

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Cirugía

RETINOBLASTOMA Y GENÉTICA

Correlaciones de la identificación de las alteraciones genéticas del gen RB1
con factores epidemiológicos, clínicos y pronósticos.

Alteraciones del gen RB1 y quimiorresistencia.

Estudio descriptivo y analítico de las alteraciones genéticas del gen RB1 y
el retinoblastoma trilateral.

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

NOEMI RUIZ DEL RIO

Directores:

DR. D. JOSE MANUEL ABELAIRAS GOMEZ

DR. D. JAVIER ALONSO GARCIA DE LA ROSA

Madrid, 2008.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

PRÓLOGO

I. INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología	4
2. Clínica	8
3. Historia Natural	10
4. Diagnóstico	13
4.1. Técnicas de Imagen	15
4.1.1. Ecografía	15
4.1.2. TC y RM.	16
4.2. Diseminación	17
4.3. Diagnóstico de las metástasis	19
4.4. Retinoblastoma extraocular (orbitario)	20
4.5. Extensión extraocular iatrogénica	20
4.6. Retinoblastoma Trilateral	21
4.7. Retinoblastoma en niños mayores	23
5. Clasificación	24
6. Anatomía Patológica	30
6.1. Retinoma o Retinocitoma	32
6.2. Regresión espontánea	33
7. Tratamiento	35
7.1. Quimioterapia	35
7.1.1. QTP en RB intraocular extrarretiniano	37
7.1.2. QTP en RB extraocular o metastásico	39
7.1.3. Quimiorreducción en RB intraocular	40
7.1.4. QTP local. Carboplatino subtenoniano	49
7.1.5. Otras vías de administración de quimioterápicos	50
7.2. Consolidación focal	51
7.2.1. Termoterapia Transpupilar	51
7.2.2. Fotocoagulación láser	55
7.2.3. Criocoagulación	57

7.2.4. Radioterapia Externa (Teleterapia)	59
7.2.5. Braquiterapia o radioterapia en placas	69
7.2.6. Enucleación	74
7.2.7. Exanteración	78
7.3. Protocolo terapéutico. Clasificación Internacional	79
7.3.1. RB Unilateral no hereditario	79
7.3.2. RB Bilateral simétrico	80
7.3.3. RB Bilateral asimétrico	80
8. Pronóstico	81
8.1. Pronóstico Vital	82
8.2. Pronóstico Funcional	87
9. Seguimiento	90
9.1. Patrones de Regresión	90
9.2. Recurrencias y nuevos tumores	92
10. Diagnóstico Diferencial	94
10.1. Persistencia Vasculatura Fetal	94
10.2. Enfermedad de Coats	95
10.3. Toxocariasis ocular	96
10.4. Astrocitoma retiniano	97
10.5. Retinopatía del Prematuro	98
10.6. Otras causas menos frecuentes	99
11. Genética y Biología Molecular	101
11.1. Avances Clínicos	101
11.2. Avances en Ciencias Básicas	101
11.3. Genética del retinoblastoma	102
11.3.1. Genética Clínica	102
11.3.2. Terminología Genética	103
11.4. Genética Molecular	104
11.5. El gen RB	107
11.6. Retinoblastoma de Baja Penetrancia	109
11.7. Mutaciones del gen RB en otros tumores	110
11.7.1. La pRb y supresión tumoral	110
11.7.2. Vía del supresor tumoral RB1	115
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	120

III. MATERIAL Y MÉTODOS	123
3.1. Criterios de Inclusión y Exclusión	123
3.2. Recogida de Datos	124
3.3. Criterios de Evaluación	128
3.3.1. Inicio del Análisis y Seguimiento	128
3.3.2. Extensión de la enfermedad	129
3.3.3. Enucleación	129
3.3.4. Agudeza visual	129
3.3.5. Estudio genético	130
-Técnicas de Diagnóstico Molecular	130
- Diagnostico genético. Elementos Analizados	133
- Tipo de Alteración Genética Identificada	134
3.4. Característica de la serie	135
3.5. Método estadístico	135
IV. RESULTADOS	138
4.1. Análisis Descriptivo de la serie	138
4.2. Relación entre la edad de diagnostico y antecedentes familiares conocidos	166
4.3. Relación entre la edad de diagnóstico y la forma de presentación	169
4.4. Relación entre edad de diagnóstico y morfología	171
4.5. Relación entre morfología y forma de presentación	172
4.6. Relación entre estadio diagnóstico y enucleación	173
4.7. Relación entre siembras vítreas y enucleación	176
4.8. Relación entre tratamiento recibido y enucleación posterior	177
4.9. Análisis Descriptivo del periodo libre de enucleación	190
4.10. Análisis de periodo de seguimiento libre de enucleación según el tratamiento recibido	194
4.11. Relación entre el desprendimiento de retina y enucleación	196
4.12. Pronóstico visual según el tratamiento recibido	198
4.13. Relación entre edad de diagnóstico y bilateralización tardía	199
4.14. Estudio descriptivo y analítico de los pacientes con estudio genético. Sensibilidad del análisis genético	203
4.14.1. Lateralidad del proceso	203
4.14.2. Tipo de alteración genética. A. descriptivo.	204

4.14.3. Relación entre el tipo alt. gen. y enucleación	205
4.14.4. Relación entre el tipo alt. gen. y AAFF	207
4.14.5. Relación entre el tipo alt. gen. y lateralidad	208
4.14.6. Relación entre el tipo alt. gen. y supervivencia del Globo ocular	211
4.14.7. Localización de la alteración genética identificada	213
4.14.8. Relación entre el tipo alt. gen. y su localización en El gen RB1	216
4.14.9. Edad de diagnóstico y alteración en la línea germinal	218
4.15. Análisis de los resultados del estudio genético de los pacientes quimiorresistentes	221
4.16. Relación entre la presencia de siembras vítreas y la Identificación de alteración genética en la línea germinal	227
4.17. Resultados del análisis genético intratumoral	231
4.18. Estudio genético del retinoblastoma trilateral	234
V. DISCUSION	240
5.1. Relación entre la edad de diagnóstico y antecedentes familiares conocidos	240
5.2. Relación entre la edad de diagnóstico y la forma de presentación	240
5.3. Relación entre edad de diagnóstico y morfología	241
5.4. Relación entre morfología y forma de presentación	241
5.5. Relación entre estadio diagnóstico y enucleación	241
5.6. Relación entre siembras vítreas y enucleación	242
5.7. Relación entre tratamiento recibido y enucleación posterior	242
5.8. Análisis Descriptivo del periodo libre de enucleación	245
5.9.	
5.10. Relación entre el desprendimiento de retina y enucleación	247
5.11. Pronóstico visual según el tratamiento recibido	247
5.12. Relación entre edad de diagnóstico y bilateralización tardía	248
5.13. Estudio descriptivo y analítico de los pacientes con estudio genético. Sensibilidad del análisis genético	249
5.14. Estudio genético de los pacientes quimiorresistentes	252

5.15. Relación entre la presencia de siembras vítreas y la identificación de alteración genética en la línea germinal	253
5.16. Análisis genético intratumoral	253
5.17. Estudio genético del retinoblastoma trilateral	254
VI. CONCLUSIONES	257
BIBLIOGRAFÍA	261

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quería agradecer al Doctor Abelairas su inestimable ayuda en la realización de este trabajo, no solo por su colaboración y su absoluta disponibilidad sino también por ser un modelo de dedicación y buen hacer, por su paciencia y su ánimo. Es para mí un compañero, un modelo y un amigo. Es una suerte conocer personas con ésta pasión y ésta vocación por la oftalmología, que entienden la enfermedad como algo que podemos superar trabajando en equipo y con un enfoque multidisciplinario. Infatigable y justo.

Me considero una afortunada habiendo tenido la posibilidad de trabajar junto a ellos, los adjuntos del departamento de oftalmología infantil del Hospital La Paz. En los momentos de desilusión pensar en luchadores como ellos me ayuda a seguir esperando a que pase el chaparrón.

También quiero agradecer su ayuda al Doctor Javier Alonso, sobretodo por su rigurosidad, y porque sin su trabajo de años, el mío nunca hubiera visto la luz.

Y por su puesto a mi familia, por el continuo ánimo; a mis hijos por el tiempo que les he robado y a mi marido por el tiempo que me ha regalado, y porque sin su constancia en hacerme aprovechar los “tiempos que se pierden” tampoco hubiera terminado.

Este trabajo es de todos, y una cosa me ha quedado clara, “que la mente apretada discurre que rabia”.

PRÓLOGO

INTRODUCCIÓN

I. EPIDEMIOLOGÍA

El retinoblastoma es el tumor intraocular primario más frecuente en la infancia;¹ supone el 1-3% de todos los tumores pediátricos.

Determinar la incidencia real del retinoblastoma presenta muchas dificultades. Por un lado la incidencia del retinoblastoma se cuantifica (en los países desarrollados) por casos diagnosticados, en un periodo de vida, por recién nacidos vivos en ese periodo, lo cual no es del todo correcto, aunque es equivalente en todos los estudios, por lo que las cifras son comparables entre sí. Por otro lado, en la mayoría de los países, entre los que se encuentra el nuestro, no se dispone de un registro global de tumores, por lo que la incidencia real es, en realidad, desconocida. Ejemplos de países con un registro unificado de tumores son Nueva Zelanda², Australia³ y Suecia⁴, donde la incidencia global de retinoblastoma oscila entre 1/17000 y 1/18000 habitantes.

Lo más riguroso para el estudio epidemiológico sería el estudio de cohortes por nacimiento, que minimiza el efecto de la variabilidad de la edad al diagnóstico, y así la tasa de incidencia es menos fluctuante que los estudios basados en el año de diagnóstico.

En Norteamérica el retinoblastoma constituye el sexto tumor sólido de la infancia por su frecuencia. Su incidencia varía entre 1/14.000 y 1/34.000 recién nacidos vivos.⁵⁻⁷ Considerando los 250 casos nuevos anuales que se diagnostican en Estados Unidos, equivaldría a 1/15.000 nacidos vivos, y 1/12500 nacimientos; de forma similar, en un estudio basado en el registro del Texas Department of Health, donde el cálculo se realiza por recién nacido vivo, la incidencia es de 1/15000 recién nacidos vivos.⁸

Recientemente se ha publicado un estudio acerca de la incidencia de retinoblastomas ajustado por edad en Estados Unidos a lo largo de los últimos 30 años, se ha utilizado como base el registro de tumores en la infancia del (SEER) *programme database* desde 1975 a 2004. De este estudio se desprende que la incidencia es de 11.8 casos por millón de niños entre los 0 y los 4 años de edad (Intervalo de confianza del 95% (IC95%), 10.9-12.8), lo que representa 6.1% de todos los tumores de la infancia en

menores de 5 años. Además no se observan diferencias de incidencia a lo largo del tiempo.⁹

En Méjico se ha encontrado la mayor incidencia de retinoblastoma en la región de Chiapas, donde ocupa el 21,8% de todos los tumores de la infancia. Los cálculos se realizaron utilizando el registro de tumores del Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS entre 1996 y 2002.¹⁰

La incidencia anual en Gales se ha situado en 8 por millón, en niños menores de 6 años, por año, lo que le hace similar a otros registros de países desarrollados.¹¹

Otro estudio reciente de análisis de cohortes que valora la incidencia de retinoblastomas en el Norte de Europa, utilizando datos de entre 1958 y 1998, determina una incidencia de 11.8 (IC 95%, 10.5-13.1) y 11.2 (IC95%, 9.4-13.0) valores por millón de niños menores de 5 años de edad, en Suecia y Finlandia respectivamente, equivalente a 6.7 (95% CI, 5.9-7.5) y 6.2 (95% CI, 5.3-7.2) por 100 000 nacidos vivos, respectivamente. La incidencia también se mantiene estable en el Norte de Europa a lo largo de los últimos 30 años.¹²

Para algunos autores la tasa de incidencia estaría en aumento debido a la mayor supervivencia de los pacientes con la forma hereditaria, dado que en los últimos años ha variado la prevalencia relativa entre los tumores heredables y los no heredables, lo cual constituiría un sesgo dependiente del modo en que se hace la medición.

En los países tropicales y subtropicales en vías de desarrollo (África Central, Sur de Asia y América Central) el retinoblastoma es uno de los tumores sólidos de la infancia más frecuentes, ocupando en algunos casos el primer puesto¹³⁻²⁷, y esto es debido a la diferencia de incidencia de tumores unilaterales no heredables respecto a los países desarrollados.

La incidencia de tumores hereditarios es bastante uniforme entre las distintas poblaciones del mundo, por lo que el ambiente influye poco en el desarrollo de estos casos.^{2, 28-29} Sin embargo, hay una marcada diferencia geográfica en la incidencia de tumores unilaterales no heredables, es decir, los casos esporádicos. Se baraja la posibilidad de identificar una posible asociación con una etiología vírica (HPV) en los países tropicales y subtropicales,³⁰⁻³¹ también se ha puesto en relación con una dieta carente en frutas y verduras en las gestantes.³² Aunque ambos factores deben ser valorados de forma más detallada.

La influencia de las radiaciones ionizantes en la incidencia tumoral es algo más controvertido, para algunos autores el aumento de la exposición aumentaría el número de casos,³³ sin embargo para otros la exposición prenatal a radiaciones diagnósticas no aumentaría el riesgo de retinoblastoma³⁴ y estudios más recientes ni si quiera muestran tal incremento.^{12, 35-36}

El retinoblastoma no muestra predilección según sexo, raza o variación estacional,^{35,37} aunque hay autores que encuentran una mayor incidencia en algunas poblaciones.³⁸

En cuanto a la exposición prenatal al virus papiloma humano 16/18,³⁹ se ha relacionado con alteraciones en la proteína codificada por el gen RB1.⁴⁰

Recientemente se ha relacionado el desarrollo de retinoblastoma esporádico con el antecedente de fertilización in vitro.⁴¹⁻⁴²

La edad paterna avanzada está asociada inequívocamente con la aparición de nuevas mutaciones esporádicas en la línea germinal en el desarrollo de tumores esporádicos heredables^{37, 43-47}; en el 80-85% de estos casos estudiados, el alelo mutado es el que proviene del padre mientras que el alelo normal o materno se alteraría por un error cromosómico en el proceso de mitosis.⁴⁵ De lo cual se desprende que las mutaciones de novo en la línea germinal del RB suceden con más frecuencia en la espermatogénesis que en la ovogénesis.

El aumento en la incidencia de tumores de distinta estirpe en familiares de pacientes con retinoblastoma está demostrado,⁴⁸ igual que sucede con otros tumores sólidos de la infancia.

El retinoblastoma se presenta de forma unilateral en el 65-80% de pacientes y bilateral en el 20-35% restante. La forma bilateral suele presentar tumores multifocales. La bilateralidad puede ser simultánea o secuencial, incluso tras un lapso prolongado de tiempo.⁴⁹

El retinoblastoma puede surgir esporádicamente, sin historia familiar previa, o presentarse como un tumor familiar; el 5-10% de casos tienen antecedentes familiares y el 90-95% son esporádicos. La edad media de diagnóstico, sin historia familiar previa, es de 25 meses para los casos unilaterales y de 15 meses en los bilaterales; con historia familiar el diagnóstico es más precoz, con un pico bimodal a los 3 y 6 meses.⁵⁰ El 96.5% de los casos familiares se diagnostican antes de los 24 meses de edad⁵¹ Los

pacientes diagnosticados antes del año de vida tienen mayor riesgo de desarrollar nuevos tumores intraoculares en cualquiera de los dos ojos: aparecen en el 58% de pacientes si el diagnóstico se hace antes de los 3 meses, 39% si se realiza entre los 3 y 6 meses y 17% si se diagnostican entre los 6 y 9 meses de edad.⁵²

Antes de los 5 años de edad se han diagnosticado el 90% de casos, aunque pueden aparecer retinoblastomas en la edad adulta.⁵³⁻⁵⁴ También se han reportado casos en los que se ha efectuado un diagnóstico prenatal.⁵⁵

Se han descrito múltiples anomalías fenotípicas asociadas al retinoblastoma que se engloban en el “síndrome de delección 13q14”: microcefalia, puente nasal ancho y prominente, hipertelorismo, dismorfias de la línea media facial, etc.⁵⁶⁻⁵⁷ Suelen ser mínimas, y se identifican en el 0.05% de pacientes.⁵⁸ Puede asociarse a retraso mental, aunque la mayoría de pacientes con retinoblastoma no lo presentan. En ocasiones estos rasgos dismórficos pueden ayudar al diagnóstico precoz del retinoblastoma.⁵⁹

II. CLÍNICA

En los países desarrollados, el diagnóstico precoz permite detectar el retinoblastoma cuando está limitado a una localización intraocular. Pese a ello, el grupo V de Reese-Ellsworth es el estadio hallado con mayor frecuencia a cualquier edad de presentación, tanto en casos unilaterales como bilaterales.^{50, 60} En los países en vías de desarrollo suele diagnosticarse en etapas tardías, es decir, cuando el tumor extendido al nervio óptico, invade la órbita o incluso presenta metástasis.

Los signos y síntomas de presentación están determinados por la localización y la extensión del tumor. La leucocoria es el signo de presentación más frecuente (56%), seguido del estrabismo (23.6%), el déficit visual (7.7%) y la historia familiar (6.8%).⁵¹ La leucocoria consiste en un reflejo pupilar blanquecino originado por el tumor protruyendo en el vítreo en los retinoblastomas endofíticos, o por la retina desprendida tras el cristalino en los tumores de crecimiento exofítico. La presencia de hifema, hipopion, inflamación ocular, anisocoria o celulitis orbitaria es mucho más rara y suele presentarse en tumores muy avanzados.⁶¹⁻⁶⁴

Un tumor de 3 mm de diámetro en la base de implantación puede debutar con leucocoria, siempre y cuando la pupila esté midriática, si la pupila es pequeña la leucocoria solo se pone de manifiesto cuando hay tumores grandes.⁶⁵ La identificación de la leucocoria está directamente relacionada con el diámetro de la pupila en el momento del diagnóstico, y éste es muy variable, por eso hace dudar tanto a los padres como al facultativo. Una foto con flash aumenta mucho la sensibilidad en el diagnóstico. Las normas para la valoración del reflejo de fondo por los pediatras según la Academia Americana de Pediatría (mayo 2002) “red testing reflex”, incluidas en www.aap.org incluye los siguientes pasos:

1. Luz ambiental en penumbra (y luz tenue en el oftalmoscopio directo).
2. Reflejo simétrico, es decir, valorar ambas pupilas al mismo tiempo, no de forma secuencial
3. Dilatar las pupilas y volver a valorar el reflejo de fondo. En caso de asimetría, remitir al paciente directamente al oftalmólogo.

En el caso de un debut con estrabismo, suele tratarse de tumores localizados en la fovea o próximos a ésta, que producen una notable disminución de la agudeza visual. Puede deberse tanto a la afectación directa de la masa tumoral o del líquido subretiniano

asociado al tumor. Cuando la reducción de la agudeza visual se debe a la afectación de la macula sin que se destruya la estructura anatómica de la fovea, ésta es, al menos parcialmente recuperable después de que se concluya el tratamiento de la lesión.

Siempre que se presente un estrabismo en los primeros seis meses de vida se requiere una exploración exhaustiva e inmediata del fondo del ojo para descartar un posible retinoblastoma.

La leucocoria se correlaciona con un estadio V de Reese-Ellsworth ($p < 0.005$); y el estrabismo con la presencia de tumores maculares o desprendimiento de retina macular ($p < 0.005$), apareciendo esotropía en una relación 2:1 ó 1:1 frente a exotropía, cuando la relación normal en niños con estrabismo suele ser 3:1.⁵¹

Los pacientes que debutan con leucocoria presentan un peor pronóstico de supervivencia ocular, respecto a los que lo hacen con estrabismo. De los pacientes que debutan con leucocoria conservan el globo ocular doce meses tras el diagnóstico el 6% de los casos unilaterales frente al 43% de los bilaterales. Sin embargo, de los pacientes que se diagnostican por la presencia de estrabismo, conservan el globo ocular doce meses después el 23% de los unilaterales y el 53% de los bilaterales. Los pacientes con historia familiar de retinoblastoma, sometidos por ello a exploraciones periódicas, se diagnostican en estadios más precoces (58% son grupo I de Reese-Ellsworth) y la supervivencia ocular es mayor (44% y 69% según sean uni o bilaterales).⁶⁶ La presencia de antecedentes familiares es la primera causa de diagnóstico en los pacientes < 3 meses.⁵²

Otras manifestaciones clínicas de debut de retinoblastoma más infrecuentes son el glaucoma, el deslustramiento corneal, la disminución de agudeza visual o la celulitis orbitaria aséptica.

III. HISTORIA NATURAL

Si asumimos que el diagnóstico de retinoblastoma se hace poco tiempo después de la inactivación del segundo alelo del locus RB1, ésta tendría lugar como tarde en el segundo o tercer año de vida del paciente. Sin embargo, si se consideran ciertas las evidencias de que la deficiencia nutricional materna hace aumentar la incidencia de los casos unilaterales no heredables, se asumiría que todas las mutaciones, también las somáticas, tendrían lugar durante el desarrollo de la vida fetal. Otros factores podrían también ocasionar diferencias en el diagnóstico clínico entre los casos heredables y los no heredables.

Al inicio del desarrollo tumoral, todas las células del tumor microscópico son iguales, todas están formadas a partir de un mismo progenitor o “founder”, presentando las mismas mutaciones genéticas y la misma tasa de crecimiento. Cuando aparece una nueva lesión tumoral esta es redondeada y simétrica u homogénea respecto de la primera, en este momento tan precoz del desarrollo del retinoblastoma, las lesiones parecen ser como colonias en una placa de agar.⁶⁷ Dado que la célula originaria es un retinoblasto “inmortalizado” todos los retinoblastomas están originariamente confinados en la retina.

Hace más de 25 años se tomaban muestras de humor vítreo de ojos con tumores intraoculares, primarios o metastáticos y se evidenció que se inducía la angiogénesis en la membrana alantoidea de pollo, incluso cuando la muestra se había tomado antes de que el tumor fuera clínicamente aparente.⁶⁸ La angiogénesis tumoral es un proceso esencial cuando los tumores van a expandirse, del mismo modo que la limitación en el desarrollo de la vascularización restringe severamente el crecimiento tumoral potencial.

Los retinoblastomas intrarretinianos tienen su crecimiento restringido hasta alcanzar un diámetro de 1-2 mm, hasta entonces pueden nutrirse por difusión de los nutrientes y el oxígeno de los vasos coroideos. A partir de ese tamaño precisan el desarrollo de un proceso de angiogénesis que está regulado a través de un grupo de genes denominado up-regulated growth factor genes y down-regulated angiogénesis inhibitory genes.

Un marcador físico del “turn-on” de la angiogénesis de un tumor concreto puede estimarse a partir del número de vasos nuevos existentes en ese tumor; ese parámetro se denomina densidad vascular tumoral relativa (RTVD) y se cuantifica según los niveles de CD-34, molécula que está presente en el endotelio vascular y que se puede medir con

técnicas histopatológicas en cortes histológicos. Este valor de RTVD está aumentado y presenta una diferencia estadísticamente significativa en los pacientes con tumores intraoculares y metástasis extraoculares.⁶⁹⁻⁷⁰ También se ha demostrado que presenta valores aumentados en tumores que han invadido la coroides o el nervio óptico.⁶⁹

Las células normales se adhieren a las células vecinas y a la matriz extracelular a través de moléculas especiales presentes en la membrana celular, limitando así su hiperplasia. La pérdida de estas moléculas también conlleva un mayor riesgo de progresión tumoral. Otro gen supresor tumoral que aparece mutado en tumores en un estadio avanzado es el PTEN; si una copia normal exógena de este gen es introducida dentro de una célula tumoral, su producto puede revertir esa capacidad de la célula tumoral de perder el anclaje con las células que la rodean. Los métodos de control que inducen a una célula normal a la apoptosis o muerte celular programada se anulan cuando la célula pierde la adhesión con la matriz extracelular y da lugar a una progresión en la enfermedad, porque la célula pierde “referencias” y continúa con una replicación anormal.

