coroidale, che in associazione con l'infiltrazione del nervo ottico, aumenta in modo esponenziale il rischio di sviluppare metastasi (98,120,133).

I casi di invasione coroidale e sclerale sono suddivisi in 5 gruppi:

- 1) coinvolgimento coroidale assente
- 2) minimo coinvolgimento, in questo caso le cellule tumorali hanno invaso, distruggendola, la membrana di Bruch senza invadere la coroide in profondità, con al massimo 3 gruppi di cellule.
- 3) coinvolgimento coroidale massivo
- 4) coinvolgimento intrasclerale
- 5) coinvolgimento extrasclerale (98).

L'estensione orbitale del retinoblastoma può condurre ad una disseminazione sistemica attraverso i vasi sanguigni, la rete linfatica oppure lungo la via visiva fino al cervello.

L'invasione orbitaria è considerata un importante fattore di rischio (130), ma in questo caso le moderne terapie molto aggressive possono prolungare la sopravvivenza.

Infine l'invasione della camera anteriore non aumenta il rischio di mortalità, nonostante il rischio di disseminazione vascolare.

Secondi tumori non oculari

La proteina codificata dal gene *RBI*, cioè la pRb/p105, è implicata in molti processi cellulari come la proliferazione cellulare, la replicazione e riparazione del DNA e apoptosi. Per questo ruolo fondamentale che ha la proteina nella regolazione del ciclo cellulare, la mutazione del gene *RBI*, presente in tutte le cellule di ogni paziente affetto da retinoblastoma, predispone questi soggetti, sia quelli affetti da forme bilaterali che quelli con forme unilaterali ma con mutazione germinale, allo sviluppo di altri tumori

maligni primari, con la predilezioni per alcuni tessuti in particolare. Il retinoblastoma è il primo tumore identificato che mostra questa particolare tendenza.

Nel mondo occidentale, i tumori primari che questi pazienti sviluppano successivamente rappresentano la principale causa di morte, piuttosto che il retinoblastoma stesso (16,134). Il rischio di sviluppare nel tempo un secondo tumore primario è riportata da molti studi (18,118,135-137), ed è all'incirca dell'1% annuo (138). Il tempo di latenza tra la diagnosi di retinoblastoma e la scoperta del secondo tumore primario può variare da un anno a 46 anni. La radioterapia aumenta enormemente il rischio, specialmente se questa viene effettuata prima del compimento del primo anno di vita (138); altri autori hanno riportato che il rischio di sviluppare un tumore non oculare è dose dipendente (139); altri ancora hanno cercato di quantificare la dose responsabile, 111 Grey è la media di radiazioni ricevuta dai pazienti che sviluppano un osteosarcoma (140). I siti più comuni di localizzazione di questi secondi tumori sono in ordine di frequenza: tessuti molli della testa (24%), ossa del cranio (18%), pelle (15%), encefalo (8%) e altri (25%), (141). Quindi la presenza di un retinoblastoma aumenta significativamente il rischio di sviluppare altre forme tumorali; si tratta più comunemente di sarcomi ossei, che possono insorgere sia nell'ambito dell'orbita precedentemente irradiata a scopo terapeutico, sia al di fuori di essa. Ma sono riportate anche altre forme di neoplasie come melanomi, feocromocitomi, seminomi, rhabdomyosarcomi, tumori epiteliali maligni, leucemie e linfomi di Hodgkin. Successivamente è stato osservato che anche i pazienti che non avevano sostenuto radioterapia, sviluppano secondi tumori; si è quindi concentrata l'attenzione sugli agenti alchilanti (142).

Alcuni studi hanno riportato che i pazienti più predisposti allo sviluppo di un secondo tumore, sono quelli con mutazioni a livello dell'esone 19 (143), ma altri autori non hanno convalidato questa ipotesi (26). Attualmente l'incidenza complessiva di un secondo tumore non oculare a 10 anni dalla prima diagnosi di retinoblastoma è stimata nel 4-20% (136,142,144); questo può essere così spiegato: differenti tecniche e dosaggi radioterapici, differenti parti esposte alla radioterapia, diversi protocolli chemioterapici in uso, il tempo di osservazione, il numero dei pazienti, la proporzione tra retinoblastoma ereditario e sporadico, il follow-up, i metodi statistici usati e gli errori

durante lo studio (145). In conclusione, il retinoblastoma, il retinoma e i secondi tumori extraoculari, rappresentano varie manifestazioni della diversa espressione del gene *RBI*.

Il retinoma

Il termine retinoma o retinocitoma è attualmente usato per definire un tumore benigno della retina di origine retinocitica (146). Il retinoma è composto da cellule apparentemente benigne che mostrano una differenziazione fotorecettoriale senza evidenziare né aree di necrosi né minima attività mitotica, ma con numerose rosette.

Studi istopatologici e citogenetici, già nei lontani anni '80, tentavano di definire il retinoma come una lesione non-progressiva della retina, precedentemente definita come "regressione spontanea" del tumore (35). Questo termine suggeriva un rimpicciolimento della massa tumorale, forse in risposta a meccanismi di difesa dell'ospite (35). Successivamente, un altro studio (147) aveva evidenziato la presenza di un retinoblastoma e un retinoma nella stessa paziente, anche se in occhi diversi. L'analisi del cariotipo aveva mostrato una complessa delezione-traslocazione, avvenuta tra i cromosomi 10 e 13, confermando che la paziente era affetta dalla Sindrome da delezione 13q, caratterizzata anche da ritardo mentale (146). Questi elementi portavano alla definizione del retinoma come una lesione retinica altamente associata al retinoblastoma, ma fortunatamente dalla scarse caratteristiche e potenzialità maligne (35,36,93).

La trasformazione del tumore benigno in retinoblastoma è abbastanza rara, sebbene alcuni casi siano riportati in letteratura (13,93). I pazienti con una mutazione ereditaria del gene *RBI* possono manifestare indistintamente sia un retinoma che un retinoblastoma o più raramente una combinazione di entrambi nello stesso occhio come 2 foci diversi, oppure nei 2 occhi separatamente (147).

L'incidenza del retinoma tra i portatori di retinoblastoma ed i loro familiari è compresa tra l'1,8% e il 10% (93,148), ma la probabilità che il retinoma subisca la trasformazione maligna, già rara di per sé, diminuisce con l'aumentare dell'età del paziente (36,93). In uno studio condotto su 17 pazienti, per un totale di 24 retinomi, l'età media di scoperta del tumore era 15 anni, e quasi il 41% dei pazienti era asintomatico (148). Tre pazienti avevano un retinoma bilaterale mentre tutti gli altri presentavano retinomi monolaterali. Solo in un caso (4%), il retinoma ha subito la

trasformazione maligna in retinoblastoma, ed in un solo altro caso, il tumore ha mostrato una regressione, probabilmente per un meccanismo apoptotico (148).

Il retinoma è considerato un raro tumore benigno, che presenta mutazioni del gene *RBI* e alterazioni genetiche simili a quelle del retinoblastoma (37). Il perchè il retinoma si sviluppi solo in pochi casi, al contrario del retinoblastoma, non è ancora chiaro. Una ipotesi è che il retinoma potrebbe insorgere quando il secondo evento mutazionale (M2) sopraggiunge tardivamente nella maturazione cellulare, cioè quando la cellula precursore ha limitate capacità mitotiche ed è incapace di accumulare eventi mutazionali aggiuntivi (M3+) (149).

Il retinoma rimane una lesione poco studiata, in quanto i pazienti non sono trattati chirurgicamente, cioè non vengono enucleati, ed ancor più raramente all'esame istologico viene osservato un tessuto misto composto sia da retinoma che da retinoblastoma.

Retinoma e retinoblastoma

Argomento della presente tesi è studiare il rapporto clinico, patologico, genico e funzionale tra retinoma e retinoblastoma, per caratterizzare ulteriormente la morfogenesi funzionale ed i meccanismi molecolari che regolano la trasformazione da retina normale a neoplasia maligna.

Per meglio chiarire il legame tra retinoma e retinoblastoma sono stati studiati due casi, enucleati per retinoblastoma, in cui era presente nello stesso occhio tessuto riferibile a retinoma. Uno dei due casi aveva una diagnosi clinica oftalmoscopica precedente di retinoma, ma i successivi controlli oftalmoscopici avevano anche mostrato la presenza di un retinoblastoma nello stesso occhio. Nell'altro caso invece la diagnosi di retinoma è stata posta nell'occhio enucleato per retinoblastoma all'esame istologico.

La diagnosi istologica di retinoma è stata posta in base all'aspetto morfologico (vide infra), e confermata dalla reazione immunoistochimica per p75^{NTR}, proteina plasmatica transmembrana, recettore delle neurotrofine a probabile azione inibitoria. La p75 è il primo recettore delle neurotrofine ad essere stato identificato (150).

Le neurotrofine sono fattori di crescita per le cellule nervose. Capostipite di questa famiglia è il Nerve Growth Factor (NGF), primo fattore di crescita in assoluto ad

essere stato individuato (151,152). Successivamente, appartenenti alla stessa famiglia, sono stati identificati il Brain Derived Nervous Growth Factor (BDNF) e le neurotrofine 3 e 4 (NT-3, NT-4). L'azione delle diverse neurotrofine varia a seconda dello stato funzionale della cellula che riceve lo stimolo, della neurotrofina prodotta e dei recettori presenti sulla cellula stessa. Sono stati descritti recettori agonisti specifici per l'NGF (TRK-A), BDN-F (TRK-B), NT-3 (TRK-C) (153). In realtà questi recettori strettamente imparentati possono legarsi, anche se con affinità minore, anche alle altre neurotrofine (154). La neurotrofina NGF, secreta dalle cellule della microglia, è implicata nella maturazione e sviluppo della retina normale, ma è anche capace di indurre morte apoptotica nelle cellule retiniche attraverso il suo legame con la proteina recettoriale p75^{NTR}.

Il legame neurotrofina-recettore TRK stimola positivamente la cellula inducendo proliferazione cellulare, secrezione ed in generale stimola la attività cellulare. Ciascuna cellula può esprimere un solo recettore della famiglia TRK. Tutte le cellule, nervose e non solo, possono invece esprimere il recettore p75^{NTR}, cosiddetto recettore a bassa affinità, perché si lega indifferentemente a tutte le neurotrofine, con una minore affinità però rispetto ai recettori per la famiglia TRK (155,156).

L'effetto sul metabolismo cellulare del legame neurotrofina- p75^{NTR} varia in base allo stato funzionale della cellula ed alla contemporanea presenza o meno sulla membrana cellulare del recettore TRK. In casi particolari, il legame neurotrofina-p75 favorisce il legame neurotrofina-TRK ed ha un'azione favorente il metabolismo cellulare. In generale però, il risultato del legame neurotrofina- p75^{NTR} è l'inibizione della proliferazione cellulare, la differenziazione della cellula e una facilitazione della morte cellulare attraverso l'attivazione del meccanismo dell'apoptosi (157).

L'importanza di questa proteina nell'induzione dell'apoptosi è stata dimostrata in topi-KO per p75^{NTR}, in cui l'attività apoptotica dei retinociti era ridotta (157). Altri autori hanno dimostrato una espressione negativa della p75^{NTR} nel retinoblastoma umano (158), mentre nella retina normale e nel retinoma (sia umano che murino) la positività della proteina è ben evidente (159).

Nella retina normale, nel retinoma e nel retinoblastoma sono state studiate 4 regioni genomiche considerate molto importanti nella genetica del retinoblastoma: 1q32, 2p24, 6p22 e 16q22. Sono state individuate ed utilizzate 4 sonde diverse, una per

ogni regione, che individuano 4 geni candidati, rispettivamente *MDM4*, *MYCN*, *E2F4* e *CDH11* per studiare tramite PCR le 4 diverse regioni. Dai risultati si evince che le alterazioni delle regioni 1q32, 2p24 e 6p22 sono coinvolte anche nello sviluppo del retinoma.

Alla luce dei risultati di questa tesi, non ancora definitivi, il retinoma risulta essere una lesione neoplastica benigna, probabile precursore morfologico del retinoblastoma.

MATERIALE E METODI

Analisi istologica e immunoistochimica

I bulbi oculari enucleati sono fissati per immersione in formalina tamponata al 10% per circa 48h. Una volta sezionati, i frammenti sono processati per l'inclusione in paraffina. Segue il taglio in sezioni istologiche di 5µm, che successivamente vengono colorate con Ematossilina-Eosina (H&E), utilizzando le normali procedure di anatomia patologica.

