

Identificación de la mutación R579X en el exón 18 del gen *RB1*, en pacientes con lesiones cervicales asociadas a infección por virus del papiloma humano.

Lic. Miguel Cáceres M.Sc., Militza Quintero, Jhon Cruz, Marco Bastidas, Dr. Juan Puig

Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX), Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

RESUMEN

Objetivo: Identificar la mutación R579X ubicada en el exón 18 del gen *RB1*, en pacientes con lesiones cervicales asociadas a infección por virus de papiloma humano mediante PCR-SSCP, PCR-RFLP y secuenciamiento.

Método: Estudio de 72 muestras de hisopado/cepillado de cuello uterino provenientes de 36 mujeres sanas, y 36 con infección por virus de papiloma humano y con presencia de lesiones cervicales a las cuales se les realizó la extracción de ADN, la amplificación del exón 18 del gen *RB1* mediante PCR, y el análisis mediante PCR-SSCP, Secuenciamiento y PCR-RFLP.

Resultados: El análisis por PCR-SSCP reveló dos patrones diferentes de corrida y mediante el secuenciamiento se logró identificar la mutación R579X en el exón 18 del gen supresor de tumores *RB1* en el 30,56 % de las muestras experimentales.

Conclusiones: La mutación R579X encontrada en las muestras experimentales conlleva a la formación de una proteína truncada no funcional, y aunado a esto, el virus de papiloma humano podría estar favoreciendo a la inmortalización de las células que presentan dicha mutación.

Palabras clave: *RB1*. Virus del papiloma humano. PCR-SSCP. PCR-RFLP. ADN secuenciamiento.

SUMMARY

Objective: To identify the mutation R579X in exon 18 located *RB1* gene in patients with cervical lesions associated with human papilloma virus infection by PCR-SSCP, PCR-RFLP and sequencing.

Method: Study of 72 samples of cervical brushing of the healthy women, infected with human papilloma virus and with cervical lesions that required DNA extraction, PCR amplification of exon 18 of the *RB1* gene, PCR-SSCP, Sequencing and PCR-RFLP analysis.

Results: PCR-SSCP analysis revealed two different band patterns. We identified the R579X mutation in exon 18 of the *RB1* tumor suppressor gene in 30.56 % of the experimental samples.

Conclusions: The mutation found in the experimental samples leads to the formation of a non-functional truncated protein, in addition, human papilloma virus infection might contributed to the immortalization of cells with this mutation.

Key words: *RB1*. Human papilloma virus. PCR-SSCP. PCR-RFLP. DNA sequencing.

INTRODUCCIÓN

El cáncer cervical representa el segundo tipo de cáncer más frecuente en la población femenina a nivel mundial. En Venezuela, este cáncer ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad en la población femenina del país, lo cual lo convierte en un verdadero problema de salud pública. Para el año

2008, se reportaron 1 251 casos, con una incidencia en mujeres con edades comprendidas entre 20 y 85 años (1-3).

El virus del papiloma humano (VPH) es el único virus asociado directamente con el desarrollo de cáncer en el tracto anogenital, considerándose como

el agente etiológico del mismo (4). Un evento clave en la inducción del cáncer cervical es la integración de los VPH de alto riesgo al cromosoma de su hospedador (5). Cuando ocurre la integración viral, el genoma del VPH puede fragmentarse por la región E2 llevando a la inactivación del gen *E2*. Al detenerse la síntesis de la proteína E2 cesa la acción represora de esta sobre los genes *E6* y *E7*. Las proteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo, son activas funcionalmente señalizando las proteínas P53 y RB1 respectivamente, de tal manera que son degradadas por el sistema ubiquitina dependiente. La desaparición de las proteínas P53 y RB1 bloquea la apoptosis e inmortaliza las células infectadas por VPH (1,6).