Los retinoblastomas quedan confinados a la retina mientras no aparezcan las mutaciones que les permitan crecer perdiendo el anclaje a la matriz extracelular (como son la pérdida del gen supresor PTEN). Con las suficientes mitosis se obtendrán las mutaciones precisas para que el tumor gane esa “independencia”. En el ojo la pérdida de esa adhesión es uno de los sucesos necesarios que pueden dar la capacidad de emerger a las siembras vítreas o subretinianas. Cuando estas siembras están presentes el tumor se clasifica dentro del grupo C (de la clasificación internacional), y constituyen microambientes donde el tumor se desarrolla en situación de bajo aporte de oxígeno y de nutrientes. El tamaño y la estructura de estas siembras vítreas tempranas está delimitado al desarrollo de un núcleo central necrótico, rodeado de dos hileras de células, cuando progresan se desarrollan masas grandes y avasculares donde las células tumorales se mantienen en condiciones de mínimo aporte de oxígeno. En los estadios D y E es frecuente encontrar grandes masas tumorales avasculares.

El crecimiento tumoral incontrolado o continuo llega a la destrucción completa de la retina, desarrollando hemorragias vítreas o subretinianas y glaucoma de ángulo cerrado a través de tres mecanismos posibles; bien por la presión directa del tumor sobre el diafragma del iris, por la ocupación del ángulo por sangre o células tumorales o por la neovascularización del ángulo iridocorneal.

El tumor también puede invadir el nervio óptico y crecer hacia el quiasma y la cavidad intracraneal, con menor frecuencia penetra en la esclera a través de los vasos y los nervios del globo ocular, llegando incluso a infiltrar la orbita. Incluso en determinados casos puede crecer a través del limbo y expandirse como una masa en la superficie ocular a través del espacio interpalpebral.

Lo cierto es que las metástasis se diagnostican con muy poca frecuencia, dado que la identificación tumoral suele ser relativamente precoz en la mayoría de los casos y no hay margen para que el tumor crezca lo suficiente o adquiera las mutaciones precisas para que las células tumorales adquieran la capacidad de metastatizar, que no están presentes en las células derivadas directamente del “founder”.

El acceso al torrente sanguíneo también es un factor necesario pero no suficiente para que se desarrollen las metástasis; las células tumorales adquieren la capacidad de digerir y moverse a través de la matriz extracelular,⁷¹ así como de penetrar a través de la membrana basal, la capa adventicia y el endotelio de la pared vascular. Además de esto, para poder salir del torrente circulatorio las células tumorales tienen que adquirir capacidades que les permitan adherirse al endotelio vascular, atravesar de nuevo la pared vascular y sobrevivir en el espacio extravascular, reclutar el aporte sanguíneo necesario y establecer su propio microambiente para poder seguir desarrollándose.

Como todas esas mutaciones espontáneas se irían adquiriendo de forma paulatina, según se produzcan las sucesivas mitosis; esas metástasis sólo se producirían en el caso de tumores de muy larga evolución en los que además fallaran todos los tratamientos de control tumoral.

En los países desarrollados es altamente improbable identificar un caso de retinoblastoma que llegue a desarrollar metástasis; en Alemania, por ejemplo, en el Essen Retinoblastoma Center, entre 1968 y 1993 se identificaron solo 18 casos con desarrollo de metástasis.⁷⁰

El riesgo de metástasis se debe considerar hoy en día y en nuestro medio en pacientes que no tengan respuesta a los tratamientos aplicados (valorado como progresión tumoral o recidivas) durante un periodo de seguimiento de mas de 6-12 meses.

IV. DIAGNÓSTICO

El primer signo de presentación es detectado por el entorno familiar en el 75% de los casos. Entre éste primer signo y el diagnóstico de retinoblastoma transcurren 1.5 meses de media en los casos unilaterales y 2.25 meses en los bilaterales, observándose una tendencia a una menor supervivencia ocular en los pacientes con retinoblastoma bilateral y diagnóstico retrasado. El tiempo medio de retraso es 2.5 meses si el signo de presentación es el estrabismo y 1.5 meses si es la leucocoria.⁷²⁻⁷³

El diagnóstico del retinoblastoma es fundamentalmente oftalmoscópico. El examen físico general suele ser normal, excepto en los escasos pacientes con rasgos dismórficos englobados en el “síndrome de delección 13q14”.⁵⁶⁻⁵⁷ Se puede buscar anomalías fenotípicas que nos permitan determinar si hay sospecha de síndrome de delección del cromosoma 13q, como son las orejas rotadas y de implantación baja, el pliegue simiesco de las manos, pulgares anchos, hipertelorismo y telecanto, etc.

Durante la primera consulta con el oftalmólogo se realiza una exploración clínica y, por su accesibilidad, una ecografía en modo B, si se demuestra calcio intralesional, porque se evidencia una sombra acústica posterior, dado el valor predictivo positivo de la prueba podría omitirse el estudio con TAC.⁶⁷

El examen con oftalmoscopia indirecta de la retina de ambos ojos constituye la base del diagnóstico. Debe realizarse con dilatación pupilar y una adecuada inmovilización del paciente.

El examen bajo anestesia general es una técnica necesaria para hacer una buena exploración y elaborar el plan terapéutico más adecuado. Antes se reservaba para los niños cuya edad no permitía una correcta manipulación y exploración, pero se realiza cada vez con mayor frecuencia.⁷⁴ Siempre que es posible se hace una videorretinografía.⁶⁵ El empleo del Retcam facilita no sólo el diagnóstico sino sobretodo el seguimiento y la valoración de la respuesta al tratamiento de estos pacientes.

Debe examinarse tanto la cámara anterior como la posterior, lo más adecuado es utilizar una lámpara de hendidura manual, es importante valorar también la presión intraocular así como medir el diámetro corneal y la longitud axial ocular.

Es importante representar gráficamente las lesiones, teniendo en cuenta su localización, tamaño y distancia a la foveola, al ecuador, la ora serrata y el nervio óptico. Hay que ser riguroso, sobretodo en cuanto al tamaño, poniéndolo en relación con el tamaño relativo de la papila. Más aún cuando no se dispone de un método mas objetivo de valoración.

Una técnica valiosísima en éste campo sería el uso pautado del Retcam ⁷⁵, que nos ofrece una imagen digital de ángulo amplio de la retina, constituyendo un método objetivo para la localización y valoración tumoral. Cuando no se dispone de ésa posibilidad puede resultar útil el empleo de angiografía fluoresceínica para valorar la posible neovascularización del iris en caso de glaucoma o desprendimiento de retina crónico ⁷⁶. También se emplea para valorar si una zona ya tratada y dudosa presenta una recurrencia, que aparecería como hiperfluorescente. También el diagnostico precoz de “supuesto retinoma” puede ser facilitado por el empleo de la angiografía fluoresceínica (una lesion nueva, en un ojo no tratado, similar a una lesion en regresión tipo 2 o 3 y que no se realce con fluoresceína). Durante la exploración bajo anestesia se realiza habitualmente también una ecografía.

La determinación de LDH y otras enzimas en humor acuoso actualmente sólo tiene interés cuando el diagnóstico clínico y radiológico es muy dudoso; ⁷⁷ no suele realizarse. También se ha demostrado un aumento en los niveles de apo B, aunque éste hallazgo no tiene valor diagnóstico. ⁷⁸

Recientemente se ha identificado el factor de crecimiento básico de los fibroblastos no sólo como un factor de crecimiento sino también como precursor en el desarrollo de células neurales y según la isoforma en la que se presente, parece comportarse como un marcador de quimiorresistencia e invasividad tumoral. ⁷⁹

La biopsia-aspiración con aguja fina (PAAF) y la vitrectomía diagnóstica en principio están contraindicadas, ⁸⁰ dado el riesgo de diseminación tumoral. Su utilidad está muy limitada, sólo debe llevarse a cabo por personas muy expertas ⁸¹ y sólo en los casos en los que halla tantas dudas que de otro modo no sea posible llegar al diagnostico, por ejemplo, en los casos que debutan como una uveítis y no es posible descartar con seguridad la existencia de un retinoblastoma subyacente ⁸², sin embargo cuando el oftalmólogo esta muy entrenado puede diagnosticar también los casos atípicos correctamente sin necesidad de PAAF.

La biomicroscopía especular corneal, valora el estado del endotelio corneal, y podría discriminar entre precipitados corneales y siembras de retinoblastoma,⁸³ en el segundo de los casos suelen presentar un aspecto más oscuro y refringente con alta densidad sobre el endotelio corneal, mientras que los precipitados frescos presentan reflejos brillantes, y los residuales tienen un anillo periférico oscuro.

La biomicroscopía ultrasónica puede ayudar en el diagnóstico diferencial de los casos con extensión a cuerpo ciliar y cámara anterior.⁸⁴

Las técnicas de imagen tienen especial importancia a la hora de realizar el diagnóstico diferencial, determinar el tamaño tumoral, detectar la presencia de calcio intratumoral, valorar la diseminación hacia coroides, esclera, nervio óptico y órbita así como la presencia de metástasis y evaluar la respuesta al tratamiento conservador.

También muestran una gran concordancia con los estudios histopatológicos; esta correlación tiene una importancia fundamental para establecer el estadiaje tumoral y elegir la terapia adecuada, especialmente con las pautas actuales de tratamiento que persiguen la preservación del órgano visual. La detección de características radiológicas de riesgo asociado a metástasis permite adoptar pautas de quimioprofilaxis.⁸⁵⁻⁸⁶

4.1. TÉCNICAS DE IMAGEN.

4.1.1. Ecografía

En 1973 Coleman y colaboradores describieron la utilidad de la ecografía en el diagnóstico del retinoblastoma.⁸⁷⁻⁸⁸ Dos años después se describió que permitía diferenciar áreas sólidas y quísticas intralesionales.⁸⁹

El estudio ecográfico tiene una fiabilidad diagnóstica alta, detectando tumores incluso de 2 mm de diámetro y la presencia de calcio en un 85-90% de los casos.⁹⁰ El retinoblastoma suele aparecer como una masa única o múltiple, heterogénea, con presencia de calcio.⁹¹ El estudio con doppler permite detectar flujo vascular y ayuda en el diagnóstico diferencial con la retinopatía del prematuro, la enfermedad de Coats o hemorragias vítreas evolucionadas, en las que no aparece circulación.⁹²

Es útil para valorar la respuesta al tratamiento; poniendo de manifiesto la disminución del tamaño tumoral, el aumento del porcentaje de calcificación y la disminución de la vascularización, que indican una respuesta favorable.

La utilidad de la ecografía únicamente está limitada en el estudio de retinoblastomas del grupo de los atípicos, que son tumores habitualmente sin calcio y sin áreas de necrosis. Si los ultrasonidos no son capaces de identificar calcio, incluso en la exploración bajo anestesia, lo correcto es hacer una tomografía computerizada (TC) para hacer un diagnóstico correcto.⁶⁷

La órbita tampoco es una estructura fácilmente valorable por ecografía, por ejemplo, en los casos enucleados los implantes ocultos pueden localizarse en lugares de segundas calcificaciones,⁹³ que son difícilmente valorables con los ultrasonidos.

Se está evaluando actualmente la utilidad de la ecografía en tres dimensiones para valorar los retinoblastomas de nuevo diagnóstico.⁹⁴

La ecografía también puede servir en el diagnóstico prenatal del retinoblastoma.^{55, 95}

4.1.2. Tomografía Computerizada y Resonancia Magnética.

Ambas técnicas diagnósticas son útiles para diagnosticar tanto la extensión de las recurrencias, como la extensión extraocular y la aparición de segundos tumores primarios.⁹⁶

La TC permite delimitar la masa tumoral y es la prueba más sensible para detectar calcificaciones (sensibilidad superior al 90%);⁹⁷ también permite estudiar el nervio óptico, la órbita y la posible extensión intracraneal del tumor.

La TC helicoidal permite reducir la exposición y el tiempo de estudio, evitando la anestesia en muchos casos.⁹⁸ La presencia de calcio intraocular sugiere el diagnóstico de retinoblastoma, pero su ausencia no lo descarta con seguridad.

Los hallazgos típicos en la exploración con TAC han sido descritos.⁹⁹ Todos los tumores exofíticos presentan calcificaciones, que aparecen como una masa única o con varios focos y en todos los casos hay realce con el gadolinio en el tejido blando tumoral. Otros pseudoretinoblastomas que pueden presentar calcificación lo hacen siguiendo las estructuras normales, son calcificaciones distróficas, cuyo significado es disrupción tisular o ptisis bulbi.

Más del 90% de retinoblastomas presentan calcificaciones de aspecto variable en la TC, sin embargo la calcificación del componente extraocular, cuando lo hay, es rara. El estudio con contraste delimita mejor la masa tumoral y permite identificar la extensión orbitaria e intracraneal.

La resonancia magnética (RM) es menos sensible para el diagnóstico de calcificaciones, pero tiene una calidad superior para diferenciar retinoblastomas sin calcio de otras entidades como son la enfermedad de Coats, la toxocariasis ocular o la persistencia de la vasculatura fetal, así como para valorar la extensión tumoral a las cubiertas oculares y a distancia.¹⁰⁰⁻¹⁰¹ Debe realizarse con inyección de contraste e incluyendo secuencias de supresión grasa. Tiene mayor sensibilidad que la TC para valorar la extensión extraocular o la invasión del nervio óptico así como para explorar la región de la glándula pineal, resultando casi imprescindible para identificar un posible retinoblastoma trilateral, entidad descrita por primera vez en 1983.¹⁰²⁻¹⁰³ También es sensible para identificar posibles siembras subaracnoideas.

Es aconsejable tener una valoración con RM antes de explorar al niño bajo anestesia, pero no es imprescindible. La RM permite determinar el tamaño tumoral con gran precisión, diferenciando muy bien el tumor del líquido subretiniano.¹⁰⁴ El grado de extensión tumoral se valora sobre todo tras la administración de gadolinio intravenoso.

La exploración con RM, a diferencia de la TC, no expone al paciente a radiaciones ionizantes, lo cual es importante en todos los casos, y, especialmente en los casos heredables o con síndrome de predisposición al cáncer

La RM se considera el método más adecuado para valorar la respuesta al tratamiento conservador, dado que detecta con mayor sensibilidad que ninguna otra prueba la presencia de tejido tumoral activo, las hemorragias y desprendimiento de retina asociado y permite cuantificar con precisión la reducción del tamaño tumoral.

Ninguno de los dos métodos, la TC y la RM, son eficaces en la valoración de la invasión coroidea y la siembra vítrea.¹⁰⁵

4.2. DISEMINACIÓN

El retinoblastoma puede diseminarse por varias vías,¹⁰⁶ aunque principalmente lo hace a través del nervio óptico y coroides:

- Invasión del nervio óptico: la lámina cribosa ofrece cierta resistencia y el tumor crece inicialmente con lentitud, una vez sobrepasada ésta, crece con más facilidad y puede extenderse a lo largo de los axones directamente hacia el

cerebro. El tumor también puede atravesar la piamadre hacia el espacio subaracnoideo de la vaina del nervio óptico y llegar al sistema nervioso central por el líquido cefalorraquídeo o puede extenderse a la órbita acompañando a los vasos centrales de la retina al nivel en que éstos atraviesan la vaina del nervio óptico.¹⁰⁷

La diseminación intracraneal a través del nervio óptico o el espacio subaracnoideo es la causa de la mayoría de muertes por retinoblastoma.

Se ha descrito en el 29% de ojos enucleados.¹⁰⁷⁻¹⁰⁸ Conlleva un mal pronóstico,¹⁰⁹ con una mortalidad asociada que depende del grado de invasión: 29% si se afecta la lámina cribosa, 42% si invade la porción retrolaminar y 78% si se extiende al margen quirúrgico.¹⁰⁷ En otra serie el riesgo de metástasis a 5 años es del 13% si no hay afectación del margen quirúrgico, incrementándose al 67% en caso contrario.¹¹⁰

Cuando no hay infiltración la supervivencia es cercana al 100%.¹⁰⁸ El patrón de crecimiento exofítico, la presión intraocular elevada y un grosor tumoral ≥ 15 mm se asocian significativamente con la presencia de infiltración del nervio óptico.¹⁰⁸

- Invasión coroidea. Se ha descrito en el 23-42% de los ojos enucleados.¹¹¹ La presión intraocular elevada, la presencia de neovasos iridianos, la invasión del nervio óptico y un patrón histopatológico pobremente diferenciado se asocian estadísticamente con su presencia.¹¹² La invasión coroidea masiva ($>25\%$) se ha relacionado con el riesgo de enfermedad orbitaria y metástasis, señalándose un 8% de riesgo de metástasis a los 5 años.¹¹⁰ Algunos autores no encuentran un riesgo significativo de metástasis si se diferencia la invasión coroidea de la afectación del nervio óptico y no recomiendan quimioprofilaxis en caso de invasión coroidea aislada;¹¹²⁻¹¹³ otros autores sí observan una asociación estadísticamente significativa con el riesgo de metástasis.¹¹¹

En los casos que presentan afectación extraescleral microscópica, demostrada por el estudio histopatológico, que se ha descrito en el 8% de ojos enucleados en alguna serie,¹¹¹ se considera un factor de riesgo de metástasis estadísticamente significativo.

- Diseminación hematológica: se ha descrito hasta en un 7% de pacientes.¹¹⁰ Puede llevarse a cabo a través de la circulación coroidea. Las metástasis desarrolladas a

través de la diseminación hematológica generalmente asientan en cerebro, hueso, médula ósea, hígado y otros órganos.

- Diseminación linfática: es mucho menos frecuente, ya que el globo ocular y la órbita carecen de drenaje linfático, pero los tumores que afectan el cuerpo ciliar y el iris pueden extenderse a la conjuntiva y los párpados, que a su vez drenan a los ganglios preauriculares y submandibulares.⁶¹
- La extensión directa orbitaria a través de los vasos emisarios esclerales, es otra vía de progresión tumoral posible.

4.3. DIAGNÓSTICO DE METÁSTASIS

Hasta finales de los ochenta a todos los pacientes se les practicaba estudio de extensión utilizando punción de médula ósea y punción lumbar para estudio del líquido cefalorraquídeo,¹¹⁴⁻¹¹⁵ así se demostró que en todos los casos las pruebas resultaban normales salvo que hubiera sospecha por alteraciones clínicas o radiológicas de extensión tumoral previa; así que sólo deben practicarse en los casos en los que ya se sospeche la extensión extraocular o la metástasis.⁶⁷

La aplicación del protocolo para estudio de metástasis sólo debe aplicarse cuando halla una sospecha fundada de metástasis; los síntomas más frecuentes son la anorexia o la pérdida de peso, los vómitos o la cefalea, y los signos a tener en cuenta son el empeoramiento neurológico, las masas orbitarias o en otra localización y la anemia.

La extensión a través del espacio subaracnoideo puede desarrollar incluso metástasis en la órbita contralateral.¹¹⁶

Para una buena práctica clínica no debe hacerse estudio de extensión tumoral metastásica de forma indiscriminada a todos los pacientes en el momento del diagnóstico inicial, únicamente se debe practicar en los pacientes en los que halla alteraciones en la neuroimagen o se evidencie una órbita patológica en un ojo previamente enucleado.

En los casos en los que el retinoblastoma debuta como una celulitis orbitaria aséptica, con un tumor intraocular masivo con necrosis y hemorragia, el radiólogo debe examinar con especial cuidado el nervio óptico, por el edema perineural que se asocia. Asimismo el estudio de extensión metastásica debe retrasarse dos o tres días, hasta que

se halla empezado la pauta de tratamiento con corticoides sistémicos que reduce todos esos posibles artefactos producidos por la inflamación, y es entonces cuando puede valorarse con fiabilidad la posible afectación del nervio óptico. Así, muchos de esos casos se ahorrarán una enucleación primaria en un primer momento.⁶²

En los casos con una clara sospecha de extensión extraocular se debe practicar además del análisis de líquido cefalorraquídeo y de medula ósea, que se debe realizar en varias localizaciones simultáneamente, normalmente se toman muestras de la cresta iliaca, también se debe realizar una TC ósea de rastreo completo.⁶⁷

4.4. RETINOBLASTOMA EXTRAOCULAR (ORBITARIO)

Cuando el diagnóstico del retinoblastoma es tardío hay que tener en cuenta una posible extensión a través de las cubiertas oculares hacia la órbita, los ganglios linfáticos o una probable extensión metastásica. El riesgo depende de la edad del paciente así como del tiempo de latencia desde que se iniciaron los síntomas. En los países en vías de desarrollo, donde el acceso a la atención sanitaria no es universal muchos retinoblastomas siguen diagnosticándose en éste estadio. Chantada y colaboradores han planteado como tratamiento de elección en estos casos, en lugar de una exenteración primaria, la enucleación acompañada de quimioterapia primaria y radioterapia orbitaria. En Londres la pauta que se utiliza es la quimioterapia sistémica y radioterapia orbitaria junto con biopsia excisional del tumor. Otros, en cambio, utilizan la biopsia incisional, dado que con la quimioterapia el tamaño del tumor se ve muy reducido y la biopsia excisional tiene mayor riesgo quirúrgico.⁶⁷

Los tumores extraoculares suelen tener una buena respuesta a los agentes quimioterápicos, incluso a los fármacos antiguos como son la ciclofosfamida, la vincristina o la doxorubicina.

4.5. EXTENSION EXTRAOCULAR IATROGÉNICA

En ocasiones, el diagnóstico se hace tras una intervención quirúrgica, normalmente porque la forma de presentación ha sido atípica y no se ha hecho correctamente, por presentarse como glaucoma, hifema, hemovítreo, uveítis o una

supuesta endoftalmitis, y se ha realizado una punción de la cámara anterior o una vitrectomía diagnóstico-terapéutica, en éstos casos existe un riesgo sobreañadido de extensión tumoral extraocular a través de la vía de acceso que se utilizó en la cirugía.⁶⁷

Cuando se evidencia o se sospecha fuertemente la extensión extraocular del tumor en el momento del diagnóstico el paciente debe ser tratado con quimioterapia sistémica antes de cualquier cirugía, aunque algunos autores excluyen de ésta regla la biopsia incisional.⁶⁷

4.6. RETINOBLASTOMA TRILATERAL

La asociación de retinoblastoma con un tumor intracraneal en la región de la glándula pineal fue descrito por primera vez por Jacobiec y colaboradores, en 1977.¹²⁴ El término de retinoblastoma trilateral se acuñó para designar a retinoblastomas bilaterales asociados con tumores intracraneales de la línea media.¹²⁵

Originalmente el tumor de localización intracraneal se denominó pinealoblastoma, dado que presentaba células pequeñas, redondeadas y típicas, con poco citoplasma y se localizaba en la región pineal. Hoy en día ha pasado a denominarse PNET (primitive neural ectodermal tumor).¹²⁶ Histológicamente, salvo porque está más vascularizado, es idéntico al meduloblastoma de fosa posterior.¹²⁷

La incidencia de PNET localizados en la pineal de los pacientes con retinoblastoma heredable es de aproximadamente 2-3%, ésta es la incidencia en los pacientes que presentan mutación en el gen RB1, lo que les hace estar predispuestos a desarrollar retinoblastoma.¹²⁵ Aunque en la mayoría de los casos el retinoblastoma es bilateral, se ha descrito algunos casos de retinoblastoma unilateral heredable asociado a PNET.^{126, 128}

Los signos clínicos de los tumores pineales son la fiebre, vómitos, meningismo, cefalea, papiledema bilateral, hidrocefalia o crisis epilépticas.¹²⁹ El diagnóstico del PNET puede preceder, coincidir o secundar al diagnóstico de retinoblastoma.¹²⁵⁻¹²⁷

En la actualidad se consideran retinoblastomas trilaterales no sólo a los que presentan el tumor en la región pineal, sino, en general, en la línea media. Kingston reportó una revisión de 360 pacientes, 12 de los cuales asociaban PNET, 8 localizados en el área pineal y 4 en la región supraselar.¹²⁶

Habitualmente el diagnóstico del tumor trilateral se hace con TC, objetivándose una masa calcificada en la región selar o supraselar que se realza con el contraste. Puede

asociarse con hidrocefalia e incluso puede extenderse a través del agujero de Monro hacia la porción posterior del tercer ventrículo.

En los estudios histológicos se ha descrito la presencia de rosetas en los PNET asociados a retinoblastoma, también se han identificado distintos antígenos comunes en ambos tumores; algunos estudios han demostrado la positividad en ambos tumores de un mismo paciente para la enolasa específica de neuronas (NSE), antígeno S, rodopsina y GFAP (proteína ácida fibrilar glial).