Una prima analisi morfologica permette di valutare la presenza, la sede, l'estensione e la relativa stadiazione del retinoblastoma, oltre alla presenza di aree di necrosi e di eventuali calcificazioni. La valutazione istopatologica dei campioni consente di identificare la presenza di aree riferibili a retinoma, confermate con l'analisi immunoistochimica (vide infra).

Per l'immunoistochimica, le sezioni istologiche montate su vetrino, vengono sparaffinate in stufa a 60°C per 15 minuti e reidratate utilizzando prima xilolo e successivamente la serie discendente degli alcool. Le perossidasi endogene sono bloccate immergendo i vetrini in H₂O₂ al 3% in TBS per 15 minuti, e i legami aspecifici sono bloccati con siero di capra per 5 minuti. Gli antigeni di superficie sono smascherati mediante l'utilizzo del forno a microonde a 750W per 3 cicli di 5 minuti ognuno, immergendo i vetrini in un tampone Target Retrieval Solution (DAKO Cytomation, Glostrup, D). I campioni sono incubati per un'ora con l'anticorpo primario per p75^{NTR}, diluito 1:50 (Novocastra Laboratories, Newcastle-upon-Tyne, UK) e poi sciacquati in TBS. Segue l'incubazione con l'anticorpo secondario biotinilato per 20 minuti e l'incubazione con il complesso coniugato streptavidina-perossidasi per 20 minuti (Lab Vision, Ultra Vision Large Volume Detection System, anti-polyvalent, HRP, Fremont, CA, USA). Il legame dell'immunocomplesso è evidenziato con la 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) ed infine la reazione contrastata con ematossilina di Harrys. Sono usati controlli positivi e negativi appropriati.

Laser capture ed estrazione del DNA

Le cellule di interesse sono isolate dal tessuto mediante la microdissezione laser capture (Arcturus PixCell II, MWG-Biotech, Florence, Italy). I tessuti di

retinoblastoma, retinoma e retina normale sono stati precedentemente identificati nelle sezioni colorate con H&E. Le sottili sezioni vengono sparaffinate, reidratate e colorate con Ematossilina di Mayer ed Eosina G, nuovamente deidratate: i vetrini senza coprioggetto sono conservati in xilolo prima della laser capture. Le sezioni istologiche sono così osservate mediante un microscopio invertito. Le cellule selezionate vengono isolate mediante il raggio laser pulsante; il calore del raggio causa l'adesione della pellicola presente nella "cap" al tessuto sottostante. In questo modo, le cellule selezionate aderiscono alla pellicola (Arcturus, MWG-Biotech) e possono essere rimosse dal tessuto in esame. Le cellule "catturate", presenti all'interno della "cap", sono trasferite in una provetta da ultra-centrifugazione, contenente il tampone di digestione [tampone ATL e proteinase K (20µg/ml) (Qiagen, Hong Kong, China)]. L'estrazione del DNA è svolta utilizzando un kit specifico "QIAmp® DNA Micro Kit" (Qiagen, Hong Kong, China), seguendo il protocollo consigliato dalla ditta. Le concentrazioni del DNA sono lette al Fluorimetro (DyNA Quant™ 200 Fluorometer - GE Healthcare) usando il saggio di legame Hoechst dye, specifico per il DNA. La microdissezione laser consente di separare i diversi tipi cellulari, presenti nel tessuto in esame e così di isolare e studiare il pattern genomico delle diverse popolazioni cellulari.

Amplificazione del DNA

L'estrazione del DNA dai tessuti è stata eseguita usando il kit GenomePlex® Complete Whole Genome Amplification (WGA) (Sigma-Aldrich) per ottenere una buona quantità di DNA, seguendo il protocollo della ditta. Dopo l'estrazione del DNA dalle cellule prelevate con microdissezione, 100ng di DNA stampo erano incubati con il Buffer di Frammentazione (1X) a 95°C per 4 min e successivamente il campione era posto in ghiaccio. Seguiva l'incubazione con il Buffer Library Preparation e con la Soluzione Library Stabilization a 95°C per 2 min, e di nuovo il campione era posto in ghiaccio. Un microlitro di Enzima Library Preparation era aggiunto alla mix, per procedere con l'incubazione a 16°C per 20 min, 24°C per 20 min, 37°C per 20 min e 75°C per 5 min. Il campione veniva amplificato con la polimerasi WGA dopo una iniziale denaturazione a 95°C per 3 min, seguita da 14 cicli a 94°C per 15 sec ed a 65°C per 5 min. La purificazione dei prodotti veniva fatta mediante l'uso del kit GenElute™ PCR Clean-up (Sigma-Aldrich), seguendo il protocollo della ditta. Per la

determinazione della concentrazione del DNA è stato utilizzato il saggio di “binding” con l’Hoechst mediante lettura al Fluorimetro (DyNA Quant™ 200 Fluorometer - GE Healthcare).

Real-time PCR quantitativa

La Real-Time PCR quantitativa è stata effettuata per determinare alterazioni nel numero di copie di alcuni geni all’interno del DNA genomico. Attraverso il service Assay-by-Design (<http://www.products.appliedbiosystems.com>; Applied Biosystems, Foster City, CA) sono state disegnate le coppie di primers e le sonde specifiche. Sia i primers che le sonde cadono nelle regioni cromosomiche 1q32.1, 2p24.1, 6p22 e 16q22 per i geni *MDM4*, *MYCN*, *E2F3* and *CDH11*, rispettivamente (Tabella 1). La PCR è stata realizzata usando un ABI prism 7000 (Applied Biosystems) in piastre da 96 pozzetti, con un volume di reazione finale di 50ml. Le reazioni di PCR sono state preparate da Mix contenenti: 2X TaqMan Universal PCR Master Mix, 20X MDM4 Assay Mix, 20X RNAaseP Mix (standard interno) e acqua deionizzata. Un totale di 100ng di DNA (10µl) è stato caricato in ognuno dei 4 pozzetti per avere una reazione in triplicato. L’amplificazione è stata condotta utilizzando il seguente protocollo: 2 minuti a 50°C e 10 min a 95°C; seguono 40 cicli di denaturazione (95° per 15 secondi), “annealing” (60° per 1 minuto) e “extention” (72° per 30 secondi), in accordo con il protocollo della TaqMan Universal PCR (Applied Biosystems). Alcuni campioni di controllo sono stati usati per la calibrazione della reazione. Il numero di copie di partenza dei campioni sconosciuti è stato determinato usando il metodo comparativo del ciclo soglia (ddCt), come precedentemente descritto (160).

RISULTATI

Descrizione clinica

Caso 1: bambino di 5 anni e 4 mesi, terzo figlio di genitori sani e non-consanguinei. All'età di un anno e 9 mesi, è stato riscontrato uno strabismo ma l'esame oftalmoscopico era normale. A 2 anni e 6 mesi, durante una visita di controllo con oftalmoscopia (Fig 3a), è stato diagnosticato un retinoma nella porzione posteriore dell'occhio destro. La lesione riscontrata sulla retina è rimasta stabile per i successivi 11 mesi, non mostrando segni di crescita e di trasformazione neoplastica. Ma in un successivo controllo oftalmoscopico (Fig 3b), quando il bambino aveva 3 anni e 5 mesi, attorno al retinoma era evidenziata una massa neoformata, riccamente vascolarizzata, diagnosticata come un retinoblastoma monofocale unilaterale posteriore. Il retinoblastoma era inizialmente trattato con terapia conservativa, cioè laser terapia seguita da 4 cicli di chemioterapia. Al successivo controllo dopo 3 mesi, è stata osservata una recidiva del tumore (Fig 3c); il bambino è stato sottoposto ad altri 2 cicli di chemioterapia seguiti da radioterapia. Infine, la scoperta di una ulteriore recidiva ha indotto all'enucleazione dell'occhio destro del bambino all'età di 5 anni. Durante le visite oftalmoscopiche di controllo, non sono stati identificati foci neoplastici nell'occhio sinistro. All'esame ecografico era risultata una neoformazione tipo retinoblastoma, cupoliforme, con massimo spessore di 7,9mm, con al suo interno presenza di calcificazioni e lacune, temporalmente al nervo ottico.

Caso 2: bambina di circa 3 anni e mezzo, figlia di genitori sani e non consanguinei. All'età di 2 anni e 5 mesi giungeva all'osservazione del centro di Riferimento per il Retinoblastoma di Siena con un quadro molto avanzato di leucocoria; l'esame oftalmoscopico riscontrava una voluminosa neoformazione, che occupava più di un campo oftalmoscopico, in sede retrocristallina. All'esame ecografico risultava una neoformazione nel settore nasale con evidenza di calcificazioni. Intensa disomogeneità del vitreo, sospetto di seeding vitreale. La piccola paziente veniva enucleata nell'ottobre del 2006, per una diagnosi di retinoblastoma eso-endofitico. Il relativo esame istologico non rilevava presenza d'infiltrazione neoplastica della coroide e del nervo ottico, per questo motivo la bambina non è stata sottoposta a chemio e radioterapia. Durante le successive visite oftalmoscopiche di controllo non sono stati identificati foci neoplastici nell'altro occhio.

Esame istologico

Caso 1. Nella porzione posteriore del bulbo oculare è presente un aggregato cellulare, di piccole dimensioni, a cellule rotonde, intensamente basofile, con aree di necrosi e modesto infiltrato infiammatorio. Le cellule neoplastiche saltuariamente aggregate, sono organizzate in strutture rotondeggianti (rosette). Il retinoblastoma mostrava modalità di crescita sia eso- che endofitica, e infiltrava focalmente la coroide a tutto spessore e la porzione intraoculare del nervo ottico, prima della lamina cribrosa (pT2c)(161). Le cellule del retinoblastoma (Fig 4c) erano caratterizzate da scarso citoplasma, nucleo fortemente basofilo, tondeggianti e irregolare, con cromatina addensata. Prossima alla porzione intraoculare del nervo ottico, immerso e circondato dalla proliferazione neoplastica, era individuabile un'area, in parte cistica, in cui le cellule erano caratterizzate da abbondante citoplasma debolmente eosinofilo, nucleo regolare, tondeggianti od ovalare, con cromatina dispersa. Questa parte è morfologicamente indicativa di retinoma (Fig 4c).

Caso 2. Bulbo oculare quasi interamente occupato da proliferazione cellulare strettamente addensata, con aree di necrosi e minima calcificazione. Le cellule del retinoblastoma (Fig 5c), anche in questo caso, erano caratterizzate da scarso citoplasma, nucleo fortemente basofilo, tondeggianti e irregolare, con cromatina addensata. Il tumore non infiltrava né la coroide, né il nervo ottico (pT2a)(161). Nella porzione posteriore della proliferazione neoplastica, in vicinanza della porzione intraoculare del nervo ottico, è presente un'area completamente circondata, e in parte infiltrata, dalle cellule del retinoblastoma, costituita da cellule con abbondante citoplasma debolmente eosinofilo, nucleo regolare, tondeggianti od ovalare, con cromatina dispersa. Questa parte è morfologicamente indicativa di retinoma (Fig 5c).

Immunoistochimica

In entrambi i casi, l'analisi immunoistochimica per p75^{NTR} indicava un'intensa e costante positività della membrana plasmatica di tutte le cellule della retina normale e dei loro prolungamenti (assoni) (Fig 4e,f). Le aree occupate dalla proliferazione neoplastica (retinoblastoma)(Fig 4c,e; Fig 5e) erano, invece, completamente negative con l'eccezione della parete vascolare e di saltuarie, disperse "spicule" di

immunopositività (Fig 5f), interpretate come frammenti cellulari di retina normale intrappolati dalla proliferazione neoplastica. Le aree occupate dal retinoma presentavano immunopositività con la reazione immunoistochimica che marca la membrana plasmatica delle cellule (Fig 4d; Fig 5d).