El gen *RB1* se localiza en el cromosoma 13 en la región q14.2. Tiene una longitud de 180 388 pb y está formado por 27 exones y codifica para un ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de 4.7 kb que se traduce en una fosfoproteína nuclear llamada RB constituida por 928 aminoácidos y con un peso molecular de 105-110 kDa. Las formas hipofosforiladas de la proteína RB1 forman complejos con ciertos factores transcripcionales, incluido el E2F, que regula la expresión de varios genes celulares que se requieren en la fase S del ciclo celular. Por tanto, RB en su estado de hipofosforilación, bloquea la progresión del ciclo celular porque permanece unida a E2F. Cuando la célula se desplaza de la fase G1 a la fase S, la proteína RB es fosforilada por un complejo de cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y esto hace que E2F se separe y quede libre para que transcriba los genes que se necesitan para que el ciclo celular prosiga (7,8).

En pacientes con retinoblastoma han sido reportadas todo tipo de mutaciones en *RB1*, deleciones, inserciones, duplicaciones, inversiones, transiciones en regiones CpG y mutaciones puntuales, siendo estas últimas las más frecuentes, contando cerca de 50 % de las alteraciones en el gen *RB1* (9). La mayoría de los estudios concuerdan con que los exones 3, 8, 18, 19 y 20 son las regiones preferenciales de mutación (“*hot spots*”). Además, existen estudios en donde reportan que las mutaciones en el gen *RB1* se distribuyen a lo largo de la secuencia codificante, así como también, en las regiones intrónicas del gen (7, 10). Un evento común en diversos tipos de cáncer es la inactivación del gen *RB1*. Algunos estudios sugieren que patrones alterados de la expresión de la proteína RB1 se asocian con formas diferentes de cáncer humano. En lesiones invasoras del cérvix uterino, la expresión de la proteína RB es casi nula a diferencia de lo que sucede con las lesiones pre-cancerosas del cérvix, en donde existe una

gran expresión de dicha proteína (11). En el cáncer cervical, la inactivación de la proteína RB ocurre por la unión con la proteína E7 de los VPH de alto riesgo (12). La proteína E7 puede disociar el complejo RB-E2F, se ha encontrado que este complejo está ausente en varias líneas celulares de cáncer cervical, ya sea por expresión de la proteína E7 de VPH o porque portan una mutación en el gen *RB1* (13).

MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo preliminar de corte transversal donde se analizaron 72 muestras del área genital de mujeres con edades comprendidas entre 17 y 55 años, activas sexualmente, atendidas, previo consentimiento informado, en consulta pública o privada por médicos especialistas. Presentando diagnóstico clínico previo de infección con VPH por citología, colposcopia o biopsia. Se seleccionaron 36 pacientes que presentaron infección por VPH de alto y bajo riesgo, con lesiones pre-cancerosas (NIC I, NIC II y NIC III) o cáncer de cuello uterino, constituyendo el grupo experimental; las otras 36 pacientes sin lesiones y sin presencia de VPH, constituyeron el grupo control.

La extracción del ADN se realizó según el protocolo de Blin y Stafford (14), al cual se le realizaron algunas modificaciones. El pellet celular se resuspendió en 200 μ L de tampón de Lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8.2; EDTA 2 mM; y NaCl 400 mM), 20 μ L de SDS 10 % y 8 μ L de Proteínasa K (10mg/mL). Se incubó a 55 °C durante 2 h. Seguidamente, se agregaron 200 μ L de Chelex-100 al 5 % y se calentó por 10 min a 95 °C. Se centrifugó 10 000 rpm por 10 min en una centrifuga eppendorf 5 424 y se tomaron 400 μ L de la capa superior a la cual se le añadieron 2 volúmenes de etanol puro en frío y 0,2 volúmenes de acetato de amonio 10 M, se dejó precipitar el ADN a -20 °C durante 12 h. Se centrifugó para bajar el precipitado y se resuspendió el ADN en 200 μ L de tampón TE 10 mM pH 8.