Hay una hipótesis que valora la posibilidad de que esos tumores de línea media tengan su origen en alguna célula vestigio de fotorreceptores, y se apoya en el hecho de que esos tumores pueden presentar diferenciación celular hacia fotorreceptores, “fleuretes” y rosetas de Flexner-Wintersteiner, muy característicos del retinoblastoma.

Este tipo de tumores no tiene un tratamiento efectivo, la supervivencia media tras el diagnóstico de PNET es de 8 meses en los pacientes que asocian retinoblastoma.¹²⁶ La vincristina y la ciclofosfamida parecen tener un efecto beneficioso parcial y temporal.¹²⁹

El empleo de la RM para hacer screening de las lesiones intracraneales de línea media es controvertido, es dudoso que el diagnóstico presintomático alargue la supervivencia. Algunos como Nelson o Ryan proponen un protocolo con RM seriadas para hacer un diagnóstico precoz, sin embargo, dado el escaso beneficio del screening en cuanto a supervivencia, la mayoría de los autores no lo usan de modo rutinario.

El cribaje mediante RM cerebral de los pacientes con retinoblastoma hereditario permite detectarlo más precozmente y parece prolongar la supervivencia del paciente (16 vs. 8 meses, $p = 0.001$), pero esto probablemente sea un sesgo, debido al diagnóstico precoz, dado que no se identifican diferencias estadísticamente significativas en la edad de fallecimiento (36 vs. 37 meses). Todos los pacientes cuyo tumor es mayor de 15 mm fallecen.¹³⁰⁻¹³¹ Su pronóstico es funesto, generalmente debido al desarrollo de metástasis cerebrales, aunque se han descrito respuestas con protocolos similares a los utilizados en el tratamiento de metástasis, incluyendo trasplante autólogo de médula ósea.¹³²⁻¹³³ También se ha descrito una menor incidencia en los pacientes tratados con quimiorreducción, sugiriéndose que ésta podría prevenir o retrasar la aparición del PNET.¹³⁴

4.7. RETINOBLASTOMA EN NIÑOS MAYORES

Un caso especial es el diagnóstico de retinoblastoma en niños mayores. En Estados Unidos alrededor del 90% de los retinoblastomas se diagnostican en pacientes menores de 5 años de edad.⁵⁰ Sin embargo, recientemente se han reportado casos diagnosticados de forma más tardía,¹¹⁷⁻¹²¹ incluso en edad adulta.⁵³ Por un lado se baraja la posibilidad de la persistencia de una célula retiniana embrionaria que sea el origen del tumor⁵³ y por otro lado otra hipótesis considera que se trate realmente de un retinoma¹²² que previamente haya sido silente y no se haya identificado y que con el paso de los años se haya malignizado (lo que ocurre en 1 de cada 17 casos, según Singh).¹²³

El problema con los niños mayores es que es difícil realizar el diagnóstico diferencial, con frecuencia el primer diagnóstico es erróneo o plantea dudas que hacen que el diagnóstico definitivo se retrase. En los niños mayores de 5 años con hemovítreo inexplicado o signos sugestivos y no típicos de endoftalmitis debe considerarse siempre el retinoblastoma como diagnóstico de presunción.⁵⁴

V. CLASIFICACION

La introducción de nuevas técnicas terapéuticas para el retinoblastoma, desde finales de los años 80, ha dado lugar a que las clasificaciones utilizadas clásicamente ya no tengan un valor pronóstico, ni orienten para elegir el tratamiento preciso en cada caso. No son útiles para predecir la viabilidad del globo ocular ni de la capacidad funcional final. Actualmente se está haciendo un importante esfuerzo por encontrar una clasificación útil para la práctica diaria, y varias de ellas se están evaluando, tanto en su utilidad como factor pronóstico como para una posible protocolización terapéutica.⁶⁷

En líneas generales, determinar el estadio de un paciente oncológico implica establecer el grado de extensión anatómica del tumor en su localización primaria y en las metastásicas, si las hubiera. El estadiaje es fundamental para seleccionar el plan terapéutico óptimo para cada paciente, aumenta la posibilidad de curación al identificar metástasis de forma precoz, aporta información para valorar el pronóstico del paciente y es esencial para evaluar los factores que influyen en los resultados de nuevos tratamientos. Por eso es primordial encontrar una clasificación adecuada, es decir, que aporte todo lo anterior.¹³⁵

En el estadiaje del retinoblastoma se han empleado diversas clasificaciones con distinto grado de utilidad. La nomenclatura estandarizada internacional TNM - tumor primario, ganglios linfáticos regionales y metástasis - apenas se ha usado.¹³⁶⁻¹³⁷ Las más utilizadas son las de Reese-Ellsworth¹³⁸ y Essen¹³⁹ para el retinoblastoma intraocular (Tablas 1 y 2) y las de Pratt¹⁴⁰ y Howarth para la enfermedad con extensión intra y extraocular.¹⁴¹ (Hoy están prácticamente en desuso).

La clasificación de Reese-Ellsworth fue publicada en 1964,¹⁴¹⁻¹⁴² es la utilizada clásicamente para valorar el retinoblastoma confinado a una localización intraocular. Considera el número, tamaño y localización de los distintos tumores y la presencia o ausencia de siembra vítrea, sin embargo, no valora la presencia de siembras subretinianas o desprendimiento de retina. Fue ideada para predecir la supervivencia ocular y el pronóstico visual cuando el tratamiento estrella era la radioterapia externa como tratamiento aislado, ahora, tras la introducción de la quimioterapia y las técnicas de quimiorreducción asociado a tratamiento de consolidación, resulta poco práctica, aunque sigue siendo la más útil para comparar resultados entre los distintos autores,

dado su extendido uso, sin embargo, esta clasificación, en el momento actual, no permite predecir la supervivencia del paciente ni la funcionalidad visual final.¹⁴³

Tabla 1. Clasificación de Reese-Ellsworth.

	A	B
Grupo I (Muy favorable)	Tumor solitario < 4 DP*, en ecuador o posterior a éste	Tumores múltiples, < 4 DP, en ecuador o posteriores
Grupo II (Favorable)	Tumor solitario, de 4 a 10 DP, en ecuador o posterior	Tumores múltiples, de 4 a 10 DP, en ecuador o posteriores
Grupo III (Dudoso)	Cualquier lesión anterior al ecuador	Tumor solitario > 10 DP posterior al ecuador
Grupo IV (Desfavorable)	Múltiples tumores, alguno > 10 DP	Cualquier lesión con extensión a ora serrata
Grupo V (Muy desfavorable)	Tumor que afecta a más del 50% de retina	Presencia de siembra vítrea

* DP: diámetro papilar; equivale a 1.5 mm.

Tabla 2. Clasificación de Essen.

ESTADIO	TIPO LESIÓN	TRATAMIENTO
Grupo I (Muy favorable)	. Tumores ≤4 DP*. (Salvo junto a mácula o papila)	. Fotocoagulación y/o crioterapia . No radioterapia
Grupo II (Favorable)	. Tumores 8-10 DP. (Excepto si pertenecen a grupos III-V) . Tumores junto a mácula	. Radioterapia externa o braquiterapia asociadas o no a fotocoagulación o crioterapia.
Grupo III (Dudoso)	. Tumores yuxtapapilares. . Tumores con DR**. . Siembra vítrea superficial. . Tumores pequeños próximos a ora serrata. (Excepto si son IV-V).	. Según la localización y tipo: radioterapia externa y/o braquiterapia, fotocoagulación y/o crioterapia o quimioterapia.
Grupo IV (Desfavorable)	. Tumor extenso con o sin SV*** superficial o DR. . Tumores yuxtapapilares. . Tumores en la ora serrata.	. Radioterapia externa asociado o no a quimioterapia o tratamiento focal.
Grupo V (Muy desfavorable)	. Tumor masivo que ocupa más del 50% de la retina con o sin siembra vítrea difusa. . DR total.	. Enucleación. . Radioterapia externa y quimioterapia . Radioterapia externa y enucleación si no hay respuesta clara.

DP*: diámetros papilares; DR**: desprendimiento de retina; SV***: siembras vítreas.

La clasificación de Essen considera la función macular, y asocia un pronóstico visual y propone una pauta terapéutica según el estadio. En la práctica es difícil aplicar una pauta fija en todos los casos pues deben valorarse muchos factores de forma conjunta. El mismo grupo ha reconocido la dificultad de encontrar una clasificación satisfactoria y ha propuesto un sistema computerizado para valorar la supervivencia ocular y global.¹⁴⁴⁻¹⁴⁵

La introducción de tratamientos como la quimiorreducción o la termoterapia transpupilar han contribuido a complicar un poco más ésta situación.

Intentando valorar la supervivencia ocular en los casos de retinoblastoma intraocular tratados con quimioterapia como terapia inicial, el grupo de retinoblastomas del Hospital Infantil La Paz propuso una Clasificación Práctica, al observar que el tamaño inicial del tumor o tumores influía más que su localización en el pronóstico final; en caso de presentarse varios tumores, sólo se considera el tamaño del mayor de ellos. Tabla 3.¹⁴⁶

Tabla 3. Clasificación Hospital Infantil La Paz.

Grupo 1 (pequeños)	Tumores menores de 4.5 mm (3 DP)
Grupo 2 (medianos)	Tumores entre 4.5-12 mm (3-8 DP)
Grupo 3 (grandes)	Tumores entre 12-18 mm (8-12 DP)
Grupo 4 (avanzados)	Tumores mayores de 18 mm (12 DP)

Recientemente Shields y col. han desarrollado una aproximación clínica similar que intenta predecir el éxito de la quimioterapia junto con terapias focales de consolidación para evitar la enucleación o la radioterapia externa, encontrando mayor correlación con este enfoque simplificado que con la clasificación de Reese-Ellsworth. Tabla 4.¹⁴⁷

En una reciente publicación se ha demostrado el valor predictivo de este estadiaje, que define como éxito de la quimiorreducción los casos que se ven libres de la radioterapia externa y de la enucleación.¹⁴⁸⁻¹⁴⁹ dado la buena correlación que presenta con el pronóstico vital y funcional, y que permite una protocolización del tratamiento, probablemente sea la clasificación que se utilice en los próximos años.

Tabla 4. Clasificación Práctica de Shields (2004).

Grupo 1	Tumor retiniano (únicamente)
Grupo 2	Tumor retiniano + líquido subretiniano
Grupo 3	A Tumor retiniano + siembra subretiniana focal B Tumor retiniano + siembra vítrea focal
Grupo 4	A Tumor retiniano + siembra subretiniana difusa B Tumor retiniano + siembra vítrea difusa
Grupo 5	Retinoblastoma invasivo o glaucoma neovascular

En 2001 Murphree y col. presentaron una clasificación del retinoblastoma intraocular basada en la probabilidad de conservar el ojo tras aplicar quimioterapia como tratamiento inicial.¹⁵⁰ La probabilidad de conservar el globo ocular es muy alta, 95%, cuando el tumor está confinado a la retina, y disminuye notablemente con la diseminación intraocular del tumor.¹⁵¹ También insiste en la necesidad del diagnóstico precoz y de mejorar en las posibilidades terapéuticas de la enfermedad intraocular diseminada.

Recientemente Murphree y Gallie han propuesto, como evolución de la anterior, una nueva Clasificación Internacional del Retinoblastoma Intraocular que se está validando de forma interactiva a través de la red, utilizando como link la dirección: (<https://www.uhnres.utoronto.ca/rbabc/rbclass/site/patient/home.php>). Tabla 5.

El grupo de La Paz ha colaborado de forma activa en éste proyecto.¹⁵²

Ésta nueva clasificación considera tanto la historia natural del retinoblastoma como el éxito en la supervivencia del órgano y de la función visual tras utilizar quimioterapia como terapia inicial. Cada estadio se valora por orden alfabético, no numérico, cuantificando el riesgo de pérdida del órgano visual. Con este sistema la morbilidad aumenta y la posibilidad de conservación de la capacidad visual disminuye al pasar a cada estadio. De forma global, cuando se introduce la quimioterapia el tamaño tumoral no es tan importante como la extensión intraocular o la presencia de siembras vítreas o subretinianas.⁶⁷

Tabla 5. Clasificación Internacional del Retinoblastoma Intraocular.

Grupo A. Tumores intrarretinianos pequeños alejados de fovea y nervio óptico.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Todos los tumores ≤ 3 mm en su diámetro mayor, confinados en retina y localizados a más de 3 mm de fovea y/o a más de 1.5 mm de nervio óptico.
Grupo B. Resto de tumores de tamaño discreto confinados en la retina.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Todos los tumores confinados en retina y no incluidos en el Grupo A. ○ Tumores con líquido subretiniano extendido a menos de 3 mm del tumor, sin siembra subretiniana.
Grupo C. Enfermedad local discreta con mínima siembra vítrea o subretiniana.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Tumor o tumores de tamaño discreto. ○ Presencia, actual o previa, de líquido subretiniano sin siembra que afecta hasta 1/4 de la extensión de la retina. ○ Siembra subretiniana local, extendida a menos de 3 mm (2 DD) del tumor. ○ Siembra vítrea fina local, adyacente a un tumor de tamaño discreto.
Grupo D. Enfermedad difusa con siembra vítrea o subretiniana significativa.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Tumor o tumores masivos o difusos. ○ Presencia, actual o previa, de líquido subretiniano sin siembra, que puede llegar al desprendimiento de retina total. ○ Siembra subretiniana difusa, puede incluir placas subretinianas o nódulos tumorales. ○ Siembra vítrea difusa o masiva, puede incluir “grumos” o masas tumorales avasculares.
Grupo E. Presencia de una o más de las siguientes características de mal pronóstico.
<ul style="list-style-type: none"> ○ Tumor contactando con cristalino. ○ Glaucoma neovascular. ○ Tumor anterior a la cara anterior del vítreo, afectando cuerpo ciliar o segmento anterior. ○ Retinoblastoma infiltrativo difuso. ○ Opacidad de medios por hemorragia. ○ Necrosis tumoral con celulitis orbitaria aséptica. ○ Ptisis bulbi.

También se ha propuesto otra clasificación, por Chantada y cols. que evalúa la enfermedad atendiendo a la afectación extraocular y a las características anatomopatológicas, cuando la enucleación ha sido precisa, tomando la enfermedad en todo el espectro posible de sus formas de presentación, aunque no ha demostrado aún tener un valor para la práctica clínica.¹⁵³

Así pues, el diagnóstico más precoz y las nuevas opciones terapéuticas han mejorado el pronóstico visual y global de los pacientes con retinoblastoma, pero también se ha complicado establecer una clasificación que valore todos los factores implicados y establezca unas pautas protocolizadas de tratamiento. Por eso, a pesar de todo, en la práctica diaria el tratamiento debe individualizarse en cada paciente.

VI. ANATOMIA PATOLOGICA

La primera descripción de un tumor que podría corresponder a un retinoblastoma la realiza Petrus Pawius en el siglo XVII. James Wardrop describe el retinoblastoma como una entidad específica en 1809 y propone la enucleación precoz como tratamiento; también concluye que deriva de la retina y se extiende hacia el nervio óptico y el cerebro, describiendo diferentes localizaciones de metástasis. En 1864 Virchow sugiere su origen glial y pasa a denominarse *glioma* de la retina. Verhoeff en 1926 propone su origen retiniano y la American Ophthalmology Society acuña el término de retinoblastoma.¹⁵⁴

El retinoblastoma es un tumor de origen neuroectodérmico que puede originarse a partir cualquier capa de la retina neurosensorial. Su apariencia clínica es muy variada y aunque hay dos patrones básicos de crecimiento intraocular, la mayoría de los tumores presentan una combinación de ambos. El patrón **endofítico** crece desde la superficie de la retina hacia el vítreo y se presenta formando tumoraciones blancas, friables y poco cohesivas, además suele asociar siembras vítreas. La forma **exofítica** crece desde las capas retinianas más externas a través del espacio subretiniano y suele producir un desprendimiento de retina que puede dificultar el diagnóstico diferencial, con frecuencia asocia siembras subretinianas.

La presencia de calcificaciones, anastomosis vasculares y redes capilares intratumorales son muy sugestivas de retinoblastoma.

Otra forma de presentación mucho menos frecuente del retinoblastoma es el tipo **infiltrativo difuso**, que se desarrolla produciendo un engrosamiento difuso de la retina sin que se identifiquen de forma clara masas tumorales.¹⁵⁵ Estas lesiones muy raramente se calcifican,¹⁸³ Por lo que ni la ecografía ni la TC son herramientas de gran eficacia.¹⁸⁴ La resonancia nuclear puede darnos información útil para el diagnóstico.¹⁵⁵ Suele presentarse en el contexto de un síndrome de ojo rojo, con pseudohipopion, nódulos en la superficie del iris o en la cámara anterior o en el endotelio, similar a los precipitados queráticos. El vítreo suele ser turbio, con exudados y la retina aparece con un color grisáceo, infiltrada y engrosada. Habitualmente es un proceso unilateral con buen pronóstico tras enucleación.¹⁸⁵ No es raro que se manifieste con hifema.^{184,186} Se ha descrito un caso hereditario.¹⁸⁷ Además del problema diagnóstico,¹⁸⁸ como la lesión

crece y destruye la retina neurosensorial el pronóstico visual en cualquier caso, es nefasto.¹⁸⁹

El retinoblastoma es un tumor de crecimiento rápido, que en pocas semanas puede ocupar la totalidad del globo ocular por extensión directa o por crecimiento de las siembras tumorales. Como se ha señalado en el apartado de clínica, el retinoblastoma es un tumor que puede diseminarse por varias vías,¹⁰⁶ principalmente a través del nervio óptico y coroides.

Citológicamente el retinoblastoma presenta un espectro que varía desde tumores bien diferenciados hasta indiferenciados.¹⁵⁶ La mayoría de tumores presentan áreas de necrosis, causadas por isquemia o respuestas inmunológicas, y calcificaciones. Los tumores que presentan importantes áreas de necrosis están asociados con peores pronósticos en cuanto a metástasis y supervivencia.¹⁵⁷

El **retinoblastoma indiferenciado** presenta una proliferación difusa en sábana de células similares a las de la retina embrionaria: tamaño pequeño, núcleos grandes e hipercromáticos y escaso citoplasma. Las mitosis pueden ser numerosas y atípicas.

El **retinoblastoma diferenciado** es menos frecuente y no suele presentarse como una forma pura. Se caracteriza por la presencia de células que muestran diferenciación hacia fotorreceptores y células bipolares. Las rosetas de Flexner-Wintersteiner son columnas de células cuboides en torno a una luz central delimitada por una membrana, similar ultraestructuralmente a la membrana limitante interna; estas rosetas son muy características del retinoblastoma. Las rosetas de Homer-Wright, menos frecuentes, están formadas por células en torno a una malla fibrilar; aparecen también en neuroblastomas, meduloblastomas y meduloepiteliomas. También pueden aparecer células agrupadas en forma de racimos o ramilletes, “fleurettes”, con prolongaciones eosinófilas que se proyectan hacia una membrana fenestrada. También se han descrito células semejantes a las células bipolares, con citoplasma amplio, poligonal y de núcleo pequeño redondo y central.

Otra entidad distinta es el **retinoblastoma atípico**, los errores en el diagnóstico o el diagnóstico tardío del retinoblastoma son frecuentes cuando se presenta de este

modo.¹⁵⁸ La tasa de mortalidad en estos casos atípicos es mayor que en los clásicos, dado el retraso que se produce en el diagnóstico.¹⁵⁹⁻¹⁶⁰ El retinoblastoma puede ser diagnosticado erróneamente como un proceso inflamatorio.¹⁶⁰ Cuando se trata de un retinoblastoma difuso infiltrante su clínica es prácticamente igual que la de un proceso uveítico y retrasa notablemente el momento del diagnóstico,¹⁶¹ el tumor se manifiesta como un pseudohipopion,¹⁶²⁻¹⁶⁴ lesiones en el iris,¹⁶⁵⁻¹⁶⁶ uveítis granulomatosas,¹⁶⁶ endoftalmitis indolentes,^{121, 167} y, probablemente la manifestación más engañosa, como una celulitis orbitaria.^{62,168} Los pacientes son remitidos a los centros hospitalarios para recibir tratamiento antibiótico sistémico cuando en realidad lo que tienen es una celulitis aséptica, producida por el proceso necrótico de la lesión intraocular. Con frecuencia el edema palpebral dificulta la exploración del globo ocular.

Nunca debería pautarse un tratamiento antibiótico intravenoso en un paciente con esos síntomas sin haber sido examinado antes el fondo del ojo por un oftalmólogo. En otras ocasiones aparecen como tumores que crecen a partir de la superficie de la retina, con aspecto quístico y avascularizado,¹⁶⁹ o que se manifieste como primer signo con hipopion, hifema o una hemorragia vítrea, o en una de sus variantes consideradas benignas (retinoma o retinocitoma) o que aparezca en niños mayores.

El retinoblastoma también ha sido identificado en ojos microftálmicos,¹⁷⁰ y es compatible con vítreos primarios hiperplásicos,¹⁷¹ o con hipoplasia del nervio óptico.⁶⁷ Los snowballs, que realmente son siembras tumorales, tanto en cámara anterior como en la cavidad vítrea han sido descritas como un signo claro de un diagnóstico tardío de retinoblastoma.¹¹⁸

6.1. RETINOMA O RETINOCITOMA

El retinocitoma o retinoma es una variante benigna y poco frecuente del retinoblastoma descrita en el 1-2% de los casos. Fue descrito inicialmente por Gallie y colaboradores como un “retinoma” que solo progresaba hasta alcanzar cierto tamaño.¹⁷²⁻¹⁷³ Margo y colaboradores describieron, posteriormente, la misma lesión como “retinocitoma”.¹²² Aaby y colaboradores mostraron histológicamente que se trataba de una variante benigna y no de un retinoblastoma en regresión: un varón de 5 años fue enucleado y en el análisis anatomopatológico se apreciaba un lecho bien vascularizado, con focos de calcificación, sin mitosis ni pleomorfismo, ni atipia nuclear, ni rosetas ni

otros signos de malignidad, tampoco presentaba necrosis periférica ni signos de regresión tumoral, con lo que se demostraba que se trataba de otra entidad distinta del retinoblastoma. Suele presentarse en edades más avanzadas, de forma unilateral o bilateral,¹⁷⁴ pudiendo conservar una visión normal, dependiendo de la localización.^{122, 172,175} También se ha descrito un retinoma precoz, en pacientes menores de dos años, que no se realza en la angiografía fluoresceínica y que no disminuye su tamaño con la administración de quimioterapia sistémica ni con radioterapia externa. Está compuesto por células bien diferenciadas.

Oftalmoscópicamente son masas grisáceas, translúcidas, que en ocasiones presentan formaciones quísticas, con zonas calcificadas o hiperplasia del epitelio pigmentario, similares al patrón III de regresión del retinoblastoma.

Se considera que la misma mutación genética puede causar el retinoma o el retinoblastoma; el primero aparece si la mutación afecta a retinoblastos relativamente maduros y el retinoblastoma si acontece en retinoblastos inmaduros.¹⁷² Aunque se pensaba que permanecían latentes a lo largo de la vida del paciente,¹⁷⁶ se ha descrito su crecimiento y rápida malignización,¹⁷⁷ de modo similar a como un nevus coroideo sufre una transformación hacia un melanoma maligno, por lo que deben vigilarse periódicamente.¹⁷⁸⁻¹⁷⁹

Por otro lado se ha considerado que el retinocitoma presentara alteraciones genéticas en los dos alelos del gen RB y que fuera al incorporar nuevas mutaciones en otros genes asociados al desarrollo tumoral cuando sufriera la malignización.¹⁸⁰

Como su identificación y diagnóstico asocia cierto riesgo se le puede considerar también como un modelo de regresión tipo 5. Como ha sido descrita su probable malignización, puede emplearse la fotocoagulación láser secuencial para transformar las lesiones en cicatrices planas, (regresión tipo 4).¹⁷⁷

Tampoco el hecho de que se presente asociando siembras vítreas implica directamente su malignidad.¹⁸¹⁻¹⁸²

6.2. REGRESIÓN ESPONTÁNEA DEL RETINOBLASTOMA

Consiste en una verdadera regresión de tumores intraoculares con necrosis completa espontánea, secundaria a isquemia vascular tumoral o a distintos mecanismos inmunopatogénicos, resultando un ojo atrófico y calcificado (ptisis bulbi).¹⁹⁰⁻¹⁹¹

Se ha descrito incluso un caso que presentó la reabsorción de una lesión espontáneamente tras 20 años de seguimiento.¹⁹²

En cualquier caso, tanto los tumores con regresión espontánea como los retinocitomas tienen las mismas implicaciones genéticas que el retinoblastoma, por lo que sigue siendo necesario el consejo genético y el seguimiento adecuado del paciente y sus familiares.^{191, 193}

VII. TRATAMIENTO

En primer lugar debemos tener en cuenta que el objetivo de nuestro tratamiento no es el globo ocular sino el niño. Las expectativas del tratamiento han variado notoriamente, hace años el objetivo era mejorar la supervivencia, posteriormente fue conservar el órgano visual y, hoy en día, en nuestro medio, el objetivo es conservar, en la medida de lo posible, la función visual.