Analisi molecolare

Dai bulbi oculari enucleati dei due pazienti con retinoblastoma, è stata fatta l'estrazione del DNA da tessuto paraffinato; in particolare, il DNA è stato prelevato (tramite laser capture), estratto e separatamente processato dal tessuto della retina normale, dal retinoma e dal retinoblastoma. Il DNA estratto dalla retina e quello ottenuto dal sangue del paziente sono stati usati come standard di riferimento. Per valutare le eventuali perdite o guadagni di copie genomiche in retinoblastoma e retinoma, è stata eseguita una Real-Time PCR quantitativa di 4 loci contemporaneamente. I pazienti presentavano sia retinoblastoma che retinoma nello stesso occhio. Le regioni cromosomiche analizzate erano: 1q32.1, 2p24.1, 6p22 e 16q22. In esse sono state disegnate le sonde per i 4 geni candidati *MDM4*, *MYCN*, *E2F3* e *CDH11*, ed è stato esaminato il loro numero di copie nel retinoma e nel retinoblastoma, prendendo come standard di riferimento il numero di copie presenti nella retina (Fig. 6).

Il primo paziente (caso 1) mostrava una iperespressione del gene *MDM4*, in particolare erano presenti 5 copie sia nel retinoma che nel retinoblastoma (ddCT ratio: 2.35 ± 0.14 in RB e 2.41 ± 0.13 in retinoma). Il secondo paziente (caso 2) mostrava un'amplificazione del gene *MDM4*, in particolare erano presenti 3 copie sia nel retinoma che nel retinoblastoma (ddCT ratio: 1.62 ± 0.09 in RB; 1.83 ± 0.01 in retinoma)(Fig 6a).

I nostri risultati mostravano una progressiva amplificazione del gene *MYCN* dalla retina al retinoblastoma (Fig. 6b), il retinoma, invece, presentava un'amplificazione intermedia per il gene *MYCN* se paragonato con il suo numero di copie genomiche nel retinoblastoma. Infatti, il caso 1 presentava 5 copie del gene nel retinoblastoma (ddCT ratio 2.57 ± 0.05) e 3 copie nel retinoma (ddCT ratio 1.55 ± 0.24), mentre il caso 2 mostrava 6 copie nel RBT (ddCT ratio 3.05 ± 0.13) e 3 copie nel retinoma (ddCT ratio 1.69 ± 0.14)(Fig 6b).

Nella regione cromosomica 6p22 (Fig 6c), la q-PCR mostrava una progressiva amplificazione del gene *E2F3* nel caso 2, in particolare 7 copie nel retinoblastoma e 5 copie nel retinoma (ddCT ratio: 3.36 ± 0.09 in RB and 2.32 ± 0.09 in RN), mentre il caso 1 sembra non avere un numero di copie alterato per il gene *E2F3* (ddCT ratio: 1.32 ± 0.13 in RB; 1.34 ± 0.06 in RN)(Fig 6c).

Infine, l'analisi della regione cromosomica 16q22 mostrava 4 copie del gene *CDH11* nel retinoblastoma del caso 1, mentre per i RT dei due casi e per il RB del caso 2, non erano presenti variazioni del numero di copie del gene. I valori di ddCT ratio erano: 2.08 ± 0.08 (RB) e 1.27 ± 0.07 (retinoma) nel caso 1 e 0.98 ± 0.16 (RB) e 0.80 ± 0.20 (retinoma) nel caso 2 (Fig 6d).

DISCUSSIONE

Le lesioni del retinoma sono state inizialmente descritte come “regressioni spontanee” del RBT, ma studi successivi hanno suggerito l’ipotesi che il retinoma rappresenti un primo step verso lo sviluppo del RBT (35,159). Poiché le variazioni del numero di copie del genoma possono essere degli indicatori dello status tumorale, abbiamo analizzato tali riarrangiamenti in due casi di pazienti che presentavano sia retinoma che retinoblastoma nello stesso occhio. In un caso, i segni clinici della presenza del retinoma sono risultati chiari fin dalle prime visite oftalmoscopiche, ed è stato successivamente osservato anche lo sviluppo del RBT. Nel secondo caso, invece, il retinoma è stato accertato in età avanzata del paziente, quando ormai la lesione era progredita in RBT.

L’età del paziente è una variabile clinica disponibile per tutti i casi di retinoblastoma. I tumori enucleati in età avanzata hanno mostrato molte più alterazioni cromosomiche rispetto a quelli enucleati in piccoli pazienti (44-46). Difatti, le anomalie cromosomiche che hanno una maggiore incidenza nei pazienti più grandi sono le seguenti: +1q, +13q, -16q a -16 (45) oppure come +2p, +17 e +19 (44). Ma anche i gain delle regioni cromosomiche 1q e 6p, e la perdita di eterozigosità 16q sono maggiormente associati con una età avanzata di diagnosi (162,163). Questa distribuzione delle alterazioni genomiche età-dipendente può essere dovuta semplicemente dal fatto che in questi bambini i tumori sono più estesi a causa della tardiva diagnosi.

In base alla presenza di aree di atrofia corioretiniche ed alla somiglianza oftalmoscopica tra il retinoma ed il retinoblastoma post-irradiazione, alcuni autori (100) propongono l’ipotesi che il retinoma sia una manifestazione della regressione di un precedente retinoblastoma.

I nostri risultati confermano invece l’ipotesi che il retinoma rappresenti un precursore morfologico del retinoblastoma. I dati che conducono a questa affermazione possono essere così sintetizzati:

1. Origine posteriore del retinoblastoma. I casi di retinoblastoma da noi studiati hanno diagnosi tardiva, 3 anni e 6 mesi nel primo caso, 2 anni e 8 mesi nel secondo; inoltre nel primo caso esiste uno stretto follow-up oftalmoscopico che conferma l’insorgenza tardiva del retinoblastoma stesso.

Casi così tardivi dovrebbero essere localizzati nella porzione anteriore della retina, in quanto la morfogenesi retinica procede dalla parte posteriore a quella anteriore dell'occhio ed il processo si conclude intorno al terzo anno di età del bambino. I casi di retinoblastoma localizzati nella porzione posteriore della retina “nascono” nei primi mesi di vita od addirittura durante la vita fetale intrauterina, e sono comunque diagnosticati entro il primo anno di vita. Con certezza assoluta il retinoblastoma del primo caso si sviluppa attorno al terzo anno di vita, mentre il secondo caso molto probabilmente si sviluppa attorno al secondo anno di vita.

Quindi, i RBT tardivi si dovrebbero localizzare nella parte anteriore dell'occhio, ma i casi di retinoblastoma da noi analizzati presentano il tumore nella porzione posteriore del bulbo oculare. Perciò, la localizzazione posteriore dei nostri casi confermerebbe l'ipotesi che essi hanno avuto origine da un pre-esistente retinoma.

In base alle conoscenze attuali, l'unica spiegazione razionale per questo fenomeno è di conseguenza l'origine della neoplasia maligna dalle cellule del precedente retinoma.

2. Studio molecolare. Nei due casi da noi studiati le alterazioni molecolari genomiche sono presenti sia nel DNA ottenuto da cellule di retinoma, sia nel DNA ottenuto da cellule di retinoblastoma.

Il retinoma è un tessuto con una crescita disordinata, afinalistica e che non conduce a completa maturazione cellulare e tissutale; perciò risponde pienamente a quelle che sono le caratteristiche del tessuto neoplastico. Comunque, pur essendo una neoplasia, come confermato dai nostri studi, presenta bassa velocità di crescita, bassa attività mitotica e morfologia cellulare conservata.

Nello studio da noi effettuato esistono differenze molecolari tra retinoma e retinoblastoma. Allo stato attuale peraltro non può essere affermato che queste differenze siano sostanziali. Retinoma e retinoblastoma sono molto più simili tra loro a livello genico che non alla retina normale e le alterazioni genomiche riscontrate non sono perciò determinanti nella trasformazione da RN a RBT. Quindi risulta ancora poco chiaro se la trasformazione neoplastica da tessuto normale a retinoblastoma sia dovuta unicamente a 2 alterazioni in geni omologhi (teoria dei 2 colpi di Knudson) (Fig 1a) o come per altri tessuti sia invece un processo multistep (Fig 1b)(164). Come esempio ben conosciuto di carcinogenesi multistep si rimanda alla trasformazione da mucosa

normale ad adenocarcinoma del grosso intestino attraverso la sequenza adenoma-adenocarcinoma (165).

Dall'altra parte, nell'animale da esperimento (topo) è stato dimostrato come l'alterazione di entrambi i geni *RBI* (M1 ed M2) non sia sufficiente a provocare l'insorgenza del retinoblastoma, ma sia invece necessaria la mutazione a livello di un altro gene che sintetizza per una proteina (p107) della stessa famiglia di pRb1/105 e che, come pRb1, ha la funzione di inibire la proliferazione cellulare attraverso il legame con la stessa proteina E2F a cui si lega p105/pRb1 (52).

Le variazioni del numero di copie genomiche rappresenta uno step fondamentale nello sviluppo del RBT. Questo studio mette in evidenza l'importante ruolo del gene *MYCN* (2p24) nella progressione maligna del retinoblastoma. I nostri dati mostrano una progressiva amplificazione del numero di copie del gene *MYCN*, suggerendo che il retinoma rappresenti uno step di transizione per lo sviluppo del tumore maligno (Fig. 6b). I nostri risultati, perciò, confermano l'ipotesi della natura neoplastica del retinoma anche a livello genetico, con alterazioni geniche di minore entità rispetto a RBT.

In un precedente studio, Bowles et al., analizzando 87 retinoblastomi, hanno dimostrato che il gene *MYCN* risulta amplificato nel 3% dei casi, mentre solo il 13% dei casi presentava dei gain di tale gene (41). Essi hanno anche osservato che i gain/amplificazioni del gene *MYCN* sono eventi più comuni nelle linee cellulari che nei tumori primari, suggerendo che queste variazioni nel numero delle copie dei geni conferisca un vantaggio selettivo per la crescita cellulare (41). Questo oncogene è ben conosciuto perché la sua iperattività è responsabile dell'insorgenza di altre neoplasie maligne. In particolare nel neuroblastoma, neoplasia maligna infantile dei gangli nervosi periferici simpatici; il numero di copie di *MYCN* nella proliferazione neoplastica è correlato con la prognosi, tanto che è uno degli indici prognostici più importanti (tante più copie di *MYCN* sono presenti, tanto peggiore è la prognosi) (166,167). Questa proprietà è in accordo con i nostri risultati, che mostrano una progressiva amplificazione del gene dal retinoma al retinoblastoma.

Gain del gene *E2F3* sono stati trovati nel 70% dei retinoblastomi (41). *E2F3*, insieme ad *E2F1* e *E2F2*, appartiene alla sottoclasse dei fattori che agiscono come attivatori della trascrizione nella fase di transizione G1/S RB1-dipendenti (168). Inoltre, *E2F3* reprime l'azione di p14/ARF, un importante fattore di repressione nel pathway di

p53 (169,170) e gli alti livelli di gain di *E2F3* possono così contribuire alla crescita del retinoblastoma a partire dal retinoma, sopprimendo il processo apoptotico p53-dipendente. I nostri dati mostrano una progressiva amplificazione del numero di copie del gene *E2F3* (6p22) dal retinoma al retinoblastoma, ed anche in questo caso, suggeriscono che il retinoma rappresenti uno step di transizione per lo sviluppo del tumore maligno (Fig. 6c).

Uno studio recente ha mostrato un aumento del numero di copie del gene *MDM4* nel 65% dei casi di RBT (171). Nei nostri due casi, *MDM4* risulta amplificato sia nel retinoma che nel retinoblastoma. Così, i nostri risultati non solo confermano l'importanza dell'amplificazione del gene *MDM4* nella progressione del RBT, ma indicano anche che è coinvolto nello sviluppo del retinoma (Fig. 6a). *MDM4* è un regolatore negativo della trascrizione di p53 e stabilizza il complesso ubiquitina ligasi E3-MDM2, che lega p53 per la degradazione (172). L'aumentata degradazione di p53 potrebbe essere un meccanismo importante per l'inattivazione del processo apoptotico nel retinoblastoma (173).

La perdita del gene *CDH11* è stata riportata nel 45% dei casi di retinoblastoma primario (174), così questo gene è stato proposto come un gene oncosoppressore candidato. Tuttavia, nei nostri casi non troviamo una perdita di copie del gene *CDH11*. Al contrario, nel nostro caso 1 abbiamo identificato un gain del gene (Fig. 6d). In letteratura, è stata riportata una iperespressione del gene *CDH11* in altri tipi di neoplasie, come il carcinoma della prostata e della mammella e il rhabdomyosarcoma (175-177), suggerendo che anche l'iperespressione di questo gene può contribuire alla carcinogenesi.