Las muestras de ADN se sometieron a una PCR que amplifica un fragmento del gen de la β -globina, para determinar la calidad del ADN (15). La detección y tipificación de VPH se realizó en un estudio previo (16). Se amplificó el exón 18 del gen *RB1* empleando los oligonucleótidos RB-18F y RB-18R (17). La mezcla de reacción consistió en tampón de PCR 1X, 2,0 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTP's, 25 pmoles de cada uno de los iniciadores y 0,5U de Taq polimerasa (Invitrogen). Se utilizó un termociclador Eppendorf *Mastercycler ep gradient S* con el siguiente programa

IDENTIFICACIÓN DE LA MUTACIÓN R579X

de amplificación: 1 min a 94 °C, 30 seg a 44 °C y 30 seg a 72 °C. Los resultados fueron observados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 6 % en tampón TBE 0,5X.

Una vez obtenidos los amplificadores del exón 18 se aplicó la técnica de PCR-SSCP (18). El aparato de electroforesis utilizado fue una cámara de marca Hoffer SE 660 Amersham Bioscience, acoplada a un refrigerante poly science moldel 90. Los vidrios tienen una medida de 18 x 16 cm, el grosor del gel es de 0,4 mm con una concentración de poliacrilamida 16 %. Los amplificadores del exón 18 fueron desnaturalizados, empleando para ello el mismo volumen de tampón de carga para SSCP (Formamida 95 %, EDTA 20mM y Azul de bromofenol 0,05 %), se sometieron a 95 °C durante 10 min y se colocaron inmediatamente en hielo por 10 min. Se sometieron a un campo eléctrico a 1285 V, 30 W en una fuente de poder modelo EC 4000P series 90 por 6 h. Los patrones de SSCP fueron visualizados mediante tinción con nitrato de plata (19).

Se secuenciaron dos muestras por cada una de las isoformas encontradas por la PCR-SSCP, tanto en el grupo control como el grupo experimental. El secuenciamiento se realizó en un Secuenciador automático (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer PE Applied Biosystems), siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Se realizó una digestión con la enzima de restricción *DdeI* para determinar la presencia de la mutación R579X en el exón 18 en las muestras del grupo experimental (17). La mezcla de restricción consistió de 5 µL del amplificado del exón 18, 1U de enzima, tampón de reacción 1X y agua destilada estéril para un volumen final de 10 µL. La mezcla se incubó por 1 h a 37 °C y se inactivó la enzima a 65 °C por 1 min. Para observar los patrones de digestión se tomaron 5 µL del digerido y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida 6 % en tampón TBE 0,5X.

Para el análisis de los resultados se empleó el paquete estadístico SPSS para Windows, versión 15.0.0. Se aplicó el test de Chi-cuadrado (X^2) y se construyeron tablas de contingencia de 2x2 o doble entrada, con el fin de investigar la asociación entre la mutación R579X del exón 18 del gen *RBI*, y relacionarla con los resultados de infección por VPH y el desarrollo de las lesiones cervicales en pacientes infectadas con el virus.

RESULTADOS

Se analizaron las 72 muestras de hisopado o

cepillado de cuello uterino. Todos los ADN purificados permitieron la amplificación de un fragmento del gen de la beta-globina, y se demostró que eran aptos para la PCR. Estas muestras fueron analizadas mediante los sistemas de PCR MY09/MY11 y GP5/GP6 y fueron sometidas a PCR-RFLP para su tipificación en un estudio previo (16).

De las muestras del grupo experimental, el 77,78 % presentó infección por VPH y el 22,22 % no presentó infección por el virus. El 39,29 % de esas muestras corresponden a VPH de alto riesgo, 25 % a VPH de bajo riesgo y 35,71 % a tipos de VPH no determinados. En cuanto a la presencia de lesiones cervicales, el 97,22 % de las muestras experimentales presentó lesiones pre-cancerosas o carcinoma de cuello uterino, de las cuales el 36,11 % corresponden a NIC I, 19,44 % a NIC II, 11,11 % a NIC III y 30,56 % a carcinoma *in situ*. El 2,78 % no presentó lesiones cervicales, pero presentó infección por VPH.