En este apartado se describen los tratamientos que tenemos disponibles a la hora de abordar el retinoblastoma. Debe elaborarse un plan a la medida de cada paciente, desde el momento inicial del diagnóstico, valorando también los beneficios y complicaciones potenciales de cada abordaje terapéutico.

7.1. QUIMIOTERAPIA

Desde 1989 se viene utilizando la quimioterapia como uno de los tratamientos de primer escalón en los retinoblastomas intraoculares.¹⁹⁴ Su uso está protocolizado en todo el mundo.

El primero en utilizar esta herramienta terapéutica fue Kupfer en 1953, que empleó mostaza nitrogenada asociada a radioterapia externa. Posteriormente Reese utilizó un análogo, la trietilenmelamina, como agente radiomimético. Aunque su uso estaba relegado a casos avanzados, con un segundo ciclo de radioterapia externa, con riesgo de metástasis tras enucleación, o enfermedad extraocular establecida, sin que se observaran beneficios ni en el control local ni en la supervivencia del paciente.^{141, 195-198}

Hasta 1989 el uso de la quimioterapia estaba relegado fundamentalmente a retinoblastomas extraoculares, aunque los fármacos que utilizaban los oncólogos en algunos casos eran los que se usan actualmente, al hacerlo de forma aislada resultaban no ser eficaces, tan solo la ciclofosfamida y la ifosfamida parecían tener alguna eficacia usadas de forma aislada.¹⁹⁹⁻²⁰⁰

Aunque las primeras experiencias en el tratamiento del retinoblastoma intraocular con quimioterapia no fueron satisfactorias,^{198, 201} posteriormente se propone su uso para reducir el volumen tumoral inicial de modo que puedan aplicarse tratamientos locales que permitan el control final de la enfermedad con una menor morbilidad.²⁰² Esta modalidad de quimioterapia se conoce como *Quimiorreducción*,

término que se acuñó en 1992 y fue descrito por Murphee, sin embargo, es un término que no es usado por los oncólogos. Se inicia así la etapa actual en el manejo del retinoblastoma intraocular, que pretende evitar la enucleación y la radioterapia externa mediante el uso de quimioterapia sistémica o periocular como tratamiento primario para reducir el tamaño tumoral y conseguir su control final con la aplicación de métodos locales conservadores como son la fotocoagulación láser, la crioterapia, la termoterapia o la braquiterapia.

La terminología más adecuada, también aceptada por los oncólogos, sería decir “quimioterapia primaria asociada a tratamientos de consolidación focal”.

Las indicaciones actuales de la quimioterapia en el tratamiento del retinoblastoma son:

- Enfermedad intraocular extrarretiniana: quimioprofilaxis de su diseminación.
- Retinoblastoma extraocular o metastásico.
- Retinoblastoma intraocular que afecta sólo la retina: Quimiorreducción.

La muerte celular causada por los agentes antineoplásicos sigue una cinética de primer orden: un porcentaje constante de células, y no un número constante, muere con una maniobra terapéutica determinada, de ahí la importancia de los tratamientos de consolidación. Por otra parte, la curva de crecimiento tumoral de Gompertz indica que la fracción de células en división del tumor decrece con el tiempo, por lo que los tumores pequeños van a ser más sensibles a la quimioterapia.

Para lograr esta muerte celular es importante el concepto de “intensidad de dosis” (cantidad de fármaco administrado por unidad de tiempo). Los pacientes tratados con quimioterapia deben recibir la dosis máxima tolerada, ya que dosis más bajas, no tóxicas y sin capacidad tumoricida, favorecen la aparición de resistencia farmacológica en las células tumorales. La administración de varios fármacos de modo simultáneo permite conseguir la muerte celular a través de distintos mecanismos y disminuir la aparición de resistencias. Al seleccionar las combinaciones es importante considerar su punto de acción en el ciclo celular. Este tratamiento de combinación suele producir mayor toxicidad sistémica.

El conocimiento de la cinética del ciclo celular es esencial para el uso correcto de los agentes antineoplásicos, pues muchos de ellos actúan en fases específicas del ciclo; la mayoría de fármacos afectan a las células durante la síntesis de DNA. El éxito

de la quimioterapia suele depender de la cinética de las células tumorales en el momento en que se administran los fármacos. Muchas células tumorales, especialmente en tumores de crecimiento lento, pueden permanecer en fase G0 durante períodos prolongados y volver a reclutarse mucho más tarde en el ciclo de división celular.

La resistencia de las células neoplásicas frente a un fármaco puede ser temporal o permanente. La **resistencia temporal** se debe a factores locales como la disminución del riego sanguíneo del tumor o la llegada de estas células a “santuarios” como el sistema nervioso central y a su entrada en una fase del ciclo celular diferente a la que es sensible al fármaco. La **resistencia permanente** se debe a modificaciones genéticas en las células tumorales producidas por varios mecanismos, entre los que destaca el aumento en la eliminación del fármaco por productos de genes de resistencia multifarmacológica en la membrana celular o el aumento en la capacidad de reparación del DNA, etc.

El **mecanismo de resistencia multifarmacológica (MRF) o pleiotrópica** provoca resistencia frente a una amplia gama de fármacos con mínima o nula relación entre sí. Las células con resistencia multidroga muestran una amplificación del gen *mdr 1*, que codifica una glucoproteína de 170 kDa (p170 o p-glicoproteína) de la superficie celular. La p-170 actúa como una bomba de flujo ATP-dependiente e impide la entrada de los citotóxicos al interior celular.²⁰³ Existen diferentes agentes que disminuyen la acción de la p170 y potencian los efectos de ciertos quimioterápicos: antagonistas del calcio (vincristina, daunorrubicina y adriamicina), quinidina (adriamicina, vincristina), etc. La expresión en la membrana de las células del retinoblastoma de esta p-glicoproteína se ha relacionado con la aparición de resistencias, proponiéndose la adición de ciclosporina A para bloquearla;²⁰⁴⁻²⁰⁵ también se encuentran en estudio anticuerpos monoclonales contra la p-glicoproteína. Otra proteína asociada a la resistencia a citotóxicos es la MRP (proteína de resistencia multidroga), encontrada junto a la p170 en tumores que no responden a la quimioterapia y de forma aislada en retinoblastomas que no responden a quimioterapia asociada a ciclosporina A.²⁰⁶

7.1.1. Quimioterapia en retinoblastoma intraocular extrarretiniano

El objetivo del tratamiento adyuvante del retinoblastoma es prevenir el desarrollo de la enfermedad orbitaria y las metástasis a distancia, que son factores que determinan la supervivencia del paciente. Por esta razón es importante determinar que factores son los que incrementan el riesgo de desarrollar estas dos condiciones y que

casos podrían beneficiarse de una terapia adyuvante,²⁰⁷ aunque algunos autores proponen el uso de quimioterapia adyuvante en todos los pacientes con tratamiento conservador para evitar el riesgo de micrometástasis.^{198, 208}

También se investiga la búsqueda de marcadores moleculares asociados a una mayor agresividad tumoral y a un mayor riesgo de desarrollar metástasis.²⁰⁹⁻²¹⁰

En cuanto a la invasión del nervio óptico, se considera que la afectación prelaminar y laminar no se asocian con un incremento del riesgo de metástasis. En cambio la infiltración retrolaminar y del margen quirúrgico de resección si incrementan de forma estadísticamente significativa el riesgo de enfermedad orbitaria o metastásica, recomendándose quimioprofilaxis sistémica,^{108, 111, 113, 211} aunque se ha propuesto que no es necesaria en pacientes con afectación retrolaminar sin otros factores de riesgo histopatológico asociados.²¹² Si está afectado el margen quirúrgico del nervio óptico se indica también radioterapia externa orbitaria, aplicándose una dosis total de 40-50 Gy.

La quimioterapia neoadyuvante (carboplatino y etopósido) también se ha propuesto en presencia de imagen radiológica sugestiva de afectación del nervio óptico, seguida de enucleación, radioterapia externa orbitaria y quimioterapia coadyuvante.²¹³

En cuanto a la invasión coroidea, hay discordancia entre los autores según el riesgo de desarrollar metástasis según haya afectación del nervio óptico de forma independiente aunque recientemente se ha señalado que la terapia adyuvante en los casos que presentan invasión coroidea masiva aislada, la quimioterapia asociada o no a radioterapia externa orbitaria, tiene un beneficio estadísticamente significativo ($p = 0.04$) en la prevención de metástasis.²¹¹

En los casos que presentan afectación extraescleral microscópica, demostrada por el estudio histopatológico, que se ha descrito hasta en el 8% de ojos enucleados,¹¹¹ se considera un factor de riesgo de metástasis reconocido que precisa radioterapia externa orbitaria y quimioterapia coadyuvante.²¹⁴⁻²¹⁵

La terapia adyuvante también está indicada si hay invasión de las venas emisarias esclerales y en pacientes sometidos a cirugía intraocular con diagnóstico postoperatorio debido a la elevada probabilidad de diseminación extraocular^{106, 216-217} a través de la vía que se ha utilizado para la intervención. También se ha señalado la

diseminación orbitaria y la presencia de metástasis tras la cirugía intraocular de ojos tratados previamente, recomendándose el estudio citológico del líquido subretiniano y los fluidos de la vitrectomía;²¹⁸ si éstos son positivos debe realizarse enucleación y administrar quimioterapia adyuvante con o sin radioterapia orbitaria asociada.²¹⁹

En cuanto a la invasión de la cámara anterior, se ha encontrado una relación estadísticamente significativa con el riesgo de metástasis.¹¹¹ A través de la invasión del cuerpo ciliar e iris el retinoblastoma puede extenderse a los ganglios preauriculares, por lo que algunos autores aconsejan quimioterapia coadyuvante tras la enucleación.^{61, 220}

7.1.2. Quimioterapia en Retinoblastoma Extraocular o Metastásico

Las metástasis afectan al 5-10% de pacientes con retinoblastoma y suelen aparecer en el primer año tras el diagnóstico.^{145, 221} Se asocian con la invasión de coroides, nervio óptico y órbita.²⁰⁷ Generalmente aparecen en el cerebro, hueso, médula ósea e hígado.

La afectación tumoral orbitaria, infiltración del margen de resección del nervio óptico, presencia de metástasis y pinealoblastoma requieren un abordaje combinado mediante quimioterapia y radioterapia externa. Las nuevas modalidades de quimioterapia, incluyendo la megaterapia con rescate de progenitores hematopoyéticos, han mejorado el pronóstico del retinoblastoma extraocular. Aunque se han utilizado distintas pautas, no hay un tratamiento estandarizado.^{200,215,222} Ésta quimioterapia intensiva permite la curación de algunos pacientes con enfermedad orbitaria, diseminación a ganglios linfáticos y metástasis a distancia.^{109, 223, 224}

Los fármacos que se utilizan son aquellos que han demostrado ser eficaces en el tratamiento de tumores embrionarios neuroectodérmicos: agentes alquilantes (ciclofosfamida o ifosfamida), compuestos de platino (cisplatino y carboplatino), vincristina, antraciclinas (doxorubicina) y epipodofilotoxinas (etopósido).^{200, 202}

La afectación orbitaria se ha descrito en un 2.5% de pacientes con retinoblastoma, con frecuencia asociada a metástasis a distancia, por lo que la exenteración orbitaria o radioterapia externa son ineficaces por sí solas para lograr su control y debe hacerse un tratamiento combinado con quimioterapia; en muchos casos la exenteración orbitaria no es necesaria y sólo se realiza la excisión o biopsia de la masa tumoral. Se han descrito supervivencias libres de enfermedad del 84% a 5 años.^{225, 226}

Cuando se aplica radioterapia externa en la órbita, se requieren dosis de 50 Gy para evitar recurrencias.²²⁷

En el tratamiento de las metástasis a distancia se han ensayado distintos protocolos que combinan quimioterapia intensiva convencional y quimioterapia a altas dosis con rescate de células madre autólogas y radioterapia externa. Los resultados son muy alentadores, con una toxicidad aceptable (mucositis, diarrea, infecciones, alteraciones hematológicas), aunque el número de casos es pequeño.²²⁸⁻²³¹

Las metástasis en el sistema nervioso central tienen una mortalidad cercana al 100%, siendo pocos los casos de supervivencia descritos.²³²⁻²³³ Se han utilizado distintos protocolos de quimioterapia sistémica intensiva e intratecal asociadas a radioterapia cráneo-espinal y rescate de médula ósea. Los fármacos utilizados vía intratecal han sido varios: metotrexato, citarabina, tiotepa, mercaptopurina, melfalán, hidrocortisona, etc.

El pinealoblastoma no se considera una metástasis del retinoblastoma,¹²⁵ pero su tratamiento y pronóstico es similar al de las metástasis del sistema nervioso central, por lo que se incluye en este apartado. Se ha descrito una menor incidencia en los pacientes tratados con quimiorreducción, sugiriéndose que ésta podría prevenir o retrasar su aparición.¹³⁴

7.1.3. Quimiorreducción en Retinoblastoma Intraocular

Clásicamente en los tumores sólidos pediátricos, especialmente el neuroblastoma, de origen neuroectodérmico como el retinoblastoma, se aplica como tratamiento la quimioterapia sistémica, que produce una disminución del volumen tumoral que permite, posteriormente aplicar tratamientos locales con una menor morbilidad,²³⁴⁻²³⁷ así es como en la pasada década se propone este modelo terapéutico para el tratamiento del retinoblastoma intraocular para aumentar la eficacia de otras terapias locales.²⁰²

Los fármacos que se utilizaban con éxito en el neuroblastoma y otros tumores sólidos pediátricos se utilizan para el retinoblastoma extraocular,²³⁸⁻²³⁹ consiguiendo un 85% de respuestas con la asociación de carboplatino y etopósido, y también como quimioterapia neoadyuvante en el retinoblastoma intraocular.²²²

En 1996 diferentes autores publican sus primeros resultados utilizando quimioterapia sistémica como tratamiento primario del retinoblastoma intraocular.^{194, 205, 240-244} Se inicia así una nueva perspectiva terapéutica en el manejo del retinoblastoma intraocular, que intenta evitar la enucleación y radioterapia externa mediante el uso de quimioterapia sistémica o periocular como tratamiento primario del retinoblastoma para reducir su tamaño y conseguir su control final con métodos locales. Esta modalidad de quimioterapia neoadyuvante se conoce como *Quimiorreducción*.²⁴⁵⁻²⁴⁷

El objetivo es conseguir la supervivencia del paciente y del globo ocular, preservando una agudeza visual útil y evitando los efectos secundarios de la radioterapia externa, especialmente en niños menores de un año con retinoblastoma hereditario.²⁴⁸⁻²⁴⁹

Las indicaciones de la quimiorreducción en el retinoblastoma aún no están claramente establecidas.¹¹⁴ Aunque, en general, son las del tratamiento conservador:²¹⁵

- Antecedentes familiares de retinoblastoma conocidos, que suele corresponder a un diagnóstico precoz, con mejor pronóstico en el control local y la conservación de la visión. Debe tenerse en cuenta la predisposición genética a sufrir segundos tumores primarios, que aumenta además con la radioterapia externa.
- Presencia de tumores multifocales o diagnóstico a edades tempranas, incluso sin antecedentes familiares, sugiere que se trata de pacientes portadores de mutación en la línea germinal. Por la frecuencia de bilateralización, debe evitarse la enucleación primaria.
- Lesiones en las que se plantearía como tratamiento inicial radioterapia externa o enucleación:²⁴⁰⁻²⁴² Tumores masivos, con siembra vítrea, próximos a la macula o la papila o con desprendimiento de retina, habitualmente con siembra subretiniana asociada.
- Debe excluirse la presencia de neovasos iridianos, glaucoma neovascular e invasión de cámara anterior, iris, cuerpo ciliar, nervio óptico, coroides o tejidos extraoculares, así como cualquier alteración de los medios transparentes (catarata, hemorragia vítrea) que impida la exploración ocular y un seguimiento correcto.

Los tumores con un tamaño y localización adecuados para la aplicación de terapias locales deberían recibir inicialmente estos tratamientos y no someterse a quimiorreducción,²⁴¹ aunque está descrito el uso en tumores menores de 2 mm.²⁵⁰

Lo habitual es que en el mismo ojo se presenten varios tumores, algunos susceptibles inicialmente de tratamiento local y otros de quimiorreducción.

Los escasos resultados obtenidos por diversos autores en el grupo V de Reese-Ellsworth han llevado a algunos a proponer de nuevo la enucleación como tratamiento primario, sin probar quimiorreducción en aquellos ojos con tumores avanzados con desprendimiento total de la retina y siembra vítrea difusa.²⁵¹

La quimioterapia primaria ha relegado de su puesto a la radioterapia externa. La pauta de aplicación es la utilización de dos a cuatro fármacos durante un periodo de dos días cada 3-4 semanas, considerando un ciclo desde que se administra la droga hasta que se recupera la supresión de la médula ósea.

En cuanto a los protocolos de quimiorreducción, los fármacos más utilizados son los que han demostrado su eficacia en otros tumores de estirpe neural y en el retinoblastoma metastásico (carboplatino, etopósido y vincristina) con o sin la adición de ciclosporina A.

La ciclofosfamida, utilizada en la quimioprofilaxis de micrometástasis y en el retinoblastoma extraocular, no suele utilizarse en la quimiorreducción por estar relacionada con un aumento del riesgo de segundos tumores en pacientes con retinoblastoma hereditario.²⁵²

Vincristina. Es un derivado alcaloide dimérico de la planta *Vinca rosea*. Se une de forma específica a la proteína tubulina, componente clave de los microtúbulos celulares, y bloquea la mitosis al detener la metafase.

Puede asociar fenómenos de toxicidad aguda con desarrollo de una reacción local por extravasación con daño tisular severo, y toxicidad retardada manifestada como neuropatía periférica, que es el factor limitante de dosis, alopecia (20%), mielosupresión leve (leucopenia), estreñimiento, íleo paralítico, convulsiones, dolor mandibular y secreción inadecuada de ADH.²⁵³⁻²⁵⁴ Greenwald y Strauss prefieren no utilizarla para evitar esta neurotoxicidad.²⁴³

Carboplatino. Es un compuesto inorgánico de metal pesado que contiene un átomo central de platino. Es un agente electrofílico que actúa específicamente durante la fase S del ciclo celular, provocando interferencias en la transcripción y la replicación. Puede atravesar la barrera hemato-encefálica.²⁵⁵ También se ha demostrado que alcanza niveles significativos intraoculares tras su administración intravenosa.^{241, 256}

Su efecto citotóxico es potenciado por la hipertermia, que aumenta la unión del carboplatino al ADN tumoral (un aumento de 9°C sobre la temperatura basal dobla sus niveles intracelulares).²⁴¹

Su efecto tóxico agudo se manifiesta con náuseas y vómitos (factor limitante de dosis) en el 25% de pacientes, tras las 6-12 horas de su administración. De forma retardada puede aparecer mielosupresión, con leucopenia, trombopenia y anemia, cistitis hemorrágica, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad con oclusiones venosas, neuropatía periférica y pérdida de audición. Se ha relacionado con casos de toxicidad neurooftalmológica.²⁵⁷⁻²⁵⁸

Etopósido (VP16). Es un glucósido semisintético del principio activo, la podofilotoxina (extraído de la mandrágora, *Podophylum peltatum*). La podofilotoxina se fija a la tubulina a un nivel diferente a los alcaloides de la vinca. El etopósido inhibe la topoisomerasa II; algunas alteraciones nucleares en esta enzima pueden provocar resistencia. Su mayor actividad se observa en las fases S y G2.

Su toxicidad en fase aguda se manifiesta como náuseas y vómitos (dosis-limitante), diarrea, fiebre, hipotensión e hipersensibilidad; debe administrarse lentamente (30-60 minutos en infusión) para evitar la hipotensión y el broncoespasmo. De forma retardada puede desencadenar: mielosupresión (dosis-limitante) especialmente leucopenia, alopecia, neuropatía periférica (generalmente leve, pero más severa si se asocia a vincristina), mucositis y lesión hepática a dosis elevadas. Las epipodofilotoxinas se han relacionado con el desarrollo de leucemia en pacientes con linfoma no-Hodgkin previo (especialmente el tenipósido).²⁵⁹ Se ha descrito un mayor riesgo de leucemia mieloide aguda tras el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda con etopósido, aunque utilizando pautas más intensivas y dosis superiores a las utilizadas en el retinoblastoma;²⁶⁰⁻²⁶¹ otros autores no encuentran ningún caso tras diez años empleándolo en la terapia coadyuvante del retinoblastoma.¹⁹⁴

Ciclosporina A (Cs A). Es un undecapéptido cíclico hidrófobo producido por el hongo *Tolypocladium inflatum*. Es un inmunosupresor que bloquea una etapa precoz de la activación de los linfocitos T citotóxicos en la respuesta a aloantígenos. La Cy A bloquea la actividad de la proteína nuclear NF-TA (factor nuclear de células T activadas), que regula la transcripción de varias linfocinas y citocinas necesarias para la activación y proliferación de las células T; de este modo la Cy A inhibe la expresión de genes en fase temprana asociados a la transcripción de interleucina 2 (IL-2) e interleucina 4 (IL-4), interferón-gamma (IFN- γ) y factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF). Inhibe además la síntesis de las cadenas alfa y beta del receptor de la IL-2, reduciendo aún más la posibilidad de que las células T se activen. Ejerce un escaso efecto sobre los linfocitos T supresores o sobre la respuesta a la IL-2 de los linfocitos T marcados.

Su biodisponibilidad ocular depende de la forma de administración y del grado de ruptura de la barrera hematoocular, penetrando bien en ojos de pacientes con tyndall crónico.²⁶² En los niños su aclaramiento plasmático es un 45% más rápido que en adultos, precisando dosis superiores. La nefrotoxicidad e hipertensión son sus efectos tóxicos más frecuentes si su uso es prolongado. Aunque una vez establecida la nefropatía crónica por Cy A es irreversible, es rara con dosis inferiores a 5 mg/kg y si se impide que la creatinina sérica aumente más del 30% con respecto a su valor inicial. Es rara en niños, pero debe extremarse el cuidado dado que se la nefropatía se ha relacionado con breves dosis excesivas más que con un efecto tóxico acumulativo.²⁶³ La hipertensión arterial se relaciona con la dosis, mejorando al reducir ésta. También se ha descrito hepatotoxicidad, ginecomastia en varones y adenomas benignos de mama en mujeres. No se ha encontrado toxicidad en los niños tratados de retinoblastoma ni que aumente la citotoxicidad de otros fármacos.^{240, 205} Puede aumentar el riesgo de aparición de linfomas de células B (relacionado con el virus de Epstein-Barr) y carcinomas cutáneos de células escamosas, especialmente si la inmunosupresión es profunda.²⁶³

Las complicaciones de la quimioterapia para retinoblastoma suelen ser dosis dependientes y tener una corta duración. Al contrario que la radioterapia externa, no predispone a los pacientes a tumores secundarios más allá de los derivados de la presencia de la predisposición genética (en los casos de retinoblastoma heredable).