I risultati riguardanti queste 4 regioni "hot spot" modificano l'attuale modello multistep di progressione del retinoblastoma, proposto sulla base della frequenza delle variazioni genomiche trovate nel tessuto del tumore (41). In questo modello, infatti, dopo i primi due eventi mutazionali di *RBI* (M1 e M2), seguono altri eventi mutazionali che si associano alla malignità del tumore: gain dell'1q32.1 (M3), gain del 6p22 (M4), loss del 16q22 (M5a) e gain del 2p24.1 (M5b) (Fig. 1b).

Dalla nostra analisi si evince che i gains delle regioni 1q32.1, sono già presenti nel retinoma e di conseguenza, rappresentano un evento iniziale nel processo di trasformazione in neoplasia maligna, contrariamente a quanto descritto in precedenza

(41). I gains in 6p22 e 2p24 sono stati descritti negli stadi tardivi del retinoblastoma (41), ma i nostri dati indicano che queste alterazioni sono già presenti nel retinoma, anche se con un numero di copie minore rispetto al RBT (Fig 1c). In accordo con il modello proposto da Bowles et al. (41), non abbiamo trovato modificazioni genomiche nella regione cromosomica 16q22 nel retinoma (Fig 1b,c). Solo in un dei due casi abbiamo riscontrato gain in questa regione nel retinoblastoma, confermando così che modificazioni genomiche a questo livello sono eventualmente coinvolte nelle fasi tardive della progressione neoplastica (Fig 1b,c)(39).

3. Studio immunoistochimico. I nostri dati confermano quelli della letteratura (159) sulla presenza della proteina p75^{NTR} nella retina normale e nel retinoma, e della sua completa assenza nel retinoblastoma.

In entrambi i casi, le cellule della retina e del retinoma sono risultate positive alla p75^{NTR}, mentre le cellule del retinoblastoma sono risultate negative. Questo dato non solo conferma quelli presenti in letteratura (159), ma consente nuovamente di ipotizzare che il RBT si sia originato dal pre-esistente retinoma, che ha mantenuto alcune caratteristiche proprie del tessuto normale, come quella di esprimere la p75^{NTR}.

L'unica sostanziale differenza tra retinoma e retinoblastoma, non prettamente morfologica, è la mancata produzione e localizzazione sulla membrana plasmatica della proteina p75^{NTR}. I dati della letteratura indicano che la mancata espressione di p75^{NTR} nelle cellule di retinoblastoma non è dovuta ad un'alterazione del gene (41); infatti, la perdita di espressione di p75^{NTR} nel retinoblastoma può essere dovuta a mutazioni che non hanno effetti sul numero di copie del gene, ma da eventi epigenetici o trascrizionali, o da alterazioni metaboliche cellulari della neoplasia. Questo è il principale motivo per cui non abbiamo indagato in prima istanza nei nostri 2 casi il gene della p75^{NTR}. Alla luce dei risultati ottenuti fin qui risulta invece necessario proseguire lo studio, verificando il dato riportato in letteratura dell'integrità del gene (41). Il nostro studio infatti suggerisce che la perdita dell'espressione della proteina p75^{NTR} potrebbe accompagnare la progressione e la trasformazione da retinoma a retinoblastoma.

Ove il gene di p75^{NTR} si dimostrasse alterato, potrebbe essere questa l'alterazione molecolare determinante per la trasformazione da retinoma a retinoblastoma. Ove invece il dato della letteratura d'integrità del gene venisse confermato, sarà necessario indagare la regione di DNA promotore del gene stesso e i

possibili altri meccanismi genomici, post-genomici e post-transcrizionali responsabili della mancata produzione della proteina, che a questo punto appare essere il dato molecolare determinante nella trasformazione da retinoma a retinoblastoma.

Legende delle figure

Fig 1.

- a) Teoria dei due colpi di Knudson.
- b) Modello multistep del RBT da Bowles et al., 2007.
- c) Modello della progressione del RBT basato sui nostri risultati.

Fig 2

- a) Omologia di sequenza aminoacidica tra le proteine della famiglia RB. pRb1/p105, pRb2/p130 e p107 presentano una regione di omologia chiamata “regione pocket” con i domini A e B (in azzurro). La regione di C-terminale differisce in lunghezza tra le tre proteine. Le regioni indicate in giallo hanno una sequenza aminoacidica omologa solo tra la pRb2/p130 e p107.
- b) Lo stato di fosforilazione delle proteine RB e i loro legami con i fattori di trascrizione E2F durante le diverse fasi del ciclo cellulare.

Fig 3. Esame oftalmoscopico del caso 1.

- (a) L'esame oftalmoscopico è stato fatto al paziente all'età di 2 anni e 6 mesi. Sul fondo dell'occhio destro è stato osservato un retinoma cistico, che invadeva il punto di emergenza del nervo ottico.
- (b) A 3 anni e 5 mesi, è stata osservata una massa parzialmente necrotica con calcificazioni che occupano la parte posteriore dell'occhio.
- (c) A 3 anni e 9 mesi, il paziente è stato sottoposto a chemioterapia, radioterapia e terapia locale (laser ad Argon). La massa tumorale regrediva, ed è stata fatta l'enucleazione.

Fig 4. Immunoistochimica del caso 1.

- L'immagine mostra la colorazione E&E (a) e immunoistochimica per p75^{NTR} (b) dell'intero occhio; sono indicate la retina (teste di freccia), il retinoblastoma (asterisco) e il retinoma (frecce). L'immagine mostra anche la colorazione in E&E del retinoma (c, ingrandimento originale 100X) (RN) e del retinoblastoma (RB).
- La reazione positiva per la p75^{NTR} (d, ingrandimento originale 100x), indicata con il colore marrone per la reazione con il substrato DAB, dipinge le cellule del retinoma

(RN), mentre risultano negative le cellule del retinoblastoma (RB), come anche le cellule infiammatorie all'interno della massa tumorale. Piccoli bottoni di positività nell'area del tumore sono rappresentati dai corpi dei neuroni e dei loro prolungamenti, e dalle pareti dei vasi.

Fig 5. Immunoistochimica del caso 2.

L'immagine mostra la colorazione E&E (a) e immunoistochimica per p75^{NTR} (b) dell'intero occhio; sono indicate la retina (teste di freccia), il retinoblastoma (asterisco) e il retinoma (freccie). L'immagine mostra anche la colorazione in E&E del retinoma (c, ingrandimento originale 100X) (RN) e del retinoblastoma (RB).

La reazione positiva per la p75^{NTR} (d, ingrandimento originale 100x), indicata con il colore marrone per la reazione con il substrato DAB, dipinge le cellule del retinoma (RN), mentre risultano negative le cellule del retinoblastoma (RB), come anche le cellule infiammatorie all'interno della massa tumorale. Piccoli bottoni di positività nell'area del tumore sono rappresentati dai corpi dei neuroni e dei loro prolungamenti, e dalle pareti dei vasi.

Fig 6. Alterazioni genomiche ottenute con Real-Time PCR quantitativa.

L'immagine mostra i rapporti ddCT e le deviazioni standard ottenute dal retinoma (RN), retinoblastoma (RB) e retina (RT) del caso 1 (a sinistra) e del caso 2 (a destra). Per ogni grafico, i gain del numero delle copie genomiche è indicato sulla sinistra. L'asterisco mostra quando le differenze tra i campioni sono statisticamente significative (t-test, $p \leq 0.05$). **a.** Entrambi i casi mostrano un gain del gene MDM4 sia nel retinoma che nel retinoblastoma, con lo stesso numero di copie. **b.** In entrambi i casi, si osserva un gain progressivo del gene MYCN dal retinoma al retinoblastoma, rispetto alla retina normale. **c.** Il caso 1 non mostra variazioni nel numero di copie del gene *E2F3*, mentre il caso 2 mostra un gain progressivo del gene dal retinoma al retinoblastoma, se paragonato alla retina normale. **d.** In entrambi i casi, non si osserva una variazione genomica di *CDH11* nel retinoma, mentre solo nel caso 1, sono presenti gain del gene nel retinoblastoma.

Tabella 1. Sequenze dei primers e delle sonde per la Real-Time PCR quantitativa

Simbolo del gene	Banda	Localizzazione Primers &	Forward primer	Reverse primer	Sonda TaqMan
<i>MDM4</i>	1q32.1	Estone 3	CAGCAGGAGC AGCATATGGT	GAAGCTCTGA CGTCCCAGTAG	TTCTCCCAA AGATCTCC
<i>MYCN</i>	2p24.1	Estone 2	CGTCCGCTCA AGAGTGTCAT	TTTCTGCGACG CTCACTGT	CTTGAGCCCC CGAAACT
<i>E2F3</i>	6p22	Introne 2	GTACCATAAG GGAAGACTTC TTTTAACTGT	GAAGCAATGT CCATTAAGGG AAGTTAAAATT	AACTCGGAAT ACGAACTTT
<i>CDH11</i>	16q22	Estone 2	AGAGAGAGCC CAGTACACGT	ACCAATCGGC CACTGGAG	ATGGCTCAGG CGGTGG