Una vez verificada la calidad del ADN en las muestras se procedió a la amplificación del exón 18 del gen *RBI* para realizar su posterior análisis mutacional. Todas las muestras en estudio permitieron la amplificación de 248 pb correspondientes al exón 18 del gen y a segmentos de los intrones 18 y 19 (Figura 1).

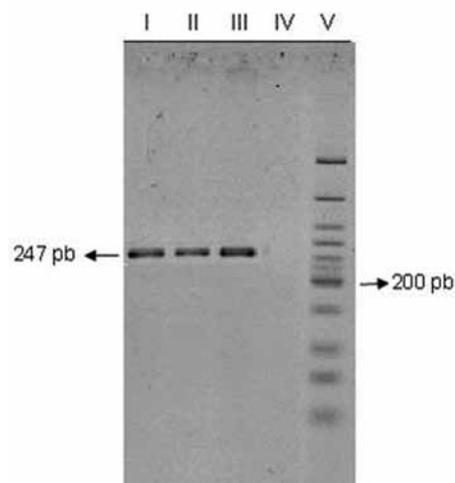


Figura 1. Amplificados del exón 18 del gen *RBI* obtenidos por PCR. Pozos I y II: muestras experimentales. Pozo III: control positivo. Pozo IV: control negativo. Pozo V: marcador de peso molecular de 50 pb.

El análisis por PCR-SSCP reveló dos patrones diferentes de corrida. Estas variaciones son

denominadas isoformas o variantes alélicas, y se diferenciaron en el número de bandas presentes. La isoforma *a* presentó cuatro bandas y la isoforma *b* presentó siete bandas. El 100 % de las muestras del grupo control presentó la isoforma *a*, mientras que en el grupo experimental la distribución de las isoformas fue de 69,64 % para la isoforma *a* y 30,56 % para la isoforma *b* (Figura 2).

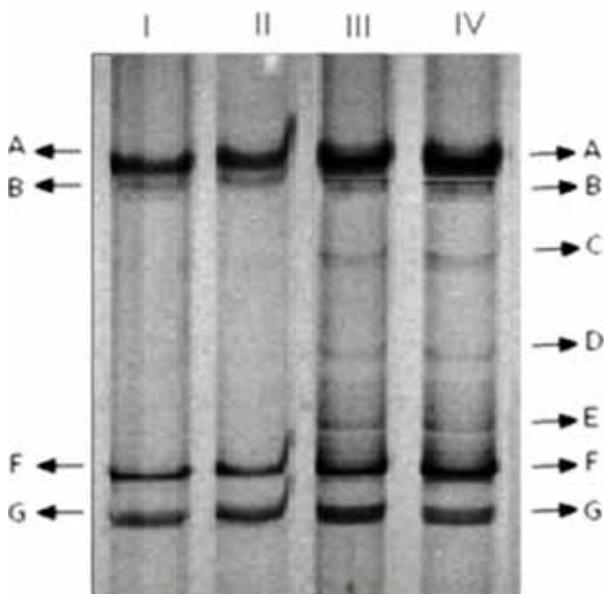


Figura 2. Isoformas encontradas en el exón 18 mediante el análisis por PCR-SSCP. Los pozos I y II muestran la isoforma *a* con 4 bandas definidas (A, B, F y G), los pozos III y IV muestran la isoforma *b* con 7 bandas definidas (A, B, C, D, E, F, y G).

Se realizó el secuenciamiento automático de dos muestras por cada una de las isoformas encontradas mediante el sistema PCR-SSCP. Con esto se determinó que la isoforma *a* corresponde a la secuencia nucleotídica sin mutaciones, y que la isoforma *b* presenta una mutación en el codón 579, específicamente una mutación puntual de transición C→T, la cual genera el cambio de un codón para arginina (CGA) en la posición 579 por un codón de terminación (TGA) de la traducción (R579X) (Figura 3).