Los distintos protocolos de quimioterapia difieren en los fármacos utilizados, número de ciclos e intervalos.^{194, 240-243, 205, 264}

Actualmente se tiende a una quimioterapia estratificada, con un solo fármaco en enfermedad intraocular leve o moderada (carboplatino en termoquimioterapia) y una terapia múltiple en enfermedad severa (carboplatino, vincristina y etopósido). Al utilizar tres fármacos se intenta evitar la selección de clones celulares quimiorresistentes. El uso prolongado de quimioterapia a estas dosis no parece incrementar su toxicidad.²⁴¹

El empleo de ciclosporina A para evitar las resistencias multidroga aún es controvertido. Se ha encontrado resistencia cruzada *in vitro* a distintos citotóxicos en el 30% de retinoblastomas enucleados sin tratamiento previo, así como en todos los tumores en los que el tratamiento había fracasado, lo que sugiere una resistencia multidroga mediada por p-glicoproteína (p170);²⁶⁵ también se ha observado correlación entre la falta de respuesta a la quimioterapia y el incremento de p170 en esos tumores.²⁰⁴ Por lo que la administración de ciclosporina a altas dosis previa a la quimioterapia aumenta el número de respuestas al bloquear la expresión de la p170 en las células tumorales. Este efecto es más significativo si uno de los citotóxicos es el carboplatino.^{240,205} La ciclosporina podría potenciar el efecto del carboplatino al modular un mecanismo de resistencia farmacológica distinto de la p170 y además suprime la inducción de los oncogenes c-fos y c-myc y de genes implicados en la reparación del ADN dañado por citotóxicos.²⁶⁶ También podría aumentar la eficacia del etopósido.²⁶⁷ Otros autores no encuentran beneficio en añadir ciclosporina A, especialmente en tumores avanzados.

Todos los estudios realizados muestran algún grado de respuesta a la quimioterapia, siendo mayor en los tumores de mayor tamaño. La respuesta satisfactoria a la quimioterapia se valora como^{240,205} la disminución del tamaño tumoral, de la vascularización, la aparición de calcificaciones o algún patrón de calcificación, la modificación del aspecto de la siembra vítrea y subretiniana o la reaplicación del desprendimiento de retina.

La mayor reducción de tamaño tumoral se produce tras los 2-3 primeros ciclos (dentro de los 2 meses siguientes a su inicio) y oscila en torno al 35-50%.^{242-243, 268-269} Si se compara con la radioterapia externa, la reducción de volumen tumoral al mes de iniciar el tratamiento es significativamente mayor con la quimioterapia (68% vs. 12%, $p < 0.004$); a los 12 meses la reducción es similar con ambas técnicas.²⁷⁰

Aunque en todos los estudios aparecen casos en los que la quimioterapia aislada consigue una respuesta tumoral completa, su objetivo es reducir el volumen tumoral para hacerlo accesible a las terapias locales²⁷¹. Los tratamientos locales deben aplicarse cuando el tumor alcanza su reducción máxima, es decir tras los 2-3 primeros ciclos, con lo cual la cicatriz residual será menor.

Se debe explorar al paciente coincidiendo con los ciclos de quimioterapia y tratar todos los tumores potencialmente activos (patrón II o III) o con signos de reactivación (aumento de tamaño o vascularización). El resultado final ideal es un patrón de regresión I o IV.²⁴⁰⁻²⁴² Algunos autores esperan a la reactivación del tumor inicial o la aparición de nuevos tumores intraoculares para aplicar el tratamiento de consolidación,^{243, 271-272} con lo que el tumor puede ser más grande, con menor probabilidad de respuesta y pueden ser necesarios más ciclos de quimioterapia.

Con quimioterapia aislada, sin tratamiento de consolidación asociado, la enfermedad progresa en el 83% de casos en estadíos I, II y III de Reese-Ellsworth y en el 100% de ojos de los grupos IV y V.²⁷¹ Además no se puede saber a priori qué tumores van a controlarse sólo con quimioterapia.²⁵⁰

La reducción del volumen tumoral puede dejar libre la fóvea en tumores parafoveales y permite la reaplicación del desprendimiento de retina, descrita en el 50-100% de los casos, evitando así la enucleación de ojos que conservan, al menos parcialmente, la funcionalidad visual.^{242-243, 273}

Las recurrencias del tumor inicial y aparición de nuevos tumores intraoculares pueden aparecer durante la quimioterapia²⁷⁴ y, especialmente, al terminar ésta. Las reactivaciones multifocales en la mitad inferior de la retina son frecuentes si hubo desprendimiento de retina, debiendo prestar especial atención a su aparición. Se han descrito nuevos tumores intraoculares en el 24-47% de ojos tratados con distintos protocolos de quimioterapia;^{240-241, 243} que suelen aparecer durante los 4-5 meses siguientes al diagnóstico y se relacionan significativamente con una menor edad al diagnóstico (60% en < 6 meses vs. 31% en > 6 meses, $p = 0.018$)²⁷⁵ y con la presencia de antecedentes familiares.²⁷⁶ No hay diferencias significativas en su localización intraocular, aunque estos nuevos tumores aparecen con menos frecuencia en la mácula. Como aparecen durante el seguimiento del paciente, se diagnostican en fases precoces de su desarrollo y suelen tratarse fácilmente con técnicas locales.

Hay riesgo de recurrencia durante los 3 primeros años de seguimiento. Se ha descrito un índice de recurrencia tumoral del 51% a los 3 años; la siembra vítrea y subretiniana tienen un 46% y 62% de riesgo, respectivamente. El principal factor predictivo de recurrencia tumoral es la presencia de siembra subretiniana al diagnóstico; los factores predictivos de recurrencia de la siembra subretiniana son una base del tumor mayor de 15 mm y la edad menor o igual a 12 meses al diagnóstico de la enfermedad.²⁷⁷ El porcentaje de recurrencia es mayor que con la radioterapia externa, pero el seguimiento y la combinación de terapias locales tiene un alto porcentaje de éxito.

Resulta difícil definir la supervivencia local, dado que los resultados de los distintos estudios difieren en el tiempo de seguimiento, protocolos de quimioterapia, terapias de consolidación y porcentaje de aplicación de radioterapia externa, variando entre el 63% y el 100%.^{194, 242-243, 251, 264, 278}

La pauta más ampliamente difundida, desde 1994, ha sido la asociación de quimioterapia (CEV) junto con tratamiento focal de consolidación.

En general suele aceptarse el uso de 3 ciclos de quimioterapia en el grupo B y 6 ciclos para tratar tumores del grupo C y D. En algunos centros se suprime el uso de etopósido en la pauta de tratamiento de los grupos A y B (tumor confinado a la retina) dada la posible asociación con el desarrollo de leucemia mieloide aguda secundaria.²⁷⁹

La quimiorreducción asociada a tratamientos locales generalmente consigue evitar la enucleación o la radioterapia externa en los grupos I, II y III de Reese-Ellsworth, pero es insuficiente en buena parte de los ojos con tumores extensos o con presencia de siembra vítrea o subretiniana difusas (grupos IV y V).^{245, 280-281} En estos últimos, la agudeza visual tras el tratamiento conservador habitualmente es pobre y la radioterapia externa o la enucleación suelen ser necesarias,²⁶⁴ siendo precisos un mayor número de ciclos de quimioterapia para reducir el tumor lo suficiente para obtener el control con terapias focales.²⁶⁸

Globalmente, el principal factor que determina la necesidad de radioterapia externa es pertenecer al grupo V de Reese-Ellsworth en el diagnóstico; si la enfermedad es unilateral además hay que valorar si el grosor tumoral es mayor de 5 mm y si asocia siembra vítrea al diagnóstico.

Los factores predictivos de enucleación son la presencia de un único tumor, el estadio V, la edad superior a 12 meses al diagnóstico, una distancia del tumor a la foveola ≤ 2 mm, el grosor tumoral > 5 mm y una base tumoral > 15 mm.

En general, la radioterapia externa y la enucleación serán necesarias en el 50% de ojos a los 5 años, ascendiendo al 68% en los casos unilaterales y al 100% para los ojos con estadio V y localización unilateral.²⁸²⁻²⁸³ La aplicación de radioterapia externa y enucleación aumenta con el tiempo de seguimiento, siendo mayor en los casos unilaterales.

Algunos autores encuentran mejores resultados en estos tumores de mal pronóstico con siembra vítrea asociando ciclosporina A a altas dosis, por la expresión de p-glicoproteína u otros mecanismos de resistencia.^{240, 205-206} El diseño de tests de quimiosensibilidad permitiría diseñar regímenes terapéuticos con mejores resultados.²⁸⁴

Los patrones de regresión observados tras la quimiorreducción son los descritos tras la radioterapia externa. El tipo I se corresponde histopatológicamente con una necrosis tumoral completa con calcificación residual, gliosis retiniana y fibrosis sin células tumorales viables. En el tipo II pueden aparecer células tumorales aparentemente viables con diferenciación en rosetas de Flexner-Wintersteiner en la base de la lesión que, con técnicas de inmunohistoquímica, demuestran no tener actividad proliferativa. Todos los ojos muestran algún grado de regresión tumoral en la histopatología, pero incluso en tumores con una reducción significativa de tamaño tras la quimioterapia puede encontrarse hasta un 90% de células tumorales viables y con actividad proliferativa, lo que refuerza la necesidad de aplicar tratamientos de consolidación hasta conseguir un patrón I o IV final. En los ojos enucleados por recurrencia de la siembra subretiniana o vítrea es frecuente identificar múltiples tumores microscópicos e indiferenciados.^{269, 285-286}

Además de los efectos secundarios asociados a cada uno de los agentes quimioterápicos de forma aislada, hay otros descritos asociados a la quimiorreducción asociada a tratamiento de consolidación:

- Desprendimiento de retina regmatógeno. (5-10% de niños sometidos a quimiorreducción asociada a crioterapia).²⁹² No hay estudios sobre su asociación

con termoterapia, pero puede producirse si se traspasa el umbral de termoterapia intermedia y se llega a fotocoagulación.

- Retinopatía Radiactiva. La quimioterapia aumenta el riesgo de retinopatía en pacientes tratados con radioterapia en placas, siendo conocido el efecto radiopotenciador del carboplatino.²⁹³⁻²⁹⁴ Suele aparecer a los 8 meses de su aplicación. Se recomienda reducir la dosis de braquiterapia a 25 Gy cuando se asocie carboplatino.²⁴¹
- Celulitis Orbitaria. Puede aparecer como una respuesta inmune a la necrosis tumoral masiva producida por la quimioterapia en tumores avanzados; el diagnóstico diferencial con la extensión tumoral extraocular es difícil.²⁹⁵
- Segundos Tumores. La quimioterapia puede aumentar el riesgo de segundas neoplasias no oculares, por lo que estos fármacos deben elegirse teniendo en cuenta el espectro de segundos tumores a los que los pacientes con retinoblastoma hereditario están predispuestos. Los fármacos alquilantes, especialmente ciclofosfamida, aumentan el riesgo de segundos tumores en pacientes con retinoblastoma hereditario y pueden disminuir su tiempo de aparición.^{252,296} El cisplatino se ha relacionado con leucemia aguda no linfocítica tras el tratamiento de osteosarcomas.²⁹⁷ El etopósido se ha relacionado con la aparición de leucemia mieloide aguda²⁷⁹ tras el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda, aunque utilizando pautas más intensivas y dosis superiores a las usadas en el retinoblastoma.²⁶⁰⁻²⁶¹ Estas leucemias asociadas al etopósido se relacionan con la translocación 11q23, no relacionada con el locus del gen del retinoblastoma.²⁹⁸ Se ha descrito también un caso de leucemia mieloide aguda tras quimioterapia con carboplatino, etopósido y vincristina en un retinoblastoma bilateral.²⁹⁹

7.1.4. Quimioterapia Local. Carboplatino subtenoniano

Es una técnica novedosa, utilizada desde 2002²⁸⁷ y que ha demostrado tener una buena penetrancia y mejorar la absorción intravítrea del carboplatino administrado de forma sistémica. Se ha demostrado en modelos animales que el carboplatino puede penetrar en la cavidad vítrea a través de la esclera y alcanzar dosis terapéuticas con una mínima toxicidad.²⁸⁸ Los resultados preliminares de la administración de carboplatino subconjuntival han sido alentadores, obteniéndose respuestas en ojos con siembra vítrea

persistente tras la quimioterapia sistémica.²⁸⁹⁻²⁹⁰ Su inyección subtenoniana en los ciclos precoces de la quimioterapia sistémica en los grupos C y D es bien tolerada y asegura un mejor contacto del fármaco con la epiesclera. El carboplatino se administra el mismo día por vía sistémica y subtenoniana. Se administra una media de 3 inyecciones de carboplatino con una concentración de 10 mg/ml (dosis total 2ml) en intervalos de 3 semanas, el lugar de la inyección es a 8 mm del limbo y se utiliza una aguja de 20 G con olive-tip sobre la esclera. Es aconsejable asegurar ecográficamente el lugar de la inyección. Puede realizarse como tratamiento primario o secundario del retinoblastoma. La respuesta aparece 3-4 semanas tras la administración y debe asociarse a otras terapias. Se ha descrito la aparición de edema local y pseudocelulitis, atrofia óptica y fibrosis de los tejidos blandos orbitarios que provoca restricción mecánica de la musculatura ocular extrínseca y dificulta enormemente la enucleación.²⁹¹

Es frecuente que parte del fármaco difunda a la orbita, y que como efecto secundario se observe una pérdida moderada de volumen orbitario.

7.1.5. Otras Vías de Administración de los Quimioterápicos

Para evitar los efectos secundarios de la quimioterapia se investigan nuevas vías terapéuticas como el empleo de análogos de la vitamina D, que ya han demostrado su efectividad y seguridad en modelos animales.³⁰⁰⁻³⁰¹

Dados los importantes efectos secundarios derivados de la quimioterapia sistémica no puede esperarse que este sea el mejor tratamiento posible para el manejo del retinoblastoma.⁶⁷ Los ojos de un niño de un año de vida pesan unos 5 grs cada uno, juntos constituyen alrededor del 0,2% del peso corporal total, y los efectos secundarios derivados de la quimioterapia afectan al 99,8% restante; la dosis total administrada es grande, y es potencialmente dañina para otros órganos, especialmente la medula ósea. Probablemente la administración local de los quimioterápicos junto con otros posibles agentes antitumorales sería el siguiente avance técnico que se precisase para el mejor manejo del retinoblastoma.

Kaneko y col. han desarrollado una técnica de inyección selectiva de melfalán en la arteria oftálmica, con un 97.5% de éxitos en 610 ojos con retinoblastoma. Se guía por

la carótida interna un balón-catéter que se coloca distal a la arteria oftálmica y se insufla en esa posición, permitiendo inyectar melfalán (5-10 mg/m²) localmente.³⁰²

También se están estudiando sistemas de liberación retardada de fármacos (implantes subconjuntivales de carboplatino),²⁸⁸ iontoforesis de ciclosporina A, inhibidores de la angiogénesis y el uso de quimioterapia intraocular.³⁰³ La inyección intraocular de tiotepa (2 mg/0.1 cc) y melfalán (0.008 mg/0.2 cc) debe reservarse para los casos en los que hayan fallado el resto de medidas conservadoras, considerando la posibilidad de diseminación extraocular. Kaneko y col. consiguen un 50% de control local en ojos con siembra vítrea persistente. También se investiga en modelos animales la eficacia y seguridad de la cirugía vítrea combinada con la infusión de citotóxicos.

7.2. CONSOLIDACION FOCAL

Inicialmente las distintas terapias focales se utilizaban en tumores pequeños seleccionados, a excepción de la braquiterapia, que consigue controlar tumores de tamaño medio, con siembras vítreas focales y recidivas tras radioterapia externa. Su uso se desaconsejaba en los casos de enfermedad multifocal o con alto riesgo de padecerla (casos hereditarios, bilaterales y de aparición precoz), así como en tumores grandes.

Con la llegada de la quimiorreducción sus indicaciones se han ampliado, ya que la quimioterapia reduce el tamaño de los distintos tumores aunque no los erradica y hace preciso aplicar métodos locales para lograr el control total.^{250, 271} Estas técnicas se aplican durante o tras la quimiorreducción. Se intenta así evitar las complicaciones de la radioterapia externa, relegando la enucleación a una última posibilidad terapéutica.

Se denomina métodos de consolidación local a los tratamientos que se aplican sobre el tumor residual, una vez se ha reducido con la aplicación de quimioterapia.

7.2.1. TERMOTERAPIA TRANSPUPILAR

El incremento de la temperatura por encima de los 37° C fisiológicos, hipertermia, se ha utilizado en el tratamiento de distintas neoplasias. Las condiciones de accesibilidad de los tumores intraoculares permiten su tratamiento aplicando calor en el ojo por medio de distintas técnicas de termoterapia: en general se utilizan semillas

ferromagnéticas, ultrasonidos, microondas o radiación infrarroja.³¹⁰ Este calor puede aplicarse en el ojo de forma local o global, evitando el segmento anterior.³¹¹ Clásicamente se aplica láser diodo hasta obtener un aumento moderado de la temperatura basal, en torno a 40-46°C, temperatura que se mantiene durante un largo periodo de tiempo que oscila entre 5 y 30 minutos. El objetivo no es la destrucción tisular del tumor, sino permitir una mayor efectividad de la quimioterapia.

Se ha comprobado que, en el caso concreto del retinoblastoma, cuando la temperatura basal aumenta por encima de 44° C aumenta la concentración intratumoral de los quimioterápicos, particularmente del carboplatino.³¹² Asociada a quimioterapia resultan ser dos técnicas que presentan una actividad sinérgica, esto es, que el efecto de ambas juntas es mayor que la suma de los efectos de cada una de forma individual³⁰⁴⁻³⁰⁴. El mecanismo por el que se desarrolla este proceso es desconocido, pero se maneja la hipótesis de que la hipertermia podría inducir la expresión de HSP (heat shock proteins)³⁰⁹ que desencadenarían un proceso de apoptosis, iniciarían señales de transducción y serían capaces de modular la resistencia a distintos fármacos.

La termoterapia es una técnica que se viene utilizando desde 1966.³¹³ el carboplatino y el cisplatino tienen acción sinérgica con temperaturas entre 40 y 42° C, aumentando la eficacia del fármaco. El carboplatino es el preferido en el tratamiento del retinoblastoma, dado el menor riesgo de nefrotoxicidad y ototoxicidad.³¹⁴ Es conocido que el etopósido también presenta sinergia con los agentes derivados del platino pero no al ser utilizado con estos en condiciones de hipertermia, lo que si ocurre al aplicar simultáneamente con hipertermia dos agentes derivados del platino.³¹⁵

Pueden utilizarse temperaturas entre 45° C y 60° C (hipertermia de nivel intermedio), por encima de los 60° C se produce la fotocoagulación del tejido (sólo produce una necrosis superficial de 0.2-1 mm). Esta hipertermia de nivel intermedio tiene un efecto citotóxico directo, produciendo lesiones cromosómicas, alteración de las membranas celulares, desnaturalización protéica y toxicidad mitocondrial que conduce a la necrosis tumoral.³¹⁶ Con temperaturas entre 42° C y 44° C no se observa una citotoxicidad directa, pero se potencia el efecto de la quimioterapia o la radioterapia; el calor inhibe los mecanismos de reparación del DNA tumoral.^{241, 310}

El método para aplicar hipertermia de nivel intermedio que más se ha utilizado es la termoterapia transpupilar (TTT).³¹⁷ La hipertermia se genera por la radiación infrarroja emitida por un láser de diodo con una longitud de onda de 810 nm que se adapta al oftalmoscopio indirecto y se aplica con una lente de no contacto o bien al microscopio quirúrgico utilizando lentes de contacto tipo Goldmann, Mainster o Rodenstock. Esta longitud de onda tiene una buena penetración tisular y una escasa absorción por los medios poco o nada pigmentados. El tamaño de spot varía según el sistema de adaptación, siendo 0.8, 1.2 y 1.5 mm los más utilizados; si la midriasis es amplia pueden emplearse spots de 2 y 3 mm. Para una misma potencia la temperatura alcanzada dentro de un spot más pequeño será mayor, aunque si durante el tratamiento la pupila se contrae puede utilizarse un spot menor del inicial sin que se aprecien cambios significativos en el calentamiento del tumor pues el calor se dispersa (la temperatura desciende 2° C por cada mm que nos alejamos del spot). El spot puede situarse en el centro del tumor (dispersándose el calor a través de éste) o puede moverse de una zona a otra hasta abarcar todo el tumor, incluyendo 1 mm de retina circundante. La potencia y el tiempo de exposición son variables. En tumores de 1.5-3 mm pueden utilizarse potencias de 300-400 mW, subiendo a 400-500 mW para tumores de 4.5-6 mm e incluso 600-700 mW en tumores mayores. El aumento de la dosis total se asocia a mayor recurrencia tumoral.³¹⁸ Los tumores pequeños requieren 10-15 minutos de tratamiento y los mayores 20-30 minutos. La necrosis tumoral alcanza una profundidad de 3.9 mm en el melanoma de coroides y llega a 6 mm en modelos experimentales.³¹⁶ La sesión de termoterapia termina cuando la superficie tumoral se blanquea, lo que aumenta la reflectividad del tejido y disminuye la penetración del calor. Dado el color nacarado del tumor resulta difícil determinar cuando se produce su blanqueamiento, por lo que es más fácil observar éste efecto en los márgenes.

La termoterapia transpupilar está indicada en el tratamiento de retinoblastomas posteriores al ecuador sin siembras vítreas o subretinianas asociadas, especialmente en niños menores de 6 meses y con afectación bilateral con tumores pequeños situados en el polo posterior en los que el tratamiento de elección hasta la aparición de la termoterapia era la radioterapia externa, con un porcentaje de éxito muy alto a costa de importantes efectos adversos.

La termoterapia aplicada utilizando láser diodo transpupilar junto con la administración de carboplatino fue descrita por primera vez por Murphree en 1992.³¹⁹ Fue quien introdujo el término termoquimioterapia para este tratamiento, eficaz en el

manejo de tumores del polo posterior. Este mismo grupo demostró en 1996 mediante xerografía, el aumento de concentración del carboplatino intracelular tumoral en la cámara anterior del conejo.²⁴¹ Un alto número de publicaciones confirman el beneficio de la combinación de termo y quimioterapia en el tratamiento del retinoblastoma tanto en modelos animales como en pacientes.³²⁰⁻³²³

No existe consenso sobre el tamaño tumoral a tratar ni sobre cuando aplicar termoterapia transpupilar aislada o quimioterapioterapia, variando los protocolos de ésta última en cuanto a fármacos y modo de aplicación. Murphree y col. describen un 100% de efectividad en tumores retroecuatoriales menores de 15 mm con un protocolo de dos sesiones de termoquimioterapia, pero concluyen que sólo estaría indicada en tumores menores de 6 mm de diámetro, mientras que los mayores de 6 mm responden mejor a una pauta de quimiorreducción seguida de tratamientos focales.²⁴¹ Shields y col. inicialmente indican su uso en tumores de hasta 12 mm e incluso en tumores de mayor tamaño cercanos a papila o fovea y posteriormente limitan el uso de la termoterapia aislada a tumores < 3-4 mm de diámetro y < 3 mm de altura, consiguiendo un 86% de control.^{268, 324} Lumbroso y col. indican termoterapia en tumores < 3 mm de diámetro y termoquimioterapia en dos sesiones en los tumores \geq 6 mm, contraindicando su uso en los mayores de 15 mm; un diámetro inicial mayor de 3.5 mm se asocia con una mayor tasa de recurrencia tumoral.³²⁵ El límite de altura del tumor a tratar estaría en 4 mm, con recurrencias del 63% en tumores mayores.³²⁶ En tumores > 6 mm de altura puede asociarse a placas radioactivas utilizando una técnica en “sandwich” en la que la base tumoral se trata con braquiterapia y el ápex con termoterapia.