Fig. 1a

Retinoblastoma

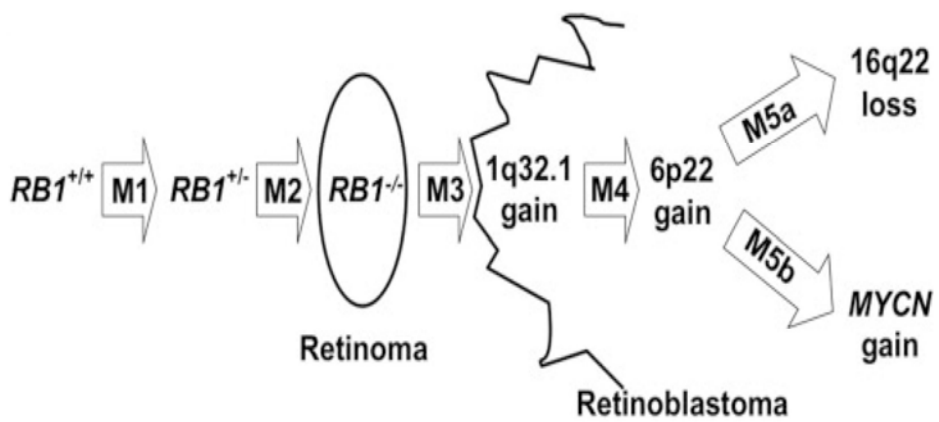


Fig. 1b

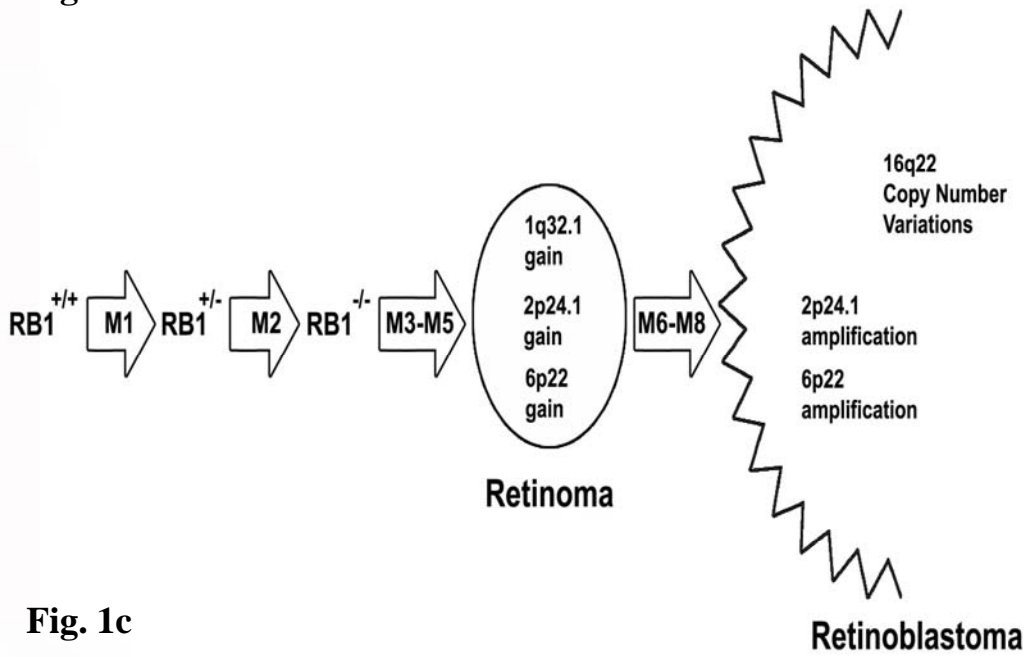


Fig. 1c

Retinoblastoma

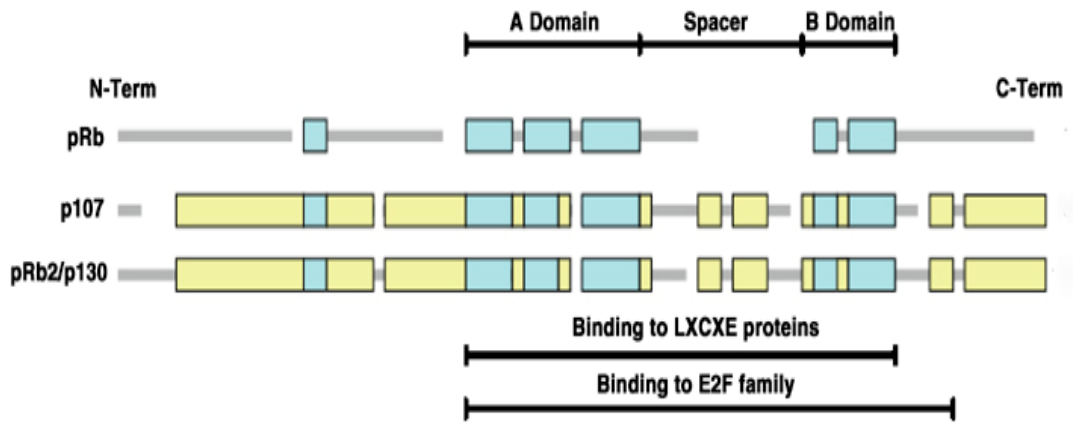


Fig. 2a

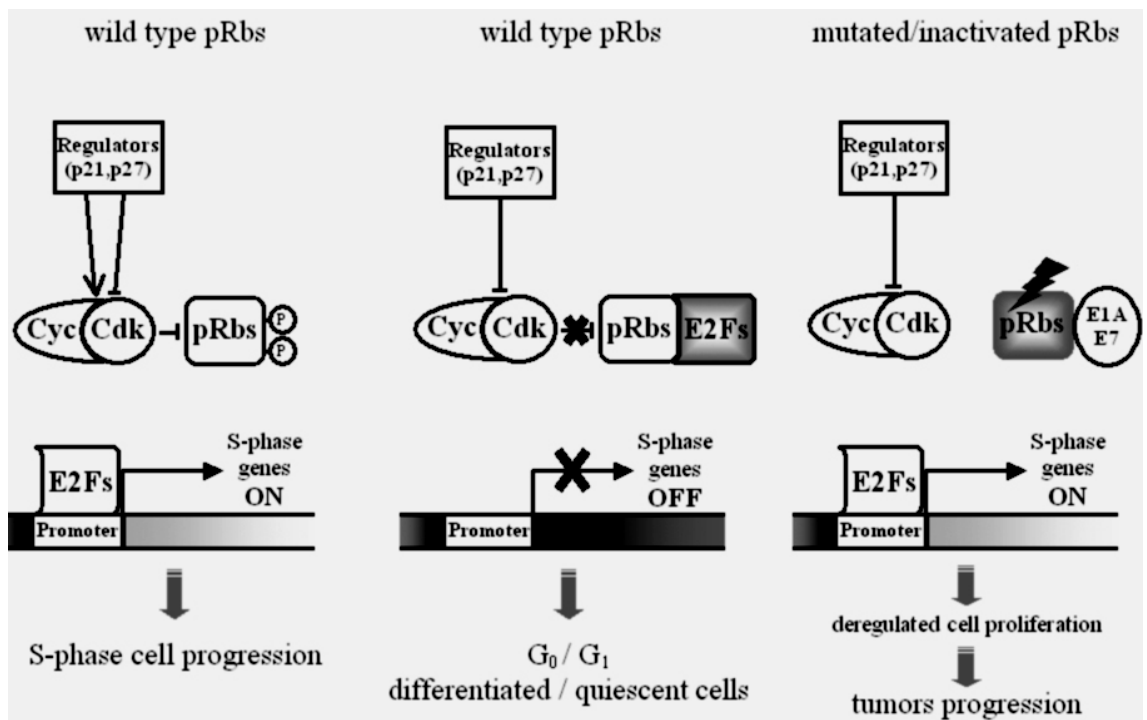


Fig 2b

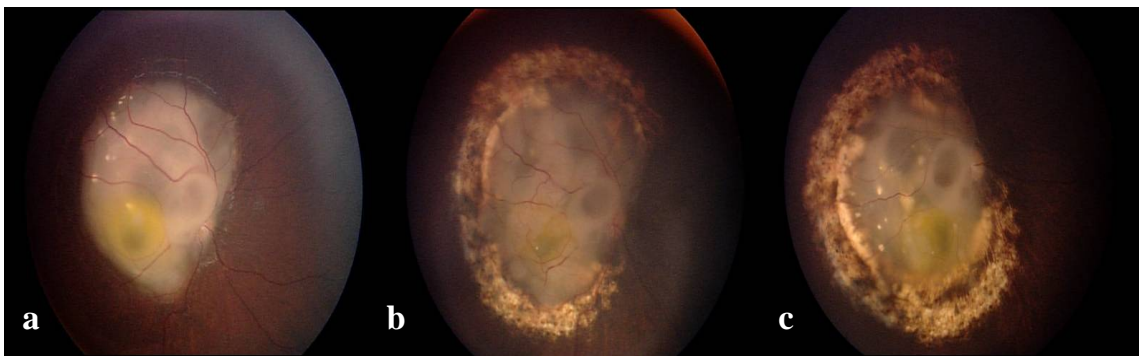


Fig. 3

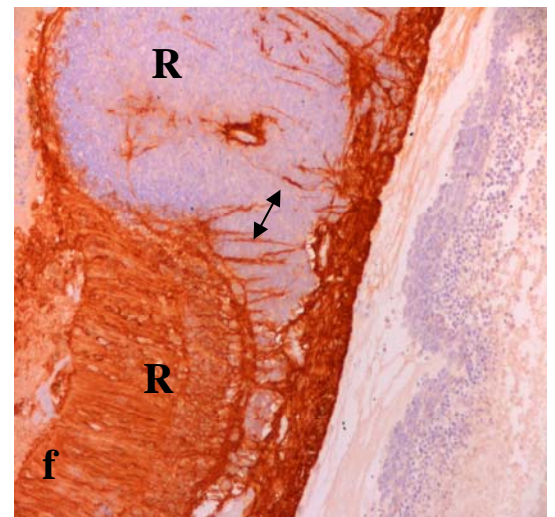
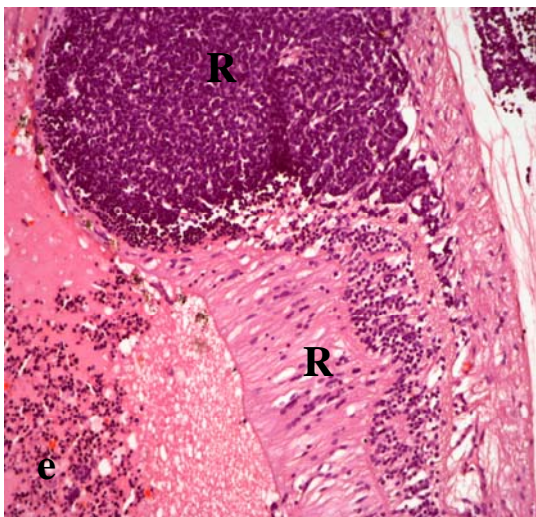
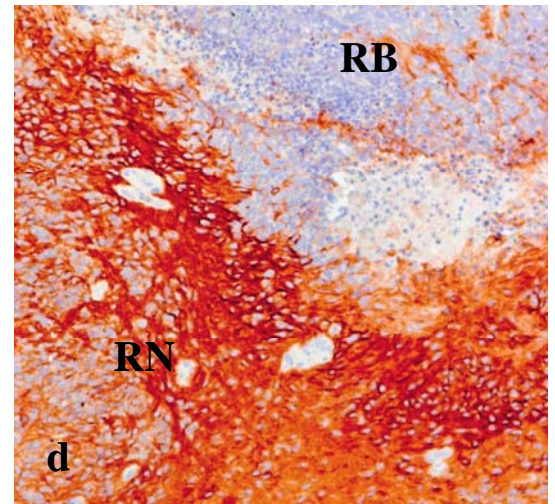
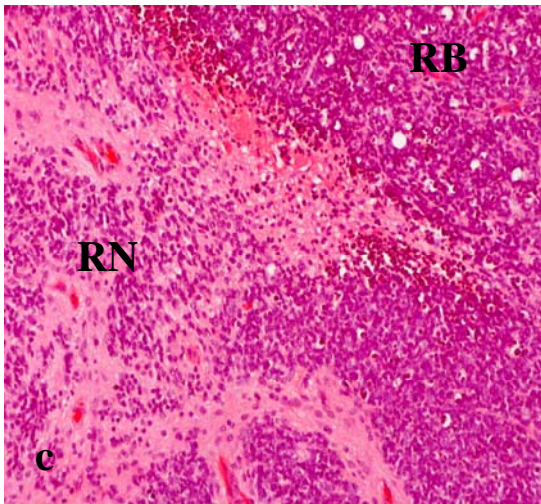
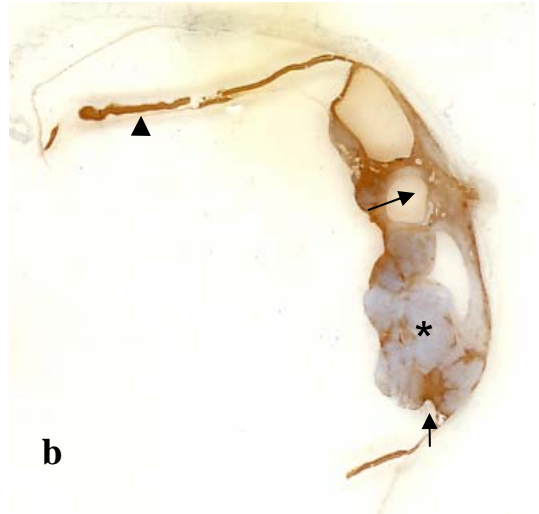
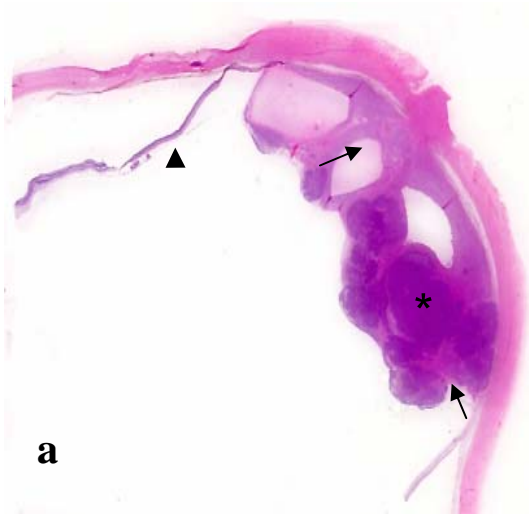