La mutación R579X genera un sitio de corte para la endonucleasa de restricción *DdeI* (17) por lo cual, se procedió a realizar un análisis de restricción. Las muestras que presentaron la mutación fueron digeridas con la enzima, generando fragmentos de 39, 208 y 247 pb (Figura 4).

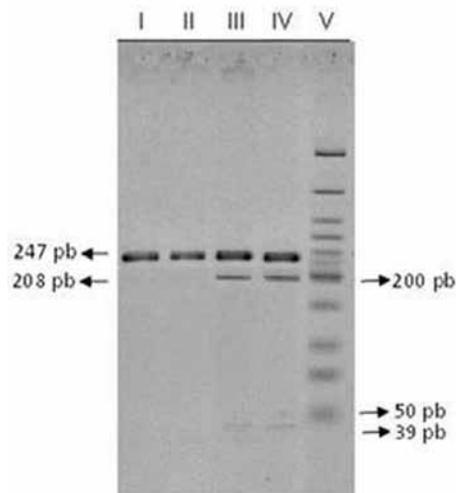


Figura 4. Análisis de restricción mediante PCR-RFLP con la enzima *DdeI*. Pozos I y II: muestras sin digerir. Pozos III y IV: muestras digeridas. Pozo V: marcador de peso molecular de 50 pb.

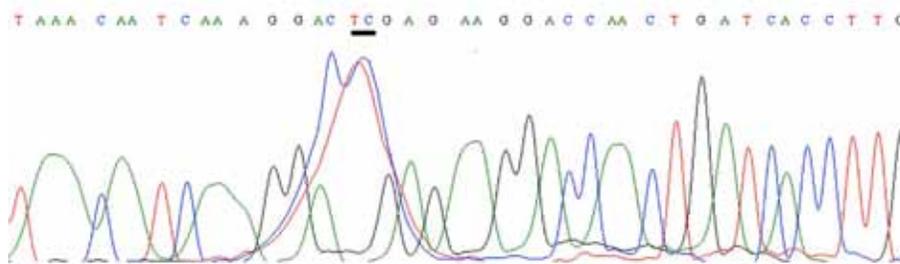


Figura 3. Parte del electroferograma obtenido mediante el secuenciamiento automático de la isoforma *a* del exón 18 del gen *RBI*. Se resalta la presencia de los nucleótidos C y T en la posición 1737 (codón 579).

Se encontró que existen diferencias significativas en la distribución de las isoformas en el grupo control y en el grupo experimental ($X^2 = 12,984$ y $P < 0,05$) además de que existe una fuerte asociación entre la presencia de la isoforma *b* (variante mutada) del exón 18 y la infección con VPH y/o presencia de lesiones cervicales ($X^2 = 13,259$ y $P < 0,05$).

DISCUSIÓN

El carcinoma de cuello uterino es el segundo cáncer más frecuente en las mujeres a nivel mundial superado solo por el cáncer de mama, constituyéndose en uno de los principales problemas de salud pública en la población femenina (20). La infección por VPH, sobre todo con virus de alto riesgo oncogénico, es uno de los principales factores responsables de esta etiología (21). Esto se debe a la acción que ejercen las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo, las cuales inactivan a las proteínas supresoras de tumores P53 y RB (6).

Diversos estudios reportan que la mayoría de las mutaciones encontradas en el gen *RBI* se encuentran en los exones 3, 8, 18, 19 y 20; los cuales codifican para dominios importantes de la proteína RB, como son el dominio amino terminal (exones 3 y 8) y el dominio "bolsillo" especialmente el dominio B (exones 18-20). Algunas de las mutaciones reportadas para el gen dan como resultado la terminación prematura de la proteína, mayor fosforilación de la proteína o la inhibición de la expresión del gen (11,22,23).