La termoterapia transpupilar produce una reducción progresiva del retinoblastoma con una cicatriz de escaso tamaño, lo que es de especial importancia para la conservación de la agudeza visual, aunque esta cicatriz puede aumentar con el tiempo. Cuando se aplica cerca de la mácula es preferible reducir la potencia y el tiempo de exposición y aumentar el número de sesiones para evitar tracciones.³²⁷⁻³²⁸ Otros autores no encuentran mejor agudeza visual en melanomas coroideos tratados con termoterapia transpupilar frente a braquiterapia.³²⁹ Debe obtenerse un patrón de regresión 0 o I para asegurar su control. El patrón tipo II y la aparición de anastomosis retinocoroideas se asocian a un mayor riesgo de recurrencia local.³²⁶

Aunque se asocia a menos complicaciones que otros tratamientos locales, se ha descrito un mayor índice de recaídas y formación de siembras vítreas.³³⁰ En general, las complicaciones son leves: atrofia focal de iris (8-36%), opacidades periféricas del cristalino (6-24%), opacidad corneal transitoria (6%), tracción y fibrosis retiniana (5%), desprendimiento de retina exudativo transitorio (2-3%) y obstrucción vascular retiniana (2%).³²⁶ No deben tratarse masas calcificadas, pues la retracción post-tratamiento puede producir microagujeros retinianos y desprendimiento de retina regmatógeno. En ocasiones se produce una necrosis aguda intratumoral que produce celulitis orbitaria y signos de afectación masiva intraocular.

7.2.2. FOTOCOAGULACION

Desde que Meyer-Schwickerath utilizara el arco de xenón en el tratamiento del retinoblastoma, se han empleado distintos tipos de láser con éste fin. El láser de argón (532 nm) y el láser de diodo (810 nm), acoplados al oftalmoscopio indirecto, han sido los más utilizados. El láser de diodo aplicado con una sonda transescleral ha sido utilizado para tratar retinoblastomas pequeños periféricos.³³¹⁻³³²

La fotocoagulación consigue la destrucción tumoral directa, dando lugar a quemaduras, tanto en el tumor como en la retina circundante. El objetivo que persigue es acotar el aporte sanguíneo tumoral. Puede alcanzar temperaturas de hasta 70° C, y la cicatriz que se produce se extiende alrededor de 1-2 mm en torno al spot donde se ha aplicado. Cualquier longitud de onda es eficaz, siempre y cuando la energía aplicada sea absorbida, ya que solo en ése caso se consigue el aumento de la temperatura. Las longitudes de onda más cortas (verde, argón) se absorben por los retinoblastomas no pigmentados. Las longitudes de onda más largas (810 nm, infrarrojos) son absorbidas por el epitelio pigmentario de la retina.

La fotocoagulación puede utilizarse como tratamiento primario o complementario tras el fracaso de la radioterapia externa u otras técnicas locales. Aunque su uso más extendido es como complemento a la quimiorreducción. Sus principales indicaciones son:

- Tumores confinados a la retina sensorial, sin siembra vítrea o subretiniana.
- Tumores posteriores al ecuador; alejados al menos 4 mm de la fóvea y que no contacten con papila. (En lesiones periféricas puede aplicarse el láser de diodo transescleral.)

- Tumores pequeños, en general menores de 4.5 mm de base y 2.5 mm de altura (en tumores mayores el éxito se limita al 20%). En el 25-30% de casos es preciso asociar otras terapias, especialmente en los tumores de mayor tamaño.³³³

La técnica que se aplica cuando se utiliza el láser argón (532 nm), habitualmente en pacientes del grupo A o como tratamiento de consolidación en los del grupo B-D, es fotocoagular durante el segundo o tercer ciclo de quimioterapia y tiene como objetivo la tercera parte de la lesión en cada sesión, aplicando un total de tres sesiones, así se previene la rotura del tumor o la aparición de hemorragias (cuando se acumula demasiada energía); se coloca el spot de tal forma que la mitad de su área ocupe superficie tumoral y la otra mitad la retina circundante. Se aplica hasta conseguir el blanqueo. Cuando aparece un punteado sanguinolento sobre la lesión significa que se está liberando el máximo de energía. Cuando toda la lesión se ha rodeado el tumor entra en una fase de regresión tipo I. Las sesiones de fotocoagulación se aplican con intervalos de 2-4 semanas, durante la administración de la quimioterapia.

La técnica cuando se aplica láser diodo es algo diferente, la energía aplicada es absorbida por el epitelio pigmentario. La mayor ventaja respecto al láser argón es que el spot es de mayor tamaño y permite una cobertura total del tumor con menor número de impactos, teniendo también un menor riesgo de disrupción y hemorragia. Es más útil en lesiones primarias, es decir, en tumores que conserven el epitelio pigmentario intacto bajo la lesión a tratar. En general, se realiza una doble barrera de impactos alrededor del retinoblastoma hasta conseguir un blanqueo confluyente de 1 mm de la retina circundante al tumor, extendiéndose 0.5 mm más alrededor de los vasos sanguíneos; también puede emplearse un spot de exposición continua.³³⁴ No se utiliza directamente sobre el tumor para evitar la rotura de la membrana limitante interna y su diseminación al vítreo y retina adyacentes. De este modo se consigue la isquemia y la necrosis de la lesión. En caso de regresión tumoral completa se observará a las 3-5 semanas del tratamiento una cicatriz coriorretiniana plana o deprimida, en ocasiones calcificada; suelen necesitarse 1-3 sesiones por tumor. La realización de una angiografía fluoresceínica puede ayudar a determinar qué tumores responderán a este tratamiento y en cuáles se conseguirá una erradicación total.

En cuanto a las complicaciones derivadas de la consolidación con láser, se han descrito quemaduras del iris y el margen pupilar, opacidad del cristalino, hemorragia vítrea y/o subhialoidea, nódulo orbitario (pseudonódulo) cuando se aplican varias sesiones en un área próximo a la salida del nervio óptico, adelgazamiento y excavación escleral, disminución de la agudeza visual por progresión de la cicatriz hasta el área foveal, rotura de la membrana de Bruch y progresión tumoral y condensaciones y tracciones vítreas cuando hay una aplicación excesiva.

La aplicación del láser provoca un aumento de los factores de crecimiento locales como mecanismo protector natural. Cuando se produce un recrecimiento precoz puede ser una señal de resistencia tumoral al calor, que podría estar incluso genéticamente predispuesta.

7.2.3. CRIOCOAGULACION

Lincoff fue el primero en utilizar la crioterapia en el tratamiento del retinoblastoma y otros tumores intraoculares.³³⁵

La destrucción tumoral se produce cuando los cristales de hielo rompen directamente la pared de las células tumorales. Además del tumor también se daña la coroides subyacente, evitando la diseminación tumoral por esta vía, preservando la membrana de Bruch y la membrana limitante interna.

La crioterapia destruye también la retina perilesional, produciendo un aumento de tamaño de la mancha ciega debida al tumor. Habitualmente si se aplica en el área posterior al ecuador desencadena importantes efectos adversos permanentes, por daño directo sobre la fovea o como resultado del arrastre de líquido subretiniano.

Habitualmente como el terminal de criodo es bastante grande, con dos o tres aplicaciones con intervalos de un minuto se consigue blanquear toda la lesión en la misma sesión. Se aplica bajo control con oftalmoscopio indirecto y lente de 28 o 20 D, realizándose la triple congelación-descongelación.

El frío se aplica indentando la esclera con la criosonda hasta congelar el tumor, observando la aparición de cristales de hielo en su superficie y en la retina circundante. A las 3-5 semanas se explora al paciente; si se aprecia tumor viable se repite el tratamiento, en caso contrario se observará una cicatriz más o menos pigmentada, plana, avascular y bien delimitada, similar al patrón de regresión tipo IV de la radioterapia. Los tumores < 1 mm de altura y < 1.5 mm de diámetro suelen erradicarse con una única

sesión, los tumores de mayor tamaño necesitan más de una sesión o asociar otra terapia focal.

Sus indicaciones son:

- Tumores del grupo A anteriores al ecuador, cuando el tumor está limitado a la retina neurosensorial. No debe usarse con siembras vítreas sobre la lesión.
- Lesiones de menos de 2.5 mm de diámetro y menores de 1 mm de espesor,³³⁶ confinadas a la retina neurosensorial y sin siembras vítreas, con un 100% de éxito terapéutico. Se contraindica en los mayores de 3.5 mm de diámetro o de 2 mm de altura.³³⁷ Otros autores aceptan su uso en tumores pequeños, en general menores de 3.5 mm de diámetro y 3 mm de altura. Abramson y col. tratan con éxito tumores de hasta 7.5 mm, asociando otras terapias focales o desplazando el criodo sobre la lesión hasta abarcarla por completo.³³⁸⁻³³⁹

La aplicación en lesiones en el polo posterior está muy limitada, no solo por la dificultad en el acceso, sino por el riesgo de aplicar el frío directamente sobre el nervio óptico con el riesgo de amaurosis.

No es efectiva en el tratamiento de las siembras vítreas, ni siquiera en siembras menores de 2 mm de altura localizadas en la base del vítreo inferior,³³⁹ tampoco es efectiva en tumores localizados en el cuerpo ciliar o ángulo iridocorneal, aunque haya tenido éxito en siembras de pequeño tamaño.⁸⁰

Como complicaciones pueden desarrollarse hemovítreo y hemorragias subretinianas (sobretudo si previamente se aplicó radioterapia externa), acumulo de líquido subretiniano y desprendimiento exudativo transitorio, que puede prevenirse realizando una barrera de láser semicircular y posterior al tumor inmediatamente antes de aplicar la crioterapia,²⁴⁰ desprendimiento de retina regmatógeno, cuando hay muchas aplicaciones, por el desarrollo de tracciones vítreas y atrofia retiniana en el margen de las cicatrices,³⁴⁰⁻³⁴¹ también mas frecuente si se ha precedido de radioterapia externa.³⁴² Si se aplica crioterapia sobre tumores parcialmente calcificados pueden formarse microagujeros con las espículas de calcio que conducen al desprendimiento regmatógeno.³⁴³ La aplicación de crioterapia en exceso puede desencadenar una atrofia escleral con formación de una placa de escleromalacia.

Se ha descrito que la crioterapia aplicada 24 horas antes de administrar carboplatino aumenta su penetración en el vítreo por medio de un proceso exudativo, lo que podría servir en el tratamiento de las siembras vítreas y subretinianas.³⁴⁴ aunque la

mayoría de los autores consideran que no se deben aplicar de forma conjunta, al menos el carboplatino subtenoniano, dado que la concentración que puede alcanzarse a nivel intraocular puede resultar tóxica.⁶⁷

La aparición de desprendimientos de retina extensos y persistentes - exudativos o regmatógenos - facilita la siembra tumoral subretiniana y puede hacer fracasar el tratamiento, por lo que la aplicación de esta técnica debe hacerse con precaución.

La presencia de desprendimiento de retina perilesional es solamente una contraindicación relativa.

7.2.4. RADIOTERAPIA EXTERNA (TELETERAPIA)

Fue el tratamiento primario de elección durante casi todo el siglo XX. Hilgartner fue el primero en utilizar radioterapia en el tratamiento del retinoblastoma, en 1903.¹⁵⁴ Verhoeff describe en 1921 el primer caso de retinoblastoma curado con radioterapia, conservando una agudeza visual normal.³⁴⁵ Los pioneros en proponer el nuevo protocolo terapéutico fueron Verhoeff y Reese, a principios de siglo. Se establece así lo que va a ser el tratamiento habitual del retinoblastoma en los siguientes cincuenta años: la enucleación del ojo afecto en los casos unilaterales y la enucleación del ojo con el tumor más avanzado y radioterapia del ojo menos afectado en los casos bilaterales.³⁴⁶

La confirmación histopatológica de esta primera curación con radioterapia se produce en 1990.³⁴⁷ Las primeras unidades de ortovoltaje producían graves deformidades óseas, pero la introducción de aparatos de megavoltaje y el refinamiento de las técnicas de tratamiento fue mejorando los resultados llegando a una tasa aceptable de complicaciones.³⁴⁸

El retinoblastoma es un tumor radiosensible, las ratios de control y salvación del órgano visual eran relativamente elevadas.³⁴⁹⁻³⁵⁰ Los objetivos de la radioterapia externa era conseguir la supervivencia del paciente y globo ocular y preservar la visión mediante la aplicación de una dosis de radiación homogénea y tumoricida en toda la retina y vítreo, respetando el segmento anterior del ojo y los tejidos adyacentes y evitando el ojo contralateral si está sano. El logro de estos objetivos ha ido mejorando con el desarrollo de la técnica y la adición de nuevos tratamientos, así Reese describe en 1949 una supervivencia ocular del 58.6% (con un 22.6% de muertes).³⁴⁶ En 1969 Ellsworth presenta un 29% de supervivencia ocular en ojos del grupo V de Reese-

Ellsworth, mientras que Hungerford describe en 1995 para éste mismo grupo una supervivencia del 45% utilizando sólo radioterapia externa y del 66% asociando terapias focales (crioterapia, fotocoagulación láser y braquiterapia), con una supervivencia ocular global del 80%.^{142, 351}

Con la quimiorreducción se ha descrito que la supervivencia asciende al 100% para los ojos en estadíos I-IV y al 78% para los ojos del grupo V.²⁶⁸

Las indicaciones de la radioterapia externa han ido evolucionando; así, mientras que inicialmente se aplicaba en el ojo menos afectado de los casos bilaterales, sin considerar su extensión, con enucleación del adelfo, según se incorporaban los distintos tratamientos focales al arsenal terapéutico se han ido reduciendo sus indicaciones.¹⁴¹

Después de décadas de uso la aparición de las segundas neoplasias malignas hizo saltar la voz de alarma. Se ha descrito que la radioterapia externa en niños con mutaciones germinales en el gen RB supone un incremento del riesgo de muerte por neoplasias secundarias del 30% a los 40 años frente a un riesgo del 6% en los no radiados (considerando todos los retinoblastomas bilaterales portadores de mutación en la línea germinal), especialmente en niños menores de 12 meses.²⁴⁸⁻²⁴⁹

Pese a todo, la radioterapia externa aún tiene un papel importante en el control del retinoblastoma por varias razones; los retinoblastomas no se curan sólo con quimioterapia y las terapias focales no pueden solucionar todos los casos,³⁵² para algunos autores toda la retina está en riesgo: pueden aparecer nuevos tumores mientras los iniciales responden al tratamiento y distintos tumores en el mismo ojo tienen diferentes respuestas en un mismo tiempo³⁵³ y las siembras vítreas y subretinianas tienen una alta recurrencia.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, la radioterapia externa estaría indicada en:

- Retinoblastomas avanzados, con un diámetro basal mayor de 15 mm y posibilidad de preservar una visión útil.
- Presencia de siembra vítrea difusa.
- Tumores múltiples no susceptibles de tratamiento local tras quimiorreducción.
- Tumores cercanos a mácula o papila; en estos casos debe individualizarse el tratamiento y considerar el uso de termoterapia transpupilar o braquiterapia.

- Fracaso del control tumoral con quimiorreducción y terapias focales.
- Afectación residual del nervio óptico tras enucleación y/o extensión orbitaria.

Hay autores que aconsejan la enucleación de los casos unilaterales por el riesgo de recurrencias, pero hay que considerar que un 10-20% de éstos bilateralizan, especialmente los casos multifocales, diagnosticados antes del año de edad o con antecedentes familiares de retinoblastoma, en ocasiones meses o años tras el diagnóstico del primer ojo.^{49,354} Además sólo el 15-20% de los retinoblastomas esporádicos unilaterales se deben a mutaciones germinales, con lo que el riesgo de segundos tumores radioinducidos es menor y puede aplicarse radioterapia externa como tratamiento primario o como técnica de consolidación tras la quimiorreducción, con cierta seguridad.

En los pacientes con afectación bilateral, algunos autores defienden la enucleación de todos los ojos del grupo V de Reese-Ellsworth.^{141, 198} Otros defienden el uso de la radioterapia externa en ambos ojos siempre que exista potencial visual, incluso en enfermedad avanzada, pues es difícil predecir qué ojo tiene más posibilidades de conservación.³⁵⁵⁻³⁵⁶

Se ha descrito el retratamiento de recurrencias con radioterapia externa, con un 80% de control en los grupos I-II-III de Reese-Ellsworth y un 2.2% en los grupos IV-V, sin que éste segundo ciclo aumente el riesgo de segundos tumores.³⁵⁷ Actualmente esto está en desuso, con la incorporación de la quimiorreducción y el desarrollo de las terapias locales. Aunque se ha descrito el efecto profiláctico de la radioterapia externa sobre el desarrollo de nuevos tumores intraoculares, posiblemente por la destrucción de pequeños tumores no visibles oftalmoscópicamente, tampoco se indica la radiación profiláctica de un ojo normal con antecedentes familiares de retinoblastoma.³⁵⁸

El tratamiento de cada paciente debe individualizarse según los hallazgos clínicos. Las distintas técnicas de tratamiento pueden dividirse en dos grandes grupos: las que radian todo el globo ocular y las técnicas que evitan el cristalino. En todos los casos es preciso una sedación profunda y una monitorización adecuada del paciente. La cabeza debe estar inmovilizada de forma que la posición sea reproducible, dado que se administrarán varias sesiones. Es preciso un estudio previo detallado de ecografía y TC con cortes de entre 1 y 3 mm, donde se haga un cálculo preciso del tamaño, forma y ángulos óptimos para minimizar la radiación de los tejidos circundantes. Habitualmente

se emplean protones en lugar de fotones, lo que proporciona un uso más manejable con concentraciones efectivas de radiación en la retina o en el volumen diana. Hay distintos protocolos de administración de radioterapia, todos ellos valoran las curvas de isodosis.

Técnicas que evitan cristalino y segmento anterior. Indicadas en los grupos I, II y III de Reese-Ellsworth y en casos seleccionados del grupo IV (tumores precuatoriales tratados previamente con crioterapia o braquiterapia). Están contraindicadas en caso de tumor no tratado anterior al ecuador, siembra vítrea y desprendimiento de retina extendido a la ora serrata.³⁵⁹ El paciente debe explorarse bajo anestesia y en posición de tratamiento para localizar la ora serrata, que en el lactante suele estar a 6-7 mm del limbo corneal cuando las pupilas están en posición central. La distancia entre la ora serrata y la cápsula posterior del cristalino es de 1 mm en el niño y debe tenerse en cuenta en la aplicación de éstas técnicas.

- “lens-sparing electrón beam approach” (1979-1984) Schipper y Harnett sitúan el límite anterior del campo de radiación justo detrás del cristalino mediante la fijación del ojo en posición central con una lente de contacto de bajo vacío unida con una escala magnética milimetrada al chasis del colimador.³⁶⁰⁻³⁶¹ Puede utilizarse un campo lateral, si el ojo contralateral ha sido enucleado, o un campo angulado 40° en dirección superoinferior que evite el ojo contralateral si está sano. También pueden emplearse campos laterales horizontales opuestos en enfermedad bilateral.
- “técnica lateral modificada” (1984-1987) El campo lateral conformado en forma de “D” incluye toda la retina y vítreo, así como 10 mm del nervio óptico, evitando cristalino, hipófisis y raíces dentarias. El haz puede angularse posteriormente si el ojo contralateral está sano para evitar irradiar su cristalino.³⁶²
- La técnica de “beam-splitting” o haz dividido evita la divergencia del haz en su límite anterior. El cristalino recibe así sólo el 10% de la dosis administrada, pero la ora serrata sólo recibe el 50%.³⁶³

La mayor dificultad es el control de los movimientos oculares, también presentes bajo anestesia general, se han desarrollado distintos métodos para intentar inmovilizar

los globos oculares;^{189,360-361,364} preservando la irradiación del cristalino se consigue reducir la incidencia de catarata, sobretodo de la que precisa cirugía.

Técnicas de irradiación global. Persiguen aplicar una radiación homogénea en toda la retina y vítreo, incluyendo su porción más anterior, pues se ha descrito que hasta un 80% de los ojos enucleados presentan tumores en la periferia retiniana que no resultarían tratados con las técnicas anteriores. Como afectan a la totalidad del vítreo están indicados también con presencia de siembra vítrea difusa.^{115,141,351,356}

- El campo de irradiación puede ser anterior, si el ojo contralateral está sano. Esta técnica es sencilla y fácilmente reproducible e irradia de forma homogénea toda la retina y vítreo, pero no se protegen el cristalino ni las glándulas lagrimales y el haz de salida irradia parte del cerebro. Se asocia con una mayor incidencia de retracción palpebral, madarosis, enoftalmos y déficit de hormona de crecimiento.³⁶⁵
- Si el ojo contralateral ha sido enucleado puede utilizarse un haz lateral que salga por la cavidad anoftálmica y evite radiar el cerebro. Si ambos ojos necesitan tratamiento pueden emplearse campos laterales paralelos y opuestos.
- La combinación de un campo directo anterior y un campo lateral permite proteger el cristalino con un blindaje de plomo montado en una lente de contacto (aunque pequeños movimientos de ésta afectan la dosis a través del campo anterior).

La dosis y pauta de fraccionamiento óptimos para el tratamiento del retinoblastoma no están claramente definidas, siendo difícil establecer una relación dosis-respuesta. La mayoría de centros administran dosis de 40-45 Gy, con una dosis diaria de 1.8-2 Gy administrados cinco días por semana.^{115,359-360,366-367} Algunos autores recomiendan dosis de 45-50 Gy en los tumores grandes y/o con siembra vítrea,^{110,362,366} pero podría pensarse que, incluso en los estadios más avanzados, el retinoblastoma no deja de ser un tumor pequeño y la imposibilidad de controlarlo con 40-45 Gy indicaría una radiosensibilidad pobre.

En caso de afectación del nervio óptico, invasión coroidea o extensión orbitaria evidenciada tras enucleación debe realizarse radiación orbitaria con dosis de 50-55 Gy.

En los últimos años se ha propuesto utilizar la radioterapia externa como terapia de “rescate” para conservar el ojo si persiste actividad tumoral tras la quimiorreducción, utilizando una dosis baja “hiperfraccionada”: 2 veces al día, con menos dosis por sesión y menor dosis total (50% de dosis tradicional). El desarrollo de nuevas técnicas guiadas por soportes informáticos permite reducir la radiación a los tejidos adyacentes aplicando la dosis habitual de 45 Gy. Esta técnica se denomina **radioterapia de intensidad modulada**. El objetivo es reducir su morbilidad, en especial el riesgo de segundos tumores, y conseguir el control del tumor intraocular.³⁶⁸⁻³⁶⁹ es eficaz reduciendo la dosis recibida por los tejidos circundantes y es aplicable en la mayoría de los centros con radioterapeutas.

Utilizando técnicas informáticas se bloquea selectivamente algunas áreas en el volumen susceptible de tratamiento pudiendo prescribir la fracción de radiación, el tiempo y la intensidad de radiación en cada campo. Se hace una reconstrucción del campo valorando la posición de la cabeza y la impresión dental. Consigue reducir la radiación de la órbita ipsilateral y contralateral y del esfenoides en la aplicación lateral. Los resultados dependen del estadio de la enfermedad y de la posibilidad de asociar otras terapias para las recurrencias locales. Así, en los grupos IV y V de Reese-Ellsworth el control local varía entre el 31% y el 70%;^{362,355} Hungerford y col. describen un 45% de supervivencia ocular en el grupo V con radioterapia aislada, que aumenta al 66% asociando terapias focales.³⁵¹ El control local en los grupos I, II y III se sitúa en el 85-90%. La supervivencia ocular global oscila entre el 57% con radioterapia externa aislada y el 80-85% asociando otros tratamientos.^{351,356}

El control local con las técnicas que evitan el cristalino oscila entre el 58-93%, y el 29-72%, según si se asocian o no otras terapias. En los grupos I, II y III el éxito alcanza el 73-100%, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en el control local comparando con las técnicas de irradiación global.^{115,359} Las técnicas que evitan el cristalino asocian una mayor incidencia de nuevos tumores (19% frente a un 5% en los ojos tratados con irradiación global; $p = 0.001$), el 93% de ellos son anteriores al ecuador (22% con irradiación global; $p = 0.004$). Ésta mayor frecuencia de nuevos tumores no reduce la tasa de supervivencia ocular, pues generalmente se pueden tratar con crioterapia o braquiterapia,^{351,359} sin embargo, la tasa de enucleación por complicaciones de la radioterapia es mayor con las técnicas de irradiación global.³⁷⁰

El 25% de casos no responden completamente, y requieren un tratamiento adicional por la aparición de nuevos tumores o la recurrencia del tumor inicial.³⁷¹ Se ha descrito que el 78% de estas recurrencias aparecen en el primer año y el 95% dentro de los 2 años tras la radioterapia,³⁵¹ por lo que se considera necesario un seguimiento mínimo de 2 años. Para otros autores, aquellos tumores que están inactivos 9 meses tras la radioterapia pueden considerarse curados,³⁷² mientras que otros señalan recurrencias hasta 40 meses después. Éstas recurrencias se han relacionado con el estadiaje y el tamaño tumoral inicial.^{371,373}

La conservación del ojo con una visión útil es otro de los objetivos de la radioterapia externa. Migdal describe un 25.8% de ojos con visión ≥ 0.5 y un 55.2% de enucleaciones.³⁷⁴ La tasa de ojos con visión conservada alcanza el 85-100% en los estadios I, II y III; este porcentaje baja al 67-93% para el grupo IV y al 10-25% en el grupo V de Reese-Ellsworth.^{115,355,375}

El patrón de regresión más frecuentemente desarrollado tras la radioterapia externa es el tipo II,³⁷¹ para otros autores es el tipo III.³⁷⁶ En ocasiones su interpretación puede ser difícil. Varios patrones pueden presentarse al mismo tiempo, y en ocasiones unos tipos derivan en otros.³⁷⁷

Las aparición de complicaciones tras la administración de radioterapia externa depende de tres factores: dosis total, fraccionamiento de dosis y técnica de radioterapia, por lo que su frecuencia de aparición en las distintas series es muy variada. En algunos casos pueden aparecer incluso años tras la aplicación de la radioterapia.