Fig. 4

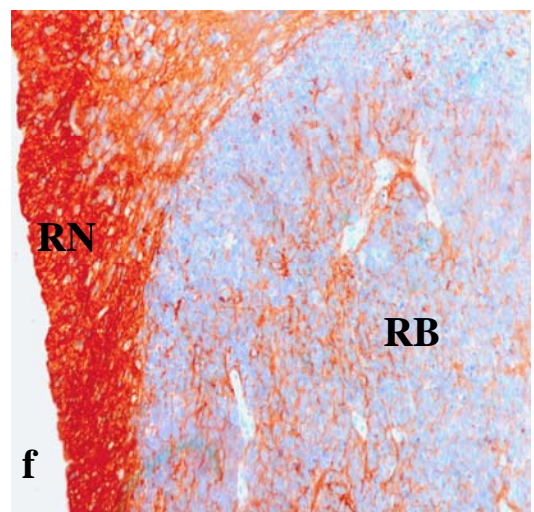
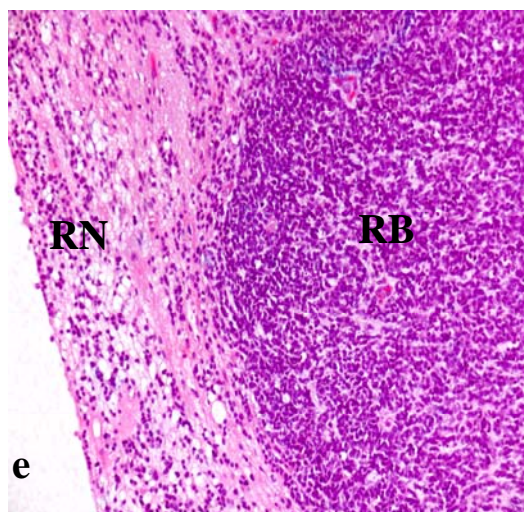
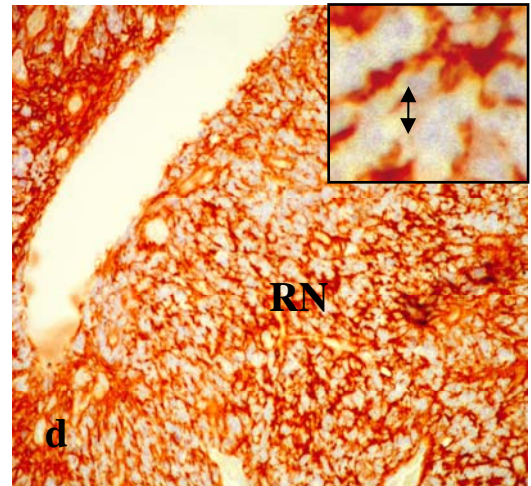
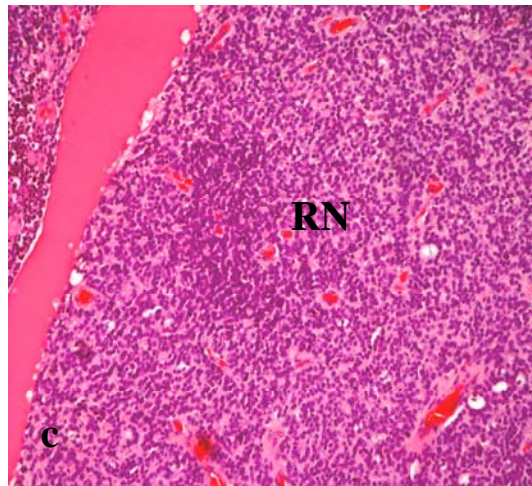
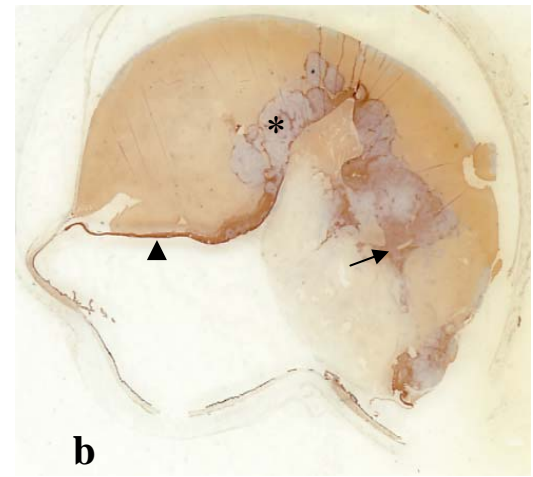
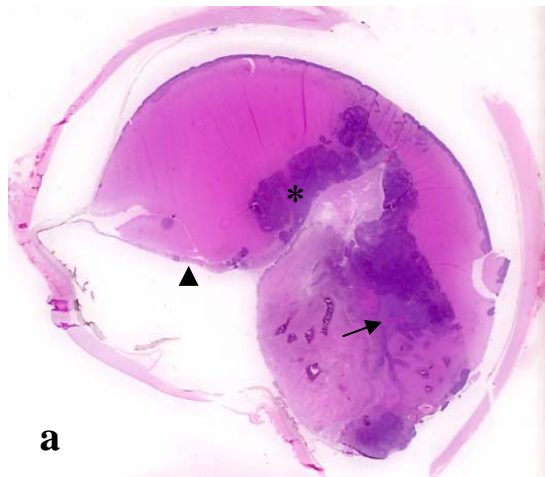


Fig. 5

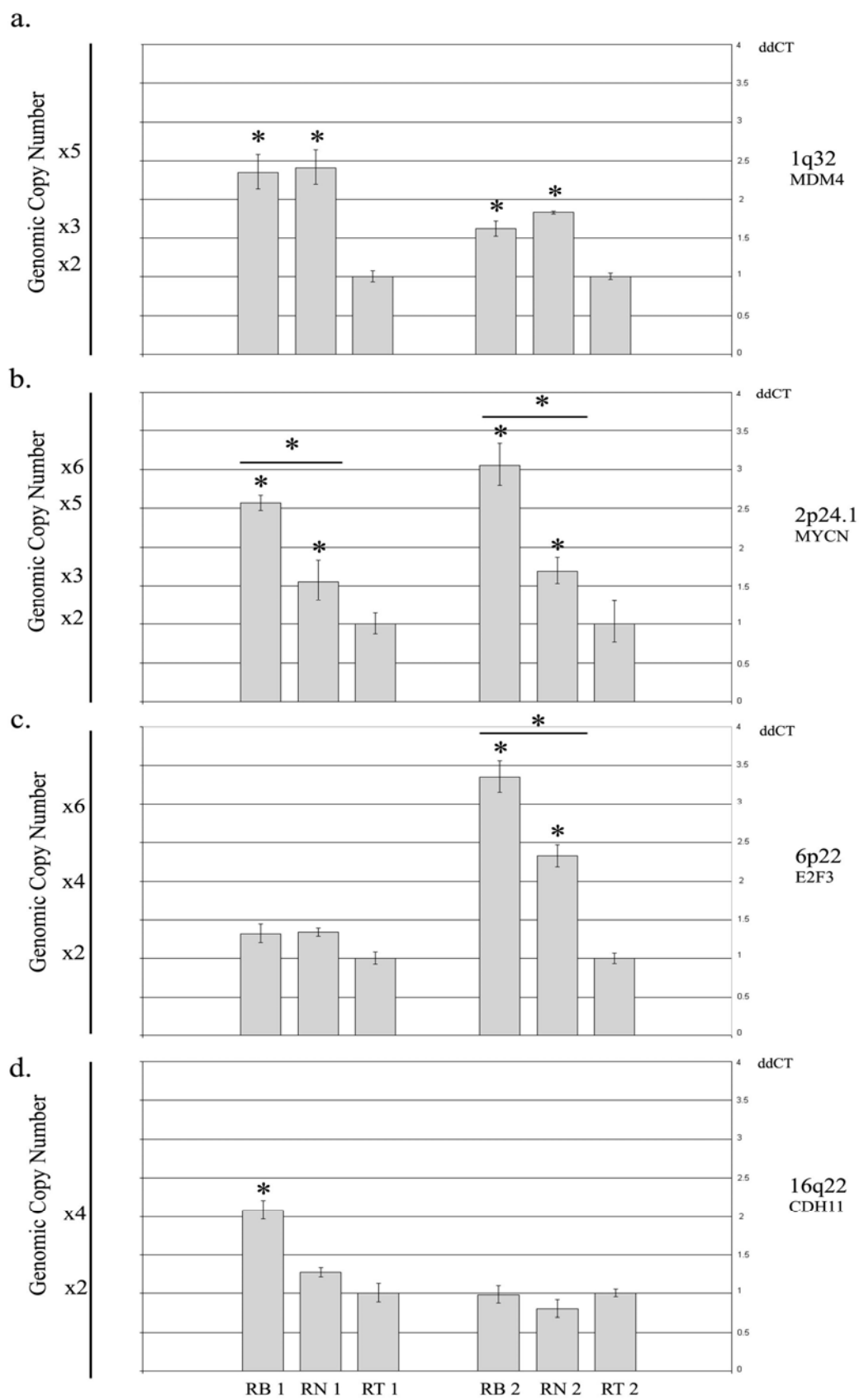


Fig. 6

BIBLIOGRAFIA

1. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: a statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-828.
2. Balmer A, Munier F. In: Zografos L (ed). *Tumeurs Intraoculaires*. Société Française d'ophtalmologie et Masson: Paris. 2002, pp 485-533; 481-485, 587-617.
3. Gallie BL, Campbell C, Devlin H, et al. Developmental basis of retinal-specific induction of cancer by RB mutation. *Cancer Res*. 1999; 59(7 Suppl):1731s-1735s.
4. Abramson DH, Scheffler AC. Update on retinoblastoma. *Retina*. 2004 Dec;24(6):828-48.
5. Sanders BM, Draper GJ, Kingston JE. Retinoblastoma in Great Britain 1969-80: incidence, treatment, and survival. *Br J Ophthalmol*. 1988 Aug;72(8):576-83.
6. Sante M, Capocaccia R, Badioni V and the Eurocare Working group. Survival for retinoblastoma in Europe. 2001. *Eur J Cancer* 37: 730-735.
7. DerKinderen DJ, Koten JW, Tan KE, et al. Parental age in sporadic hereditary retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 1990; 110: 605-609.
8. Matsunaga E, Minoda K, Sasaki MS. Parental age and seasonal variation in the births of children with sporadic retinoblastoma: a mutation-epidemiologic study. *Hum Genet*. 1990; 84: 155-158.
9. Mahoney MC, Burnett WS, Majerovics A, et al. The epidemiology of ophthalmic malignancies in New York State. *Ophthalmology* 1990; 97: 1143-1147.
10. Miller RW. Fifty-two forms of childhood cancer: United States mortality experience, 1960-1966. *J Pediatr* 1969; 75: 685-689.
11. Scat Y, Liotet S, Carre F. Epidemiological study of 1705 malignant tumors of the eye and adnexa. 1996; *J Fr Ophthalmol* 19: 83-88.
12. Maat-Kievit JA, Oepkes D, Hartwig NG, et al. A large retinoblastoma detected in a fetus at 21 weeks of gestation. 1993; *Prenat Diagn* 13: 377-384.
13. Shields CL, Shields JA, Shah P. Lesions simulating retinoblastoma. *Ophthalmology*. 1991; 98: 395-399.
14. Gallie BL, Phillips RA. Retinoblastoma: a model of oncogenesis. *Ophthalmology* 1984; 91: 666-672.

15. Conway RM, Wheeler SM, Murray TG, et al. Retinoblastoma: animal models. *Ophthalmol Clin North Am* 2005; 18: 25-39.
16. Abramson DH. Second nonocular cancers in retinoblastoma: a unified hypothesis. The Franceschetti Lecture. *Ophthalmic Genet* 1999; 20:193-204.
17. Vogel F. Genetics of retinoblastoma. *Hum Genet.* 1979 Nov 1;52(1):1-54.
18. Moll AC, Kuik DJ, Bouter LM, et al. Incidence and survival of retinoblastoma in the Netherlands: a register based study 1862-1995. *Brit J Ophthalmol* 1997, 81: 559-562.
19. Aerts I, Lumbroso-Le Rouic L, Gauthier-Villars M, et al. Retinoblastoma. *Orphanet J Rare Dis.* 2006 Aug 25;1:31.
20. Shimizu TTJ, Kato MV, Kaneko A, et al. Detection of mutations of the RB1 gene in retinoblastoma patients by using exon-by-exon PCR-SSCP analysis. *Am J Hum Genet.* 1994, 54:793–800.
21. Lohmann DR, Gerick M, Brandt B, et al. Constitutional RB1-gene mutations in patients with isolated unilateral retinoblastoma. *Am J Hum Genet.* 1997; 61:282-94.
22. Klutz M, Horsthemke B, Lohmann DR. RB1 gene mutations in peripheral blood DNA of patients with isolated unilateral retinoblastoma. *Am J Hum Genet.* 1999,64:667–8.
23. Alonso J, Garcia-Miguel P, Abelairas J, et al. Spectrum of germline RB1 gene mutations in Spanish retinoblastoma patients: phenotypic and molecular epidemiological implications. *Hum Mutat.* 2001, 17:412–222.
24. Comings DE. A general theory of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.*1973, 70:3324–3328
25. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, et al. A human segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986; 323:643–6.
26. Lohmann DR, Brandt B, HoppingW, et al. The spectrum of RB1 germ-line mutations in hereditary retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 1996;58:940–9.
27. Hogg A, Bia B, Onadim Z et al. Molecular mechanism of oncogenic mutations in tumors from patients with bilateral and unilateral retinoblastoma. *PNAS* 1993, 90: 7351–5.