Mediante el análisis por PCR-SSCP se obtuvieron dos isoformas o variantes alélicas del exón 18 del gen *RBI* (isoformas *a* y *b*) y se secuenciaron dos muestras por cada una de las isoformas encontradas, tanto en el grupo control, como en el grupo de pacientes experimentales. Con el secuenciamiento automático se determinó que la isoforma *a* era la secuencia sin mutaciones, mientras que la isoforma *b* era la secuencia que presentaba la mutación R579X, esto fue confirmado mediante el análisis de restricción con la endonucleasa *DdeI* (17).

Esta mutación R579X ha sido reportada por varios autores en retinoblastoma (24). Para el análisis del exón 18, no se tomaron en cuenta las secuencias intrónicas flanqueantes debido a la confiabilidad del secuenciamiento en las lecturas al comienzo y final de cada secuencia. Sin embargo, sería recomendable determinar las secuencias de las regiones intrónicas que flanquean al exón, y determinar si interfieren en el *splicing*, ya que no se puede excluir la posibilidad de que alteraciones intrónicas tengan alguna significancia

funcional. Aunado a esto, se debe tener en cuenta la presencia de VPH en la mayoría de las muestras experimentales, el cual juega un papel muy importante en el origen y evolución de las lesiones cervicales. Además, debido a las características de la zona cervical y a su alta transformación, se piensa que las mutaciones en el gen *RBI* se producen durante el proceso de división celular, y al ser esta proteína tan importante en la regulación de este ciclo, bajo condiciones normales (sin VPH) se desencadena una serie de señales que activan a P53, y las células que portan la mutación son eliminadas por los procesos apoptóticos. Por esta razón, se podría explicar la ausencia de la mutación en el grupo de muestras control. En el caso de las muestras que presentan infección por VPH, este estaría jugando un papel muy importante en el proceso de inmortalización celular, ya que estaría favoreciendo la selección y permanencia de las células que presentan las mutaciones en *RBI* impidiendo que entren en apoptosis mediada por P53, ya que esta es inactivada por la proteína E6 de VPH, impidiendo que cumpla sus funciones. Este hecho podría explicar la elevada frecuencia de la mutación R579X encontrada en nuestro grupo de pacientes con lesiones cervicales y/o presencia de VPH.

Lohmann y col. (7) realizaron un análisis de mutaciones en el gen *RBI* en pacientes con retinoblastoma, y reportan la mutación encontrada en nuestro estudio, además de otras mutaciones a lo largo del gen, incluyendo los intrones. Szijan y col. (25) y Braggio y col. (26) reportan la misma mutación en retinoblastoma. En general, se ha realizado un gran número de investigaciones a fin de analizar las mutaciones a lo largo del gen *RBI*, incluyendo tanto exones como intrones, pero la mayoría de estos estudios se han centrado en retinoblastoma, encontrándose escasa información sobre mutaciones en este gen en otros tipos de cáncer en los cuales podría estar involucrado.

Por último, se debe recalcar que el cáncer es una enfermedad multifactorial, por tanto, para interpretar de manera adecuada esta clase de estudios se debe ampliar la investigación evaluando factores externos a los que está sometida cada persona, tales como la dieta, el tabaquismo, la exposición a agentes carcinógenos, entre otros. Asimismo, se debe ampliar el estudio a un número más grande de participantes para poner en evidencia la asociación entre la mutación R579X del exón 18 del gen *RBI*, con la infección por VPH y la presencia de lesiones cervicales.

Agradecimientos: A todos los médicos que contribuyeron con la recolección de las muestras en sus respectivas consultas, en especial a la Dra. Adriana Rodríguez. Al personal de la cátedra de Citología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, que evaluaron las citologías, y al personal de LABIOMEX por su valiosísima colaboración y apoyo para la realización de este trabajo.

Este trabajo fue financiado parcialmente por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes (CDCHT-ULA) a través del proyecto H-1269-09-07-F.