- Catarata radioinducida. La estructura ocular mas radiosensible es el cristalino.³⁶⁰ La incidencia de catarata varia entre el 0%, con técnicas de protección de cristalino y fraccionamiento de 2 Gy, y el 100% con técnicas de campo anterior.^{351,359} La dosis mínima cataratogénica oscila entre 2 y 10 Gy,³⁷⁸ apareciendo catarata si el haz de irradiación incluye más de 1 mm de cristalino,³⁶⁰ tanto en la técnica con protección del cristalino como en la de campo lateral modificado la incidencia de desarrollo de catarata es del 22%.³⁷⁸ El uso de lentes de vacío para fijar el globo ocular parece proteger del desarrollo de cataratas susceptibles de cirugía.^{170,349} El periodo de latencia es variable y dosis-dependiente, disminuyendo cuando se aumenta la dosis; suelen aparecer entre los 12-20 meses post-radioterapia, por lo que no interfieren en el control

- oftalmoscópico durante el periodo de riesgo de recurrencia tumoral.^{362,356} Su tratamiento quirúrgico una vez asegurada la regresión tumoral permite una adecuada recuperación funcional.³⁷⁹⁻³⁸¹ Se ha propuesto un periodo de un año de inactividad tumoral previo a la cirugía de la catarata.³⁸²
- Hipoplasia Orbitaria. La radiación inhibe el crecimiento óseo orbitario, hay que tener especial precaución en menores de 6 meses. La enucleación secundaria no parece tener un efecto aditivo en el desarrollo de la hipoplasia. Su aparición depende de la dosis total administrada y de su fraccionamiento.³⁸³ Los defectos pueden ser más visibles en la adolescencia, requiriendo cirugía reconstructiva.
 - Retinopatía y Neuropatía Óptica. La retinopatía radiactiva consiste en la aparición de edema retiniano, telangiectasias, oclusión vascular retiniana, desprendimiento de retina exudativo, hemorragia vítrea y neovascularización, así como alteraciones en la circulación coroidea. Es un efecto dosis dependiente. Puede confundirse con una recurrencia tumoral, ya que los pequeños infartos coroideos que aparecen simulan exudados subretinianos.³⁸⁴ Las alteraciones vasculares a nivel del nervio óptico pueden causar una neuropatía óptica.^{293,294,385} Su frecuencia se ha reducido al disminuir la dosis total e incrementar el fraccionamiento; así con una dosis total de 42 Gy y fraccionamiento de 2 Gy aparece en un 5% de los casos, mientras que con la misma dosis y fraccionamiento de 3.75 Gy aparece en un 25%.^{115,372,386} Con la asociación con quimioterapia, especialmente carboplatino, la neuropatía puede aparecer con dosis más bajas.^{241,360} El edema macular puede beneficiarse de la fotocoagulación láser utilizando el esquema terapéutico del edema macular diabético clínicamente significativo; en caso de neovascularización puede ser necesaria la panfotocoagulación retiniana.³⁸⁷
 - Deterioro Cognitivo. Se ha descrito que los niños radiados en los primeros meses de vida pueden estar en riesgo de padecer alteraciones cognitivas por efecto de la radiación sobre el cerebro en desarrollo, hasta en un 46% de los casos,³⁸⁸ aunque otros autores no encuentran diferencias en el desarrollo cognitivo y motor aparte de su discapacidad visual.³⁸⁹ También se ha descrito la asociación con un déficit de la hormona de crecimiento, cuando se aplica a niños por menores del año de edad.

- Xeroftalmía. Aparece con más frecuencia con la irradiación global, en especial con campo anterior, aunque se ha descrito en un 28% de casos con técnicas de protección de cristalino.³⁹⁰ Su período de latencia es variable. El daño corneal puede ser leve o severo, con opacificación y desarrollo de queratopatía en banda que impida un seguimiento adecuado del proceso tumoral. Puede necesitar la colocación de tapones de colágeno o la realización de tarsorrafia.
- Dermatoconjuntivitis. Leve y transitoria, aparece durante el tratamiento o poco tiempo después de finalizarlo; también puede asociar madarosis.
- Segundas neoplasias malignas. En general, numerosos estudios han demostrado una mayor incidencia de segundas neoplasias en pacientes con mutaciones germinales en el gen RB. Ésta incidencia es del 4-12% a los 10-12 años y aumenta al 8-18% a los 18-20 años, con un periodo de latencia medio de 10-13 años,^{252,391-392} aunque oscila entre 3 y 30 años.³⁹³ Sin embargo, la frecuencia aumenta con el uso de radioterapia externa,³⁹⁴ así la incidencia acumulada de segundas neoplasias en pacientes con retinoblastoma bilateral tratados con radioterapia externa es del 35% a 30 años, frente al 6% en pacientes no radiados; la incidencia acumulada dentro del campo de irradiación es del 29% a 30 años, siendo del 8% fuera de éste.³⁹⁵ En general se considera que los tumores que aparecen en el campo de radiación son radioinducidos, habiéndose encontrado una relación directa entre el incremento de dosis y el riesgo de desarrollar cáncer óseo.³⁹⁶ La especificidad tisular y el corto periodo en la aparición de tumores radioinducidos sólidos en los supervivientes de retinoblastoma heredables tratados con radioterapia hace consistente la hipótesis de que el efecto de la radiación en las células predispuestas lleve a desencadenar segundos tumores.³⁹⁷ El riesgo acumulado de desarrollar una segunda neoplasia en pacientes radiados en la infancia sin retinoblastoma es del 13% a 30 años.^{249,398-399}

Se ha descrito que la radioterapia externa en niños con retinoblastoma bilateral supone un incremento del riesgo de muerte por neoplasias secundarias del 30% a los 40 años frente a un riesgo del 6% en los no radiados, especialmente en niños menores de 12 meses.²⁴⁸⁻²⁴⁹ Otros autores no encuentran una mayor incidencia de segundos tumores en los niños radiados antes del año de edad y creen que el riesgo estaría determinado genéticamente y no por el uso de la radiación.^{392,400,401}

El 80% del total de estas segundas neoplasias malignas en el campo de radiación está ocupado por osteosarcomas, leiomiomas, y el histiocitoma fibroso maligno. Fuera del campo de radiación el tumor más frecuentemente asociado es el osteosarcoma. Otros tumores que también se han relacionado son el carcinoma de células renales, sarcoma de Swing, el cáncer de lengua, el meduloblastoma, y tumores cerebrales.^{278,402-404}

El exceso de tumores asociados a la radioterapia ha sido descrito desde hace mucho tiempo. Todos esos tumores cumplen los criterios de Cade que les identifica como neoplasias radiogénicas.⁶⁷ El 75% de esos segundos tumores aparecen sobre el área expuesta a la radiación; en una revisión de 1993 del Journal of the National Cancer Institute, donde se hace un seguimiento a un total de 1000 pacientes con retinoblastoma, de los casos bilaterales tratados con radioterapia el 35% mueren por una segunda neoplasia maligna en los 40 años posteriores al diagnóstico, mientras que en los casos bilaterales que no son tratados con radioterapia solo fallecen por segundas neoplasias el 6%. Otro estudio presenta unos porcentajes prácticamente iguales revisando un total de 215 pacientes observados durante un periodo de 30 años, dentro de este grupo, los segundos tumores se localizaron en un 29% en el campo de radiación, y un 8% fuera de esa área.⁴⁰⁵⁻⁴⁰⁸

Para hacer un diagnóstico precoz de las segundas neoplasias resulta fundamental la colaboración de los padres. Se planteó el uso de la TC para hacer screening pero añadía mayor radiación y no mejoraba el pronóstico ni adelantaba de manera importante el diagnóstico. Habitualmente los pacientes que desarrollan segundas neoplasias presentan síntomas incluso meses antes de que estas se identifiquen, por eso es importante la colaboración activa de los padres, a la hora de identificar posibles nódulos, dolores articulares o del cráneo que no se resuelvan en 5-7 días, nódulos en la superficie del cráneo. El diagnóstico precoz de las segundas neoplasias si que mejora su pronóstico.⁴⁰⁸

El riesgo de desarrollar metástasis en los pacientes genéticamente predispuestos para desarrollar segundas neoplasias malignas es del 35% si son tratados con radioterapia externa y del 6% si no lo son.⁴⁰⁸

También es cierto que el índice de segundas neoplasias en los pacientes tratados con radioterapia externa ha ido disminuyendo con el tiempo, debido, fundamentalmente a que se utiliza menor radiación que cuando se empezó a utilizar. Pasando de una incidencia global del 50% a una de 22%.⁴⁰⁸

Por otra parte, la mayor supervivencia actual permite observar un mayor número de estas neoplasias, en cuanto a incidencia acumulada, por lo que estos pacientes requieren un seguimiento adecuado - preferiblemente con RM -, destacando la aparición de tumores de estirpe epitelial, que suelen aparecer por encima de los 50 años.⁴⁰⁹⁻⁴¹⁰ El pronóstico de estos segundos tumores generalmente es malo.⁴¹¹ En cuanto a la agudeza visual, los conos son mucho más sensibles a la radiación que los bastones. La agudeza visual casi se puede predecir según la localización principal del tumor y la radiación que se halla administrado al área foveal. Otros efectos secundarios asociados de desarrollo tardío, son las hemorragias vítreas, coroideas o retinianas, los desprendimientos de vítreo posterior, la proliferación glial y los desprendimientos de retina. El manejo quirúrgico de los desprendimientos de retina suelen tener un pronóstico exitoso, aunque debe evitarse el drenaje del líquido subretiniano. La indicación quirúrgica del desprendimiento de retina es la misma que la de la catarata, debe evitarse mientras no se demuestre la inactividad tumoral. Habitualmente la cirugía escleral tiene un buen pronóstico.

Radioterapia con Partículas Pesadas. Las partículas pesadas cargadas (protones e iones de helio) poseen un pico de máxima absorción de energía y una zona de penumbra muy estrecha, además la forma del haz puede modificarse con distintos filtros, esto permite concentrar una dosis alta y homogénea sobre el tumor, protegiendo los tejidos sanos adyacentes. Estas características dosimétricas les hace muy útiles en el tratamiento de tumores intraoculares, habiéndose tratado melanomas uveales o hemangiomas con cifras de control local y supervivencia similares a las de la radioterapia⁴¹²⁻⁴¹³. También ha sido empleado en el retinoblastoma, disminuyendo la irradiación del tejido sano, las secuelas orbitarias y los segundos tumores.⁴¹⁴⁻⁴¹⁵

7.2.5. BRAQUITERAPIA O RADIOTERAPIA EN PLACAS

La radioterapia local viene utilizándose desde 1929, descrita por primera vez por Moore y Scott. Al principio se utilizaron implantes intersticiales, posteriormente en las aplicaciones en oftalmología empezaron a utilizarse dispositivos de radio, y luego de cobalto. En 1977 Rosengren y Tengroth reportaron sus primeras tasas de éxito con una revisión de 20 pacientes.⁴¹⁶ El diagnóstico precoz y la quimiorreducción han aumentado sus indicaciones.

Hoy en día se considera el tratamiento de elección en tumores aislados del grupo B localizados anteriores o en el ecuador. Su uso de forma primaria o secundaria ha aumentado, por el riesgo de aplicar radioterapia externa a los pacientes genéticamente predispuestos para el desarrollo de tumores. La dificultad en el uso de las placas son los tumores de polo posterior, en los que, como efecto secundario, se produce una disminución de la agudeza visual por daño directo sobre la retina u otras estructuras adyacentes. El resultado de las placas es mejor que el de la radioterapia externa en los casos, por ejemplo, en los que toda la lesión descansa sobre la superficie tratada.

Los radioisótopos más utilizados en el retinoblastoma aparecen en la Tabla 6. A continuación se exponen las características e indicaciones de cada uno de ellos.

Tabla 6. Radioterapia en Placas en Retinoblastoma. Isótopos.

Isótopo	Vida media	Radiación	Energía media
Cobalto 60	5.26 años	Gamma	1.25 MeV
Yodo 125	59 días	Gamma	28 KeV
Paladio 103	17 días	Gamma	22 KeV
Rutenio 106	366 días	Beta	3.5 MeV

Extraído de: Freire JG, De Potter P, Brady LW, Longton WA. Brachytherapy in primary ocular tumors. *Semin Surg Oncol* 1997; 13:167-76.³³⁵

Cobalto 60. Es un isótopo de alta energía y difícil de blindar que obliga a usar placas de mayor tamaño, difíciles de manejar. Produce complicaciones frecuentes y severas, así como una elevada exposición del personal, aunque diseños más recientes reducen estos inconvenientes.⁴¹⁷ Su uso ha sido abandonado desde hace décadas.

Yodo 125. Es el más ampliamente utilizado; las semillas se colocan en un “gold carrier” que protege de las radiaciones al hueso y los tejidos adyacentes. Luxton trabajó sobre el plan de dosimetría,⁴¹⁸⁻⁴¹⁹ que hace el cálculo empleando un sofisticado software disponible en la Bebig Corporation.⁴²⁰ Recientemente el soporte para las semillas se ha modificado, disponiendo unas paredes más profundas y proporcionando lo que se denomina un plan terapéutico conformacional.⁴²¹ Cuando se pauta como tratamiento de primera elección, se hace el cálculo de la dosis de radiación que debe llegar al ápex tumoral (utilizando medidas ecográficas) y se programa con un rango de unos 40 Gy. Es

un isótopo de baja energía, alta penetrabilidad y un blindaje sencillo, que permite individualizar el diseño de las placas y reducir la exposición de los tejidos adyacentes. Su mayor penetrabilidad permite tratar tumores de hasta 12-13 mm de altura.⁴²² Actualmente es el más utilizado a nivel mundial, en el tratamiento del retinoblastoma, especialmente en USA. Se suministra en semillas radiactivas, de 0.8*4.5 mm, cuyo número y distribución dentro de la placa varía dependiendo del tumor a tratar. El diámetro de las placas oscila entre 10 y 22 mm, siendo las más pequeñas las empleadas con más frecuencia. ROPES® y BEBIG® han desarrollado unos soportes reutilizables de acero, en los que se insertan placas acrílicas con muescas para la introducción de las semillas de I 125. Estas placas tienen varias distribuciones dependiendo de los tipos tumorales prefijados por su frecuencia, y su fijación a la esclera se realiza con anillos similares a los de las lentes de vitrectomía.

Paladio 103. Radioisótopo similar al I 125 en cuanto a energía y facilidad de manipulación, se ha utilizado con muy buenos resultados en el melanoma de coroides. Aún no hay datos publicados sobre su uso en retinoblastomas. Se utiliza en semillas con aplicadores de protección.

Iridio 192. Al igual que en el caso anterior solo han sido utilizados de forma ocasional en Europa en el caso de distintos tumores intraoculares.

Rutenio 106. Es el isótopo más utilizado en Europa. Actualmente se está popularizando su uso en Estados Unidos, desde que Astrahan ha publicado una fórmula fiable para medir la radiación administrada.⁴²³ Es un emisor de partículas β . Su larga vida media permite la reutilización de la placa durante más de un año, mucho más que las placas de I 125. Su menor penetrabilidad limita su uso en tumores de espesor mayor de 8-9 mm, habitualmente no se tratan fácilmente lesiones de más de 5 mm de altura, aconsejándose termoterapia transpupilar en el ápex tumoral para reducir la dosis y la radiotoxicidad en los tejidos adyacentes. El material radiactivo (0.2 mm de grosor) se encapsula en láminas de plata hasta alcanzar un grosor total de 1 mm, y se colocan en la concavidad de la placa, es decir, que la placa se carga de forma más o menos homogénea, como no dispone de semillas, las cargas no se pueden colocar en el sitio en el que más interese, por eso es preciso disponer de distintos tamaños y formas de placas; hay 15 tipos de placas diferentes, aunque en retinoblastomas sólo se usan 7-8 modelos, también hay que

tener en cuenta que las placas para uso pediátrico son de un tamaño más reducido que las de uso en adultos. Los programas informáticos facilitan el cálculo dosimétrico y la colocación de las placas. Se indica tanto como tratamiento primario, como en las recurrencias tras otras terapias, en retinoblastomas menores de 16 mm de diámetro y 8-9 mm de altura, así como en tumores con siembra vítrea localizada sobre la lesión principal o en la región inferior, evitando así la enucleación.⁴²⁴⁻⁴²⁵ También puede utilizarse en tumores yuxtapapilares y maculares, pese al riesgo de neuropatía y retinopatía por radiación. En caso de recidiva tumoral o desarrollo de nuevos tumores intraoculares puede aplicarse incluso más de una placa, mientras que un segundo ciclo de radioterapia externa tendría efectos secundarios severos.³⁵⁷ También se han desarrollado técnicas de braquiterapia que permiten radiar todo el globo ocular o la órbita, reduciendo los riesgos derivados de la radioterapia externa.⁴²⁶⁻⁴²⁷

Para la correcta colocación de la placa el radiofísico debe indicarnos dónde está la carga de la placa, siguiendo un orden horario y desde el centro hacia la periferia, así como la localización de los ojales y los milímetros de distancia que deben separar la placa del limbo. Se realiza una peritomía de 360°, se retira la conjuntiva y la fascia de Tenon y se tracciona de los rectos con suturas de seda, sin utilizar agujas. En el plan de tratamiento hay que contar con al menos dos milímetros de margen de seguridad respecto a la localización del tumor, y se elabora un modelo computerizado para la localización exacta de la placa. La transiluminación no es una técnica adecuada para localizar el tumor, dado que no son tumores pigmentados. Una vez se localiza el tumor en la superficie ocular se coloca una placa fría, es decir, sin carga radiactiva y se sutura, y utilizando la depresión escleral de sus bordes se valora si es adecuada su localización. También puede utilizarse la ecografía intraoperatoria o la RM para verificar su colocación. Una vez se verifica su posición se sustituye por la placa caliente, pasando las suturas de la placa inactiva como guía y se sustituye ésta por la placa activa, que se fija a la esclera con las suturas preparadas previamente. Si se precisa desinsertar algún músculo se suturan posteriormente y se finaliza cerrando la conjuntiva. Durante el proceso se cuantifica la emisión de radiación y es preciso llevar delantal de plomo de 1/8 inch para protegerse durante el postoperatorio (si se utilizan placas de yodo, no con las de rutenio). La placa se retira cuando se completa el periodo calculado previamente para que el tumor reciba la cantidad de radiación necesaria, según la actividad de la placa y la dosis total liberada, que habitualmente oscila en un rango que va desde 8-9

horas, cuando se trata de rutenio, hasta 2-4 días, cuando se utiliza yodo. Trascorrido ese tiempo se retira la placa y se reconstruye la anatomía de las envolturas oculares.

El Grupo de Tumores Oculares recomienda emplear dosis de 45-50 Gy en el ápex tumoral, con lo que la base recibe unos 150-200 Gy;³⁵⁶ cuando se asocia siembra vítrea localizada la dosis se calcula según su profundidad.

El control tumoral se consigue en el 80-89% de los casos en las distintas series,^{424,428} con escasa variación en el tiempo (83% a 1 año y 79% a 5 años) en la serie más amplia.⁴²⁹ El riesgo de recurrencia es mayor en caso de siembra vítrea o subretiniana, así como en los tumores tratados previamente con radioterapia externa y quimiorreducción (debido, probablemente a un mayor tamaño tumoral inicial). Los patrones de regresión obtenidos son similares a los descritos tras la radioterapia externa, siendo el tipo IV el más frecuente.⁴³⁰

Hay que tener una precaución especial cuando se combina radioterapia externa y braquiterapia puesto que se ha descrito algún caso de ptisis bulbi.⁴³¹

También es conocido el riesgo de retinopatía²⁴¹ radiactiva, que puede llegar a destruir la funcionalidad visual en los casos en los que se asocia braquiterapia a las dosis habituales con quimioterapia sistémica. La dosis recomendada en estos casos, como tratamiento de consolidación focal está en torno a 20-25 Gy, en lugar de los 40-45 Gy utilizados habitualmente. Mejor aún es esperar varios meses tras la administración de la quimioterapia antes de aplicar la braquiterapia. La retinopatía radiactiva tras el uso asociado de quimioterapia;²⁴² puede ser no-proliferativa (27%) o proliferativa (15%).

La presencia de maculopatía (25%) o neuropatía óptica (26%) depende de la localización de la placa. La retinopatía y la neuropatía suelen aparecer unos 18 meses después de la colocación de la placa, y en ocasiones los exudados blandos de la retinopatía pueden confundirse con nuevos tumores. También pueden aparecer cataratas (31%) y glaucoma neovascular (11%).⁴²⁹

Habitualmente la braquiterapia no se utiliza como método de consolidación focal, dados sus riesgos y que son precisos estudios en fase I y II para determinar la dosis efectiva en estos casos.

Entre las ventajas de la radioterapia en placas destaca la menor radiación de la órbita, que reduce el riesgo de segundos tumores y la hipoplasia orbitaria. En los tumores maculares la visión desciende sea cual sea el tratamiento, pero la braquiterapia

consigue agudezas visuales similares a la termoterapia transpupilar.³²⁹ Inicialmente se describió un mejor resultado funcional tras su uso como tratamiento primario,⁴³² pero posteriormente no se han encontrado diferencias en la visión obtenida tras aplicarse como tratamiento primario o secundario, consiguiendo una visión buena (0.5-1) en el 62% de los casos; el 83% de los casos de mala visión son consecuencia de la localización foveal del retinoblastoma.⁴²⁴

No se ha descrito un aumento en la incidencia de segundos tumores.

7.2.6. ENUCLEACIÓN

Clásicamente fue el tratamiento de elección en el manejo del retinoblastoma. Fue descrita como tratamiento para el retinoblastoma por Wardrop; éste autor propuso en 1809 la enucleación precoz del ojo afectado como medida para garantizar la supervivencia de los pacientes, más tarde Von Graefe propuso reseca tanto nervio óptico como fuera posible, al estudiar la posible extensión tumoral a través de esta vía.¹⁵⁴

Hoy en día sigue siendo utilizada, aunque su uso está mucho más restringido,²⁴⁵ sus indicaciones actualmente son:

- Tumores unilaterales extensos y diseminados con siembras vítreas y/o subretinianas, con o sin desprendimiento de retina y mal pronóstico visual.
- Tumores unilaterales en los que hallan fracasado los tratamientos conservadores.
- Presencia de glaucoma neovascular, siembra tumoral en pars plana, invasión de cámara anterior, coroides o nervio óptico y en caso de extensión orbitaria.
- Alteración de los medios transparentes (catarata, hemorragia vítrea) que impida la exploración ocular y un seguimiento adecuado.¹⁴¹
- Tumores bilaterales con mal pronóstico visual, enucleándose el globo con un estadio más avanzado.
- Tumores bilaterales en estadio similar y avanzado; se aplica quimioterapia y se valora posteriormente, enucleándose el ojo que no haya regresado (equivalente a la quimioterapia postenucleación con infiltración del nervio óptico).