28. Onadim Z, Hogg A, Cowell JK. Mechanisms of oncogenesis in patient with familial retinoblastoma. *Br J Cancer* 1993;68:958–64.
29. Damjanovich J, Adany R, Berta A, et al. Mutation of the RB1 gene caused unilateral retinoblastoma in early age. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;119:1–7.
30. Richter S, Vandezande K, Chen N, et al. Sensitive and efficient detection of RB1 gene mutations enhances care for families with retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 2003, 72:253–69.
31. Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, et al. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 1983;305:779–84.
32. Zhu X, Dunn JM, Goddard AD, et al. Mechanisms of loss of heterozygosity in retinoblastoma. *Cytogenet Cell Genet* 1992;59:248–52.
33. Hastrom SA, Dryja TP. Mitotic recombination map of 13cen~13q14 derived from an investigation of loss of heterozygosity in retinoblastomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2952–7.
34. Greger V, Debus N, Lohmann D, et al. Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma. *Hum Genet.* 1994;94:491-6.
35. Gallie BL, Ellsworth RM, Abramson DH, et al. Retinoma: spontaneous regression of retinoblastoma or benign manifestation of the mutation? *Br J Cancer.* 1982; 45:513-21
36. Eagle RC Jr., Shields JA, Donoso L, et al. Malignant transformation of spontaneously regressed retinoblastoma, retinoma/retinocytoma variant. *Ophthalmology* 1989, 6:1389-1395.
37. Abramson DH. Retinoma, retinocytoma, and the retinoblastoma gene. *Arch Ophthalmol.* 1983;101:1517-8.
38. Potluri VR, Helson L, Ellsworth RM, et al. Chromosomal abnormalities in human retinoblastoma. A review. *Cancer.* 1986 Aug 1;58(3):663-71.
39. Squire J, Gallie BL, Phillips RA. A detailed analysis of chromosomal changes in heritable and non-heritable retinoblastoma. *Hum Genet.* 1985;70(4):291-301.
40. 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.

41. Bowles E, Corson TW, Bayani J, et al. Profiling genomic copy number changes in retinoblastoma beyond loss of RB1. *Genes Chromosomes Cancer* 2007;46:118-129.
42. Mairal A, Pinglier E, Gilbert E, et al. Detection of chromosome imbalances in retinoblastoma by parallel karyotype and CGH analyses. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28:370-379.
43. Chen D, Gallie BL, and Squire JA Minimal regions of chromosomal imbalance in retinoblastoma detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;129:57-63.
44. Herzog S, Lohmann DR, Buiting K, et al. Marked differences in unilateral isolated retinoblastomas from young and older children studied by comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 2001;108:98-104.
45. Lillington DM, Kingston JE, Coen PG, et al. Comparative genomic hybridization of 49 primary retinoblastoma tumors identifies chromosomal regions associated with histopathology, progression, and patient outcome. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;36:121-128.
46. van der Wal JE, Hermsen MA, Gille HJ, et al. Comparative genomic hybridisation divides retinoblastomas into a high and a low level chromosomal instability group. *J Clin Pathol* 2003;56:26-30.
47. Zielinski B, Gratias S, Toedt G, et al. Detection of chromosomal imbalances in retinoblastoma by matrix-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;43:294-301.
48. Stiegler P, Kasten M, Giordano A. The RB family of cell cycle regulatory factors. *J Cell Biochem Suppl.* 1998;30-31:30-6.
49. Mayol X, Grana X, Baldi A, et al. Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (pRb2) which binds to the E1A transforming domain. *Oncogene* 1993; 8: 2561-2566.
50. Robanus-Maandag E, Dekker M, van der Valk M, et al. p107 is a suppressor of retinoblastoma development in pRb-deficient mice. *Genes Dev* 1998; 12: 1599-1609.

51. Pertile P, Baldi A, De Luca A, et al. Molecular cloning, expression, and developmental characterization of the murine retinoblastoma-related gene Rb2/p130. *Cell Growth & Diff* 1995; 6: 1659-1664.
52. Baldi A, Esposito V, De Luca A, et al. Differential expression of the retinoblastoma gene family members in lung cancer. *Clin Cancer Res* 1996. 2: 1239-1245.
53. Cavenee WK, Hansen MF, Nordenskjold M, et al. Genetic origin of mutations predisposing to retinoblastoma. *Science* 1985, 228: 501-503.
54. Baldi A, Boccia V, Claudio PP, et al. Genomic structure of the human retinoblastoma-related Rb2/p130 gene. *Proc Natl Acad Sci* 1996, 93: 4629-4632.
55. Yeung RS, Bell DW, Testa JR, et al. The retinoblastoma-related gene, Rb2, maps to human chromosomes 16q12 and rate chromosome 19. *Oncogene* 1993, 8: 3465-3458.
56. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science* 1991 254: 1138-1145.
57. Knudson AG. Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. *Science* 1984, 228:1028-1033.
58. Cinti C, Claudio PP, Howard CM, et al. Genetic alteration disrupting the nuclear localization of the retinoblastoma-related gene of Rb2/p130 in human tumor cell lines and primary tumors. *Cancer Res* 2000 60, 383-389.
59. Cinti C, Leoncini L, Nwongo A, et al. Genetic alterations of the retinoblastoma related gene Rb2/p130 identify different pathogenetic mechanisms in and among Burkitt's lymphoma subtypes. *Am J Pathol* 2000, 156: 751-760.
60. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995, 81:323-330.
61. Zhu L, Van Den Heuvel S, Helin K et al. Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein. *Gen Dev* 1993, 7: 1111-1125
62. Starostik P, Chow KNB, Dean DC. Transcriptional repression and growth suppression by the p107 pocket protein. *Mol Cell Biol.* 1996, 16: 3606-3614.
63. Paggi MG, Baldi A, Bonetto F, et al. Retinoblastoma protein family in cell cycle and cancer. A reviewer. *J Cell Biochem* 1996, 62: 418-430.
64. Hannon GJ, Demerick D, Beach D. Isolation of the Rb-related p130 through its interaction with cdk2 and cyclins. *Genes Dev.* 1993, 7: 2378-2391.

65. Lee JO, Russo AA, Pavletich NP. Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature* 1998, 391: 859-865.
66. Taya Y. Rb kinase and Rb-binding proteins: new point of view. *TIBS* 1997, 21:14-17.
67. Puri PL et al. The intrinsic cell cycle: from yeast to mammal. In: *The molecular basis of cell cycle and growth control*. Stein GS, Baserga R, Giordano A and Denhardt DT eds. (Wiley-Liss, New York) (1999) pp.15-79.
68. Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 1998,12:2245-2262.
69. Luo RX, Postigo AA, Dean DC. Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* 1998;92:463-73.
70. Brehm A, Miska EA, Mccance DJ et al. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature.* 1998, 391: 597-601.
71. Stiegler P, De Luca A, Bagella L et al. The COOH-terminal region of pRb2/p130 binds to histone deacetylase 1 (HDAC1), enhancing transcriptional repression of the E2F-dependent cyclin A promoter. *Cancer Res.* 1998;58:5049-52.
72. Huang S, Wang N-P, Tseng By et al. Two distinct and frequently mutated regions of retinoblastoma protein are required for binding to SV40 T antigen. *EMBO J.* 1990, 9:1815-1822.
73. Dingwall C, Laskey RA. Nuclear targeting sequences: a consensus? *Trends Biol Sci.* 1991; 16: 478-481.
74. Zacksenhaus E, Bremneev R, Phillips RA et al. A bipartite nuclear localization signal in the retinoblastoma gene product and its importance for biological activity. *Mol Cell Biol* 1993, 13: 4588-4599.
75. Thomas RC, Edwards MJ, Marks R. Translocation of the retinoblastoma gene product during mitosis. *Exp Cell Res* 1996, 223: 227-232.
76. Grumstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997, 389: 349-352.
77. Whitaker LL, Su H, Baskaran R. et al. Growth suppression by an E2F-binding-defective retinoblastoma protein (RB): contribution from the RB C pocket. *Mol Cell Biol* 1998, 18:4032-4042.

78. Knudsen ES, Wang JYJ. Differential regulation of retinoblastoma protein function by specific Cdk phosphorylation sites. *J Biol Chem* 1996, 271: 8313-8320.
79. Dong F, Cress WD Jr, Agrawal D, et al. The role of cyclin D3- dependent kinase in the phosphorylation of p130 in mouse BALB/c 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1998, 273:6190-6195
80. Bonetto F, Fanciulli M, Battista T et al. Interaction between the pRb2/p130 C-terminal domain and N-terminal portion of cyclin D3. *J Cell Biochem* 1999, 75:698-709
81. Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A et al. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*. 1999, 98:859-869.
82. Thomas NSB, Pizzey AR, Tiwari S et al. p130, p107 and pRb are differentially regulated in proliferating cells and during cell cycle arrest by γ -interferon. *J Biol Chem* 1998, 273: 23659-23667.
83. Bellan C, De Falco G, Tosi GM, et al. Missing expression of pRb2/p130 in human retinoblastomas is associated with reduced apoptosis and lesser differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002. 43: 3602-8.
84. Nevins JR. Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ* 1998, 9:585-593.
85. Harbour JW, Dean DC. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 2000, 2:65-67.
86. Stiegler P, Giordano A. Big brothers are watching: the retinoblastoma family and growth control. In: *Molecular and subcellular biology*. Marcello-Colheiro (ed). NY: Springer-Verlag, 1998, pp 24-42.
87. Sellar WR, Kaelin WG. Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 1997,15:3301-3312.
88. Vairo G, Livingston DM, Ginsberg D. Functionally interaction between E2F4 and p130: evidence for distinct mechanisms underlying growth suppressor by different retinoblastoma protein family members. *Genes Dev* 1995; 9:869-881.
89. Mulligan GJ, Wong J, Jacks T. p130 is dispensable in peripheral T lymphocytes: evidence for functional compensation by p107 and pRb. *Mol Cell Biol* 1998, 18:206-220.

90. Lee MH, Williams BO, Mulligan G et al. Targeted disruption of p107: functional overlap between p107 and Rb. *Genes Dev* 1996, 16:1621-1632.
91. Beaverson K, Abramson DH, Lee TC, et al. In: Keunen JEE, Imhof SM; de Keizer RJW, Moll AC (eds). Xth International Congress of Ocular Oncology. Amsterdam, 2001, Conference Proceedings, published by the eds.
92. Binder PS. Unusual manifestations of retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 1974; 77:674-679.
93. Balmer A, Munier F, Gailloud C. Retinoma. Case studies. *Ophthalmic Pediatr Genet* 1991; 12:131-137.
94. Abramson DH, Frank CM, Susman M, et al. Presenting signs of retinoblastoma. *J Pediatr* 1998.132:505-508.
95. Reese AB, Ellsworth RM. The evolution and current concept of retinoblastoma therapy. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*, 1963;67:164-72.
96. Linn Murphree A. Intraocular retinoblastoma: the case for a new group classification. *Ophthalmol Clin North Am*. 2005;18:41–53.
97. Abramson DH. Retinoblastoma 1990: diagnosis, treatment, and implications. *Paediatr Ann* 1990; 19:387-395.
98. Khelifaoui F, Validire P, Auperin A, et al. Histopathologic risk factors in retinoblastoma. *Cancer* 1996; 77:1206-1213.
99. Sang DN, Albert DM. Retinoblastoma: clinical and histopathological features. *Hum Pathol* 1982; 13:133-147.
100. Singh AD, Shields CL, Shields JA. Prognostic factors in retinoblastoma. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2000; 37:134-141.
101. Finger PT, Harbour JW, Karcioğlu ZA. Risk factors for metastasis in retinoblastoma. *Surv Ophthalmol* 2002; 47:1-16.
102. Haik BG, Dunleavy SA, Cooke C, et al. Retinoblastoma with Anterior Chamber Extension. *Ophthalmology* 1987; 94: 367-370.
103. Pe'er J, Neufeld M, Baras M, et al. Rubeosis iridis in retinoblastoma. Histologic findings and the possible role of vascular endothelial growth factor in its induction. *Ophthalmology* 1997; 104: 1251-1258.
104. Mansour AM, Greenwald MJ, O'Grady R. Diffuse infiltrating retinoblastoma. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1989; 26: 152-4.