REFERENCIAS

1. Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol.* 2002;3:11-16.
2. Ministerio de Salud y Desarrollo Social: Anuario de Mortalidad, Venezuela. Año 2008.
3. Medina F, Sánchez-Lander J, Calderaro F, Borges A, Rennola A, Bermúdez C, et al. Cáncer de cuello uterino. Consenso nacional para el diagnóstico y tratamiento 2010. *Rev Venez Oncol.* 2011;23(2):102-129.
4. Zür Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians.* 1996;111:581-587.
5. Münger K, Baldwin A, Edwards K, Hayakawa H, Nguyen C, Owens M. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 2004;78:11451-11460.
6. Zür Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:690-698.
7. Lohmann D, Brandt B, Hopping W, Passarge E, Horsthemke B. The spectrum of RB1 germ-line mutations in hereditary retinoblastoma. *Am J Hum Genet.* 1996;58:940-949.
8. Mendoza C, Cerbón, M. El gen supresor de tumores p53: mecanismos de acción en la proliferación y muerte celular. *Rev Invest Clin.* 2001;53(3):266-273.
9. Leone P, Vega M, Jervis P, Pestana A, Alonso J, Paz C. Two new mutations and three novel polymorphisms in the RB1 gene in Ecuadorian patients. *J Hum Genet.* 2003;48:639-641.
10. Valverde J, Alonso J, Palacios I, Pestaña A. RB1 gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database. *BMC Genetics.* 2005;6:53.
11. Rodríguez M, del Prado M, Salcedo, M. Perspectivas en la genómica del Retinoblastoma: Implicaciones del gen supresor de tumor RB1. *Rev Invest Clin.* 2005;57(4):572-581.
12. Lee J, Russo A, Pavletich N. Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature.* 1998;391:859-865.
13. Chellappan S, Hiebert S, Mudryj M. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell.* 1991;65:1053-1061.
14. Blin N, Stafford DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 1976;3(9):2303-2308.
15. Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985;230:1350-1354.
16. Quintero M, Cruz J, Bastidas M, Márquez L, Puig J. Detección y tipificación de virus del papiloma humano (HPV) mediante PCR-RFLP. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 2008;68:25-31.
17. Blanquet V, Gross M, Turleau C, Senamaud C, Doz F, Besmond C. Three novel germline mutations in exons 8 and 18 in the retinoblastoma gene. *Hum Mol Genet.* 1994;3:1185-1186.
18. Shimizu T, Toguchida J, Kato M, Kaneko M, Ishizaki K, Sasaki S. 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.
19. Cruz J, Quintero M, Fernández L, Condezo G, Bastidas M, Puig J. Distribución del polimorfismo del codón 72 del gen p53 en lesiones de cuello uterino. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 2010;70(1):31-36.
20. López J, Aristizábal F. Integración viral y cáncer de cuello uterino. *Rev Col Cienc Quím Farm.* 2006;35:5-32.
21. Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch X, Kummer J, Shah K, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189:12-19.
22. Alonso J, García P, Abelairas J, Mendiola M, Sarret E, Vendrell M, et al. Spectrum of germline RB1 gene mutations in Spanish retinoblastoma patients: Phenotypic and molecular epidemiological implications. *Hum Mut.* 2001;17:412-422.
23. Rodríguez M, Salcedo M, González M, Coral R, Salamanca F, Arenas D. Identification of novel mutation in the RB1 gene in Mexican patients with retinoblastoma. *Canc Genet Cytogenet.* 2002;138:27-31.
24. New mutation database interface RB1 LOVD Please follow the link "RB1 mt db LOVD2" En the main menu 2011 <http://rb1-lsdb.d-lohmann.de/>
25. Szijan I, Lohmann D, Parma D, Brand B, Horsthemke B. Identification of RB1 germline mutations in Argentinian families with sporadic bilateral retinoblastoma. *J Med Genet.* 1995;32:475-479.
26. Braggio E, Bonvicino C, Vargas F, Ferman S, Eisenberg A, Seuánez H. Identification of three novel RB1 mutations in Brazilian patients with retinoblastoma y "exon by exon" PCR mediated SSCP analysis. *J Clin Pathol.* 2004;57:585-590.