La decisión de enuclear debe ser tomada conjuntamente por el equipo médico y la familia, y una vez se decide, se debe practicar sin demora. La apertura

accidental del globo ocular durante la manipulación podría incrementar el riesgo de metástasis.

Tomar una muestra directa del tumor (fresca y congelada) es útil porque permite hacer el estudio genético intratumoral (gen RB1) que complementa el estudio en sangre periférica. La probabilidad de encontrar la mutación en la sangre periférica del paciente es del 15%. Para el laboratorio es muy importante tener acceso directo al tejido tumoral, porque así se puede localizar de manera directa la mutación presente en el DNA tumoral, identificando así la mutación específica del paciente sujeto a estudio.

La técnica quirúrgica empleada precisa de anestesia general; en primer lugar se realiza una peritomía a 4-5 mm del limbo, se aíslan los rectos (8mm por detrás de su inserción) y se infiltra anestesia en el espacio retrobulbar (6-8 cc) para provocar una proptosis y también porque tiene cierta efectividad en la analgesia postoperatoria (durante 3-4 horas). Se secciona el nervio óptico a 12-15 mm de su entrada en la esclera, bien con una tijera curva, en sentido nasal a temporal, bien con una guillotina con alambre, que produce el corte por estrangulación, permitiendo un mejor control de la hemorragia. Como mínimo la resección del nervio debe de ser de 10mm, para poder estudiar si hay infiltración y riesgo de diseminación por esta vía, y para minimizar el riesgo de metástasis.⁴³³⁻⁴³⁵ El empleo de hielo local en el ápex orbitario también ayuda en el control de la hemorragia.

Una vez enucleado se estudia el aspecto microscópico del ojo, el nervio óptico y el tejido graso orbitario, disecando, en ocasiones, el tejido conectivo retrobulbar. Una vez seccionado el globo ocular en dos partes, una puede emplearse para hacer el estudio genético y la otra para el estudio anatomopatológico.

Habitualmente en el mismo acto quirúrgico se coloca un implante intraorbitario reemplazando el volumen perdido, para estimular el crecimiento orbitario y mejorar la movilidad de la prótesis externa y, por tanto, el aspecto estético. Debe emplearse uno lo más grande y anterior como sea posible. Suele utilizarse implantes de hidroxiapatita o de polietileno poroso (medpor)⁴³⁶⁻⁴³⁷. La superficie rugosa de la hidroxiapatita requiere su recubrimiento para no erosionar la conjuntiva, existiendo implantes recubiertos de una malla de vicryl o PTFEe (politetrafluoroetileno expandido);⁴³⁸ aunque está algo más en desuso que el medpor, por la frecuencia de las extrusiones. El medpor puede utilizarse sin recubrimiento, suturando los músculos extraoculares directamente sobre la prótesis, ya que la esfera cuenta con unos ojales que facilitan la sutura directa. Estos implantes permiten la integración del tejido fibrovascular orbitario a través de sus poros,

reduciendo el riesgo de infección y extrusión de la prótesis, y proporcionan una excelente motilidad ocular por la fijación de los músculos extraoculares. El medpor es un tejido bien tolerado, resistente a infecciones y no antigénico, de alta porosidad y que permite un rápido crecimiento del tejido fibrovascular dentro de si.

El tamaño de las prótesis es de 16, 18 y 20 mm, que equivalen a unos 18, 20 y 22 mm de volumen orbitario total.

En el Hospital Infantil La Paz se colocan habitualmente implantes de 18 mm en niños menores de 1 año y de 20 mm en los mayores de esa edad.⁴³⁹ La exposición tardía suele producirse por una deficiente vascularización. La extrusión del implante es muy rara, estando descrita tras la recidiva orbitaria del retinoblastoma.⁴⁴⁰ La infección del implante es poco frecuente (1-2%) pero grave y obliga a su extracción. Debe prevenirse tratando el implante y su cubierta con antibióticos antes de la implantación. Otras complicaciones son la ptosis palpebral (16-23.5%) y la laxitud excesiva del párpado inferior (10-17%).⁴⁴¹

Algunos autores prefieren utilizar prótesis de morfología cónica, considerando que proporcionan un mayor volumen orbitario.⁶⁷ En algunos casos se utiliza la técnica llamada “cushion implant”, en la que se interpone grasa orbitaria entre los músculos extraoculares y la prótesis de medpor, dificultando aún más la extrusión de la prótesis interna.⁶⁷

En cuanto al cierre quirúrgico, la fascia de Tenon resulta mas fácil de suturar cuando previamente se ha hidratado con solución salina. Como sutura suele utilizarse vicryl 7/0. Se realiza una doble sutura, primero en el eje horizontal y luego en el vertical, lo que minimiza el riesgo de extrusión. Posteriormente se sutura la conjuntiva, siempre ha de colocarse un conformador plástico bajo los párpados. Si se inyecta corticoides y antibióticos bajo la sutura los antibióticos sistémicos no son precisos, aunque suelen utilizarse al ser más sencillos de administrar y conservar mejor la estructura del campo quirúrgico.

Cuando la resonancia magnética muestra vascularización en el implante (3-6 meses) puede colocarse un vástago de titanio o hidroxapatita al que se acoplará la prótesis externa.⁴⁴² El vástago consigue una motilidad adecuada en un buen porcentaje de pacientes al mejorar la estabilidad de la prótesis externa y reducir la sobrecarga del fórnix y el párpado inferior. La principal complicación asociada a la implantación del vástago es su extrusión (7-26%) y depende del material y tipo; otras son dolor, edema, conjuntivitis y clic audible.⁴⁴³

En los casos en los que la anatomía patológica determine que se debe pautar quimioterapia tras de la enucleación es prudente demorarla una semana.

La complicación quirúrgica más frecuente es que se rompa el globo ocular cuando se está seccionando el nervio óptico, así como que la resección del nervio sea insuficiente. A largo plazo la complicación más frecuente (3-22%) es la exposición del implante,^{436,444} por un cierre quirúrgico defectuoso. Los ojos radiados previamente son más susceptibles, pues la conjuntiva suele estar friable y necrótica, aunque hay autores que no observan una mayor incidencia.⁴⁴⁵ La exposición precoz, en el primer o segundo mes, suele deberse a una excesiva tensión de la sutura originada por la inserción de un implante demasiado grande y/o a un cierre inadecuado de la conjuntiva o la fascia de Tenon. Otras complicaciones frecuentes son la aparición de quistes conjuntivales o un mal resultado estético, habitualmente por una mala adaptación del tamaño de la prótesis. Algunos autores sugieren que el diámetro del implante debe ser 2 mm inferior al eje axial del globo.⁴⁴⁶

Se considera que el crecimiento orbitario debe ser adecuado cuando se coloca una prótesis de tamaño correcto y no ha habido radioterapia previa.⁴⁴⁷ Una deficiencia en el desarrollo orbitario puede deberse tanto a la adaptación de un implante pequeño como a que no se disponga de una prótesis externa adecuada.⁴⁴⁸ El tamaño orbitario se ve afectado sobretodo en los pacientes que han sido radiados antes de los 6 meses de vida.³⁸³ En estudios animales en conejos se ha observado el buen desarrollo en el tamaño orbitario con el uso de prótesis expandibles.⁴⁴⁹ Lo que no se ha reproducido en nuestra experiencia, en un caso en el que se empleó medpor inyectable.

Para hacer el seguimiento del paciente en algunos centros se realiza una RM de control anualmente, salvo los casos heredables diagnosticados antes de los 12 meses de edad, que se realiza semestralmente hasta alcanzar los 3 años, haciendo screening al mismo tiempo de posibles lesiones de la línea media. El riesgo de extensión extraocular tras una enucleación exitosa es de 12-18 meses.

De forma protocolizada se aplica quimioterapia sistémica durante 6 meses en los casos en los que se identifica infiltración coroidea y de la lamina cribosa, aunque esto no está estandarizado en todos los centros, algunos autores, como Chantada dudan de su efectividad.⁴⁵⁰ Y es llamativo que los primeros que valoraron el riesgo de la invasión retrolaminar en 1989, hoy en día no utilizan la quimioterapia adyuvante.⁴⁵¹

El protocolo de quimioterapia adyuvante son 3 ciclos de CEV separados por intervalos de 3 semanas.

7.2.7. EXANTERACIÓN

La exenteración orbitaria es un procedimiento destructivo y desfigurante que, en el manejo del retinoblastoma, se reserva para las recurrencias orbitarias en las que ya se ha alcanzado la dosis máxima aceptable de radioterapia y quimioterapia o para casos con estallido del globo ocular por tumor un masivo.⁴⁵²

Consiste en la extirpación en un solo bloque del contenido orbitario con la escisión total o parcial de los párpados. El planteamiento quirúrgico debe tener en cuenta el tamaño, la localización y la histología de la lesión y las posibles opciones reconstructivas y protésicas. El enfoque individualizado permite abordajes subtotales que mejoran la funcionalidad sin un aumento de las recurrencias; así, si se respetan los párpados el tiempo medio de cicatrización y adaptación de una prótesis cosmética se reduce de 68 a 4 semanas.⁴⁵³

Es preciso extirpar cualquier resto de tejido tumoral antes de iniciar la reconstrucción de la cavidad. La cicatrización por granulación espontánea y los injertos cutáneos de poco espesor permiten detectar las recurrencias precozmente. En defectos periorbitarios extensos pueden utilizarse injertos cutáneos o colgajos musculares pediculados, aunque pueden enmascarar las recurrencias,⁴⁵⁴ en estos casos el método de seguimiento es radiológico. También pueden colocarse prótesis expandibles de silicona que permiten el desarrollo del macizo craneofacial, en nuestra serie hay un paciente al que se le reconstruyó la cavidad exanterada con una prótesis expandible que se rellena periódicamente con suero salino (paciente exanterado por un rhabdomioma).

7.3. PROTOCOLO TERAPEUTICO. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

Desde que se ha introducido la quimiorreducción como terapia habitual en el manejo del retinoblastoma los protocolos terapéuticos han variado, incluso las clasificaciones clásicas han dejado de tener un valor pronóstico real. La clasificación de los Shields parece ser la mejor adaptada al pronóstico y parece responder bien a un planteamiento ordenado de un protocolo terapéutico, que se expone a continuación.

7.3.1. Retinoblastoma Unilateral No Heredable.

La nueva clasificación propuesta ayuda al clínico a decidir cuando tratar un retinoblastoma unilateral de forma conservadora. Hasta un estadio C, con diseminación local en vítreo o espacio subretiniano, el tratamiento de elección es el conservador. Cuando el paciente se presenta en un estadio D, la posibilidad de salvar el ojo con una diseminación difusa intraocular es del 40% o menor, por lo que se recomienda la enucleación primaria, sobretudo para ahorrarle al paciente el trauma de pasar por tratamientos muy agresivos y con graves efectos secundarios para mantener un globo ocular que tendría muy pocas posibilidades funcionales.

El protocolo terapéutico planteado por los Shields se resume en la tabla 7:²⁸³

Tabla 7. Protocolo terapéutico en enfermedad unilateral no heredable.

GRUPO	TRATAMIENTO
A	Crio o fotocoagulación
B	Quimiorreducción 3-4 ciclos + consolidación focal
B*	Braquiterapia
C	Quimiorreducción + consolidación focal
D	Enucleación primaria

B*: Tumor único localizado fuera del polo posterior.

7.3.2. Retinoblastoma Bilateral Simétrico.

Cuando ambos globos oculares se presentan en un estadio avanzado, esto es, en el grupo D y E, si uno de los ojos se presenta en el grupo E se practica una enucleación primaria, salvo que en el estudio radiológico parezca presentar infiltración del nervio óptico y el ojo adelfo se presente en un estadio mayor o igual al grupo B, en ese caso primero se pauta quimiorreduccion y posteriormente se enuclea el ojo en estadio E.

Cuando un ojo pertenezca al grupo D y el adelfo esté entre el A y el C, se pauta quimiorreduccion y consolidación focal, ya que no se puede asegurar que a largo plazo el ojo con un menor grado en el momento del diagnostico vaya a ser el de mejor pronóstico visual final. Por eso se debe conservar en lo posible la funcionalidad del ojo en estadio más avanzado en el momento del diagnóstico.

El protocolo terapéutico es muy similar al de los casos unilaterales²⁸³, y se resume en la Tabla 8:

Tabla 8: Protocolo Terapéutico para Tumores Bilaterales Simétricos.

GRUPO	TRATAMIENTO
A	Crio o fotocoagulación
B	Braquiterapia
C	Según protocolo
D	Quimiorreduccion +(carboplatino subtenoniano) + consolidación focal.

7.3.3. Retinoblastoma Bilateral y Asimétrico.

El tratamiento se pauta siempre en función del grado que presente el ojo en estadio mas avanzado. Si es del grupo E, enucleación, salvo infiltración del nervio óptico, en cuyo caso se hará previamente quimiorreduccion. Si el plan de tratamiento es similar para ambos ojos, por ejemplo, ambos precisan quimioterapia, se elegirá la pauta más agresiva.

VIII. PRONÓSTICO

La supervivencia global de los pacientes con retinoblastoma en los países desarrollados está determinada por distintas causas de mortalidad, que difieren según la edad de los pacientes. Tanto la supervivencia como las causas de mortalidad dependen del periodo examinado; durante los primeros 4 años de vida de estos pacientes la mortalidad se debe al desarrollo de metástasis,³⁹⁵ y posteriormente a la aparición de segundos tumores primarios, a los que éstos pacientes están genéticamente predispuestos, como el osteosarcoma o el fibrosarcoma, que, además, aumentan su incidencia progresivamente.

Del mismo modo, la tasa de supervivencia varía según se valore la mortalidad por retinoblastoma o por segundas neoplasias primarias. Eso explica, por ejemplo, que Abramson y cols. reportaran que el 86% y no el 92% de los pacientes con retinoblastoma bilateral sobrevivían a los 15 años del diagnóstico,³⁹⁵ dado que a partir de los 5 años tras el diagnóstico de retinoblastoma la mayoría de las muertes se deben a segundas neoplasias primarias, y no a la evolución natural del retinoblastoma.⁴⁵⁵ En los países subdesarrollados la tasa de supervivencia es muy inferior, en la India, por ejemplo se ha descrito recientemente una supervivencia a los 5 años del 48%.⁴⁵⁶

En los Países Bajos, donde existe un registro nacional de tumores, se hace notoria la diferencia de la supervivencia global entre los subgrupos de pacientes que están genéticamente predispuestos y los que no están predispuestos a sufrir otros tumores.⁴⁵⁷

Una importante controversia es cuál es el porcentaje de pacientes que sucumbiría a segundas neoplasias malignas. Abramson y cols habían descrito que en torno al 90% de los pacientes con el alelo de predisposición para retinoblastoma desarrollarían segundas neoplasias malignas en los 30 años posteriores al diagnóstico de retinoblastoma.⁴⁵⁸ En una revisión más moderna del grupo de Boston y Nueva York se describe que el 6% de los pacientes con retinoblastoma bilateral no tratados con radioterapia externa morirán por SMN en los 40 años siguientes al diagnóstico de retinoblastoma, frente al 35% de los casos tratados con radioterapia externa.⁴⁵⁹

La supervivencia global en los países desarrollados depende fundamentalmente del retraso en recibir atención médica, lo que está directamente relacionado con el nivel cultural de la población.

En los países subdesarrollados o en vías de desarrollo al retraso en el diagnóstico hay que sumarle las dificultades para recibir el tratamiento adecuado. En Malasia, en 1980 solo 6 de una muestra de 20 pacientes sobrevivieron,⁴⁶⁰ frente a los 281 de los 317 pacientes de gran Bretaña diagnosticados entre 1970 y 1984.²²⁷

Un estudio argentino demostró que el retraso en el diagnóstico estaba relacionado con la demora en el acceso médico, ya que tras la exploración por un médico de atención primaria se remitía al paciente a un pediatra antes que a un oftalmólogo, lo que retrasaba el momento del diagnóstico aún más.⁴⁶¹

En Nigeria, en la década de los sesenta, la tasa de mortalidad de retinoblastoma era muy alta, por las dificultades para acceder a la consulta médica y la ausencia de facilidades para recibir tratamiento.⁴⁶²

Otro ejemplo documentado es la situación de Japón hace 50 años, donde sólo el 50% de los pacientes con un proceso unilateral y el 17% con un proceso bilateral sobrevivían a los 5 años del diagnóstico.⁴⁶³

El pronóstico vital y visual de los pacientes con retinoblastoma ha mejorado progresivamente según mejoraba el diagnóstico precoz y se perfeccionaban los distintos métodos de tratamiento, posibilitando un tratamiento conservador en un alto porcentaje de casos y alcanzando en la última década cifras de supervivencia del 90-95%.²⁴⁶⁴⁻⁴⁶⁵ Ésta tasa se reduce ligeramente con el tiempo, siendo del 89% a 10 años y del 86% a 18 años.⁴⁶⁶ En caso de que haya afectación extraocular, la supervivencia disminuye al 50%.^{72,459,467}

Para mejorar sensiblemente el pronóstico de la enfermedad lo más eficaz sería mejorar el diagnóstico precoz, más incluso que tener posibilidad de más tratamientos.⁴⁶⁸

8.1. Pronóstico Vital.

El retinoblastoma es un tumor potencialmente curable, con una reducida mortalidad, que en nuestro medio se asocia fundamentalmente a tres causas: la presencia de metástasis, la asociación a pinealoblastoma y la aparición de segundas neoplasias primarias extraoculares.

Las metástasis afectan al 5% de pacientes y suelen aparecer dentro del primer año tras el diagnóstico. La supervivencia en los 5 primeros años tras el diagnóstico depende fundamentalmente de su desarrollo.

El aspecto clínico más claramente relacionado con un incremento del riesgo metastático es el tamaño tumoral grande, sobretodo si se ve afectado el segmento anterior (rubeosis iridis, ectropion uveae, hipopion tumoral).

Tradicionalmente se consideraba que había unos hallazgos histopatológicos en los ojos enucleados que se correlacionaban con un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad metastásica.²⁰⁷ Estos signos son: la invasión del nervio óptico, de la coroides o la órbita;²⁰⁷ la invasión tumoral del nervio óptico, atravesando la lámina cribosa, combinado con una invasión masiva coroidea en la mayoría de los centros se trata con quimioterapia adyuvante o preventiva.³¹⁹ Sin embargo, recientes estudios han puesto en duda la mayor agresividad de los tumores que presentan estos hallazgos, así como su valor como signo predictor de un mayor riesgo de desarrollo de metástasis.⁶⁷

Habitualmente la afectación del nervio óptico coexiste con la invasión coroidea, lo que puede llevar a un error, dado que la invasión coroidea aislada no constituye un riesgo aumentado de metástasis, salvo que esta tenga una presentación masiva.³¹⁹ Por otro lado, la invasión coroidea es mucho más frecuente en los tumores exofíticos que en los endofíticos, y sin embargo, no hay un mayor riesgo de metástasis ni una menor tasa de supervivencia en el grupo de los primeros.

A principios de 1991, Messner publicó una revisión de 583 pacientes diagnosticados consecutivamente entre 1956 y 1986 (grupo de Essen),¹¹⁰ valorando los distintos factores de riesgo metastásico de forma independiente o asociados:

- Invasión del nervio óptico. (13% si no se afectaba la línea de resección, 67% si se afectaba la línea de resección)
- Invasión coroidea. (8%)
- Enucleación más de 120 días tras al diagnóstico. (4%) El 67% de los pacientes que presentaban tumor en la órbita en el momento de la enucleación desarrollaron metástasis. Posteriormente se ha confirmado la importancia del tratamiento con quimioterapia o radioterapia agresiva en el tumor orbitario en el momento de la enucleación.

El pronóstico vital de los pacientes con enfermedad extraocular es malo, sobretodo si presentan metástasis en el sistema nervioso central.⁴⁶⁹ Éstos pacientes son tratados con quimioterapia sistémica, sin embargo, el pronóstico es infausto, un estudio que compara distintas pautas quimioterápicas ha demostrado que no existe una clara superioridad de ninguna de ellas.⁴⁷⁰

En los pacientes en los que únicamente se ve afectación ósea o de la medula ósea, hay buena respuesta al tratamiento mieloablativo, con trasplante de medula ósea y radiación focal de la lesión local. Sin embargo, si se ve afectado el sistema nervioso central la supervivencia es mínima.²²⁹ Históricamente la supervivencia de los pacientes diagnosticados de retinoblastoma metastático es muy rara. Hay algún caso reportado que ha tenido una larga supervivencia habiendo sido tratado con altas dosis de quimioterapia, combinado con radiación corporal total, quimioterapia intratecal y rescate de medula ósea.^{221,231,485} La supervivencia en los casos metastáticos aumentó notablemente cuando empezó a emplearse el rescate de medula ósea.⁴⁶³

Hoy en día la tasa de supervivencia sigue siendo baja, a pesar de la extensión del trasplante de medula ósea autólogo y la radiación craneoespinal. Tras el tratamiento una de las principales secuelas es el deterioro cognitivo.

Las metástasis se han descrito en la MO, hueso, senos paranasales, glándulas salivares, ganglios linfáticos, tejido subcutáneo, hígado, bazo, pleura y testículos.

La remisión tumoral suele estar limitada en torno a 6-12 meses tras el tratamiento, a pesar de emplear quimioterapia de mantenimiento. La causa de la recaída suele ser la aparición de quimiorresistencia. El establecimiento de las metástasis es variable, aunque la mayoría de los casos se diagnostican en torno a los 3 años de edad. También se han documentado casos con metástasis en el momento del nacimiento, pero son extremadamente infrecuentes.⁴⁸⁶

Por otro lado, no parecen existir diferencias en el riesgo de metastatizar entre pacientes genéticamente predispuestos o no a padecer retinoblastoma. Tanto en los casos heredables como en los no heredables el principal factor que se correlaciona con un peor pronóstico en la supervivencia es el retraso en el diagnóstico.⁴⁷¹

Las recurrencias múltiples son un indicador de peor pronóstico tanto para la supervivencia global del paciente como para la supervivencia del órgano visual. Cuantas más mitosis sufra una célula tumoral más probable es que adquiera mutaciones que permita a los clones descendientes de esa estirpe celular sobrevivir fuera del globo ocular. Con cada recurrencia visible intraocular mayores son las posibilidades de que se hayan adquirido esas mutaciones espontáneamente. La oportunidad de pasar al torrente circulatorio es un factor necesario pero no suficiente para que se desarrolle una metástasis. El potencial metastático es parte de la evolución clonal tumoral. Una vez que la célula con capacidad metastásica ha evolucionado (normalmente por reordenación cromosómica), son sus descendientes las que tienen capacidad para invadir otros tejidos y formar colonias.

Es poco probable que la invasión del nervio óptico, por sí sola, sobretodo si es leve, pueda ser la fuente de células metastásicas. Para la progresión del tumor lo más importante es la capacidad que tengan sus células para acumular cambios genéticos que permitan el desarrollo de metástasis.

Por otro lado, la presencia de pinealoblastoma se asocia a muy mal pronóstico, generalmente debido al desarrollo de metástasis cerebrales, con una supervivencia acumulada a 5 años del 27% si se realiza screening con RM cerebral, frente al 0% si no se hace. La edad de fallecimiento, sin embargo, es similar (36 vs. 37 meses). Todos los pacientes cuyo pinealoblastoma es mayor de 15 mm fallecen.¹³⁰⁻¹³¹ Se han descrito respuestas favorables con protocolos similares a los utilizados en el tratamiento de metástasis, incluyendo trasplante autólogo de médula ósea.¹³²⁻¹³³ También se refiere una menor incidencia en los pacientes tratados con quimiorreducción, sugiriéndose que ésta podría prevenir o retrasar la aparición del pinealoblastoma.¹³⁴

Por último, en cuanto al desarrollo de segundas neoplasias primarias, que es la tercera causa de mortalidad en los pacientes con retinoblastoma, son especialmente susceptibles los pacientes que son tratados con radioterapia externa y los que tienen mutación en el gen RB que les hace estar “genéticamente predispuestos a padecer cáncer”.

Si valoramos las características anatomopatológicas como posibles factores pronósticos observamos que:

- En algunos estudios los retinoblastomas bien diferenciados se asocian a un mejor pronóstico;¹⁵⁶ otros no encuentran relación entre la diferenciación tumoral y