105. Nicholson DH, Norton EW. Diffuse infiltrating retinoblastoma. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1980; 78: 265-89.
106. Shields JA, Shields CL, Eagle RC, et al. Spontaneous pseudohypopyon secondary to diffuse infiltrating retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1988; 106: 1301-2.
107. Boniuk M, Zimmerman LE. Spontaneous regression of retinoblastoma. *Int Ophthalmol Clin* 1962. 2: 525-42.
108. Ts'o MO, Fine BS, Zimmerman LE. The Flexner-Wintersteiner rosettes in retinoblastoma. *Arch Pathol* 1969; 88:664-71.
109. Sevel D, Röhm GF, Sealy R. Clinical significance of the fleurette in retinoblastoma. *Br J Ophthalmol*. 1974;58:687-93.
110. Donoso LA, Shields CL, Lee EY. Immunohistochemistry of retinoblastoma. A review. *Ophthalmic Paediatr Genet*. 1989; 10: 3-32.
111. Kivelä T. Glycoconjugates in retinoblastoma. A lectin histochemical study of ten formalin-fixed and paraffin-embedded tumours. *Virchows Arch* 1987; 410: 471-479
112. Vrabc T, Arbizo V, Adamus G, et al. Rod cell-specific antigens in retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1989; 107: 1061-3.
113. Rubinstein LJ. Tumors of the central nervous system. *Atlas of Tumor Pathology*, 2nd Series, Fascicle 6. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1982: 15-20.
114. Lane JC, Klintworth GK. A study of astrocytes in retinoblastomas using the immunoperoxidase technique and antibodies to glial fibrillary acidic protein. *Am J Ophthalmol* 1983; 95: 197-207.
115. Messmer EP, Font RL, Kirkpatrick LB, et al. Immunohistochemical demonstration of neuronal and astrocytic differentiation in retinoblastoma. *Ophthalmology* 1985; 92: 167-73.
116. Tarlton JF, Easty DL. Immunohistological characterisation of retinoblastoma and related ocular tissue. *Br J Ophthalmol* 1990; 74: 144-9.
117. Chader GJ. Multipotential differentiation of human Y-79 retinoblastoma cells in attachment culture. *Cell Differ* 1987. 20: 209-16.
118. Roarty JD, McLean IW, Zimmerman LE. Incidence of second neoplasms in patients with bilateral retinoblastoma. *Ophthalmology* 1988; 95: 1583-1587.

119. Magrann I, Abramson DH, Ellsworth RM. Optic Nerve Involvement in Retinoblastoma. *Ophthalmology* 1989; 96: 217-222.
120. Shields CL, Shields JA, Baez KA, et al. Choroidal invasion of retinoblastoma: metastatic potential and clinical risk factors. *British Journal of Ophthalmology* 1993; 77: 544-548.
121. Shields CL, Shields JA, Baez K, et al. Optic nerve invasion of retinoblastoma. Metastatic potential and clinical risk factors. *Cancer* 1994; 73: 692-698.
122. Erwenne CM, Franco EL. Age and lateness of referral as determinants of extra-ocular retinoblastoma. *Ophthalmic Paediatr Genet* 1989; 10: 179-84.
123. Bill A. The Blood-Acqueous Barrier. *Trans Ophthalmol Soc U.K.* 1986. 105: 149-155.
124. Cunha-Vaz JG. The Blood-retinal Barriers. *Documenta Ophthalmologica* 1976 41: 287-327.
125. Manfrè L, Midiri M, Giuffrè G, et al. Blood-ocular barrier damage: use of contrast-enhanced MRI. *Eur Radiol* 1997; 7: 110-114.
126. Toti P, De Felice C, Malandrini A, et al. Localization of laminin chains in the human retina: possible implications for congenital muscular dystrophy associated with alpha 2-chain of laminin deficiency. *Neuromuscul Disord* 1997; 7: 21-5.
127. Mclean IW, Burnier MN, Zimmerman LE, et al. Tumors of the eye and ocular adnexa. *AFIP Atlas of tumor pathology, 3rd series*, Bethesda 1994.
128. Apple DJ, Naumann GOH. *Retina*. In: *Pathology of the eye*. New York: Springer Verlag 1985.
129. Klintworth GK, Scroggs MW. The eye and ocular adnexa. In: *Diagnostic surgical pathology, 3rd ed*, Stemberg SS, ed. Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkins 1999.
130. Kopelman JE, McLean IW, Rosenberg SH. Multivariate analysis of risk factors for metastasis in retinoblastoma treated by enucleation. *Ophthalmology* 1987; 94: 371-377.
131. Messmer EP, Heinrich T, Hopping W, et al. Risk factors for metastases in patients with retinoblastoma. *Ophthalmology* 1991; 98: 136-41.

132. Uusitalo MS, Van Quill KR, Scott IU, et al. Evaluation of chemoprophylaxis in patients with unilateral retinoblastoma with high-risk features on histopathologic examination. *Arch Ophthalmol*. 2001;119:41-8.
133. Chantada GL, de Dávila MT, Fandiño A, et al. Retinoblastoma with low risk for extraocular relapse. *Ophthalmic Genet*. 1999;20:133-40.
134. Fletcher O, Easton D, Anderson K, et al. Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors. *J Nat Cancer Inst* 2004; 96: 357-363.
135. Abramson DH, Romner HJ, Ellsworth RM. Second tumors in nonirradiated bilateral retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 1979; 87:624-627
136. Lueder GT, Judisch F, O’Gorman TW. Second nonocular tumors in survivors of heritable retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1986; 104: 372-373.
137. DerKinderen DJ, Koten JW, Wolterbeeck R, et al. Non-ocular cancer in hereditary retinoblastoma survivors and relatives. *Ophthalmol Pediatr Genet* 1987; 8:23-25.
138. Abramson DH, Frank CM. Second nonocular tumors in survivors of bilateral retinoblastoma: a possible age effect on radiation-related risk. *Ophthalmology* 1998; 105: 573-580.
139. Sagerman RH, Cassady JR, Tretter P, et al. Radiation induced neoplasia following external beam therapy for children with retinoblastoma. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*. 1969;105:529-35.
140. Wong FL, Boice Jr JD, Abramson DH, et al. Cancer incidence after retinoblastoma. Radiation dose and sarcoma risk. *JAMA* 1997;278:1262-1267.
141. Abramson DH, Melson MR, Dunkel IJ, et al. Third (fourth and fifth) nonocular tumors in survivors of retinoblastoma. *Ophthalmology* 2001; 180:1868-1876.
142. Draper GJ, Sanders BM, Kingston JE. Second primary neoplasms in patients with retinoblastoma. *Br J Cancer* 1986; 53: 661-671.
143. Blanquette V, Turleau C, Gross-Morand MS, et al. Three novel germline mutations in exons 8 and 18 of the retinoblastoma gene. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 383-388.
144. Abramson DH, Ellsworth RM, Kitchin FD, et al. Second nonocular tumors in retinoblastoma survivors. Are they radiation-induced? *Ophthalmology* 1984; 91:1351-1355.

145. Aerts I, Pacquement H, Doz F, et al. Outcome of second malignancies after retinoblastoma: a retrospective analysis of 25 patients treated at the Institut Curie. *Eur J Cancer* 2004; 40:1522-1529.
146. Howard MA, Dryja TP, Walton DS, et al. Identification and significance of multinucleate tumor cells in retinoblastoma. *Arch Ophthalmol.* 1989;107:1025-30.
147. Keith CG, Webb GC. Retinoblastoma and retinoma occurring in a child with a translocation and deletion of the long arm of chromosome 13. *Arch Ophthalmol.* 1985;103:941-4.
148. Singh AD, Santos CM, Shields CL, et al. Observations on 17 patients with retinocytoma. *Arch. Ophthalmol.* 2000; 118:199-205.
149. Gallie BL, Dumm JM, Chan HSL, et al. The genetics of retinoblastoma: relevance to the patient. *Pediatric Clin North Am.* 1991; 38:299-315
150. Frade JM, Barde YA. Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron* 1998; 20, 35–41.
151. Levi-Montalcini R. Selective growth-stimulating effects of mouse sarcomas on the sensory and sympathetic nervous system of chick embryos. *Journal of Experimental Zoology* 1951;116:321-362.
152. Cohen S. Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. *PNAS* 1960; 46:302-311.
153. Hantzopoulos PA, Suri C, Glass DJ, et al. The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins. *Neuron* 1994; 13:187-201.
154. Schor NF. The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Progress in neurobiology.* 2005; 77: 201-214.
155. He X-I, Garcia KC. Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* 2004; 304:870–875.
156. Hempstead BL, Martin ZD, Kaplan DR, et al. High-affinity NGF binding requires coexpression of the Trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 1991; 350:678-683.
157. Frade JM, Barde YA. Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development* 1999; 126: 683–690.

158. Kimura N, Nakamura M, Kimura I, et al. Tissue Localization of Nerve Growth Factor Receptors: trkA and Low-Affinity Nerve Growth Factor Receptor in Neuroblastoma, Pheochromocytoma, and Retinoblastoma. *Endocr Pathol.* 1996; 7: 281-289.
159. Dimaras H, Coburn B, Pajovic S, et al. Loss of p75 neurotrophin receptor expression accompanies malignant progression to human and murine retinoblastoma. *Mol Carcinog.* 2006; 45:333-43.
160. Livak KJ (1997) Comparative Ct method. ABI Prism 7700 Sequence Detection System. User Bulletin no. 2. PE Applied Biosystems.
161. Sobin LH and Wittekind Ch eds. TNM Classification of malignant tumours. 6th ed. New York; Wiley-Liss 2002; pp.222-225.
162. Grasmann C, Gratiás S, Stephan H, et al. Gains and overexpression identify DEK and E2F3 as targets of chromosome 6p gains in retinoblastoma. *Oncogene.* 2005;24:6441-9.
163. Gratiás S, Schüler A, Hitpass LK, et al. Genomic gains on chromosome 1q in retinoblastoma: consequences on gene expression and association with clinical manifestation. *Int J Cancer.* 2005;116:555-63
164. DiCiommo D, Gallie BL, and Bremner R. Retinoblastoma: the disease, gene and protein provide critical leads to understand cancer. *Cancer Biology* 2000; 10: 255-269.
165. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996;87:159-70.
166. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, et al. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984;224:1121- 4.
167. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 1985; 313:1111 – 6.
168. Saavedra HI, Wu L, de Bruin A, Timmers C, et al. Specificity of E2F1, E2F2, and E2F3 in mediating phenotypes induced by loss of Rb. *Cell Growth Differ* 2002;13:215-225.

169. Parisi T, Pollice A, Di Cristofano A, et al. Transcriptional regulation of the human tumor suppressor p14(ARF) by E2F1, E2F2, E2F3, and Sp1-like factors. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:1138-1145.
170. Ginsberg D. E2F3-a novel repressor of the ARF/p53 pathway. *Dev Cell* 2004;6:742-743.
171. Laurie NA, Donovan SL, Shih CS, Zhang J, et al. Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. *Nature* 2006;444:61-66.
172. Marine JC and Jochemsen AG Mdmx and Mdm2: brothers in arms? *Cell Cycle* 2004;3:900-904.
173. Danovi D, Meulmeester E, Pasini D, et al. Amplification of Mdmx (or Mdm4) directly contributes to tumor formation by inhibiting p53 tumor suppressor activity. *Mol Cell Biol* 2004; 24 :5835-43.
174. Marchong MN, Chen D, Corson TW, et al. Minimal 16q genomic loss implicates cadherin-11 in retinoblastoma. *Mol Cancer Res* 2004;2:495-503.
175. Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders, et al. Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res* 2000;60:3650-3654.
176. Markus MA, Reichmuth C, Atkinson MJ, et al. Cadherin-11 is highly expressed in rhabdomyosarcomas and during differentiation of myoblasts in vitro. *J Pathol* 1999;187:164-172.
177. Pishvaian MJ, Feltes CM, Thompson P, et al. Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines. *Cancer Res* 1999;59:947-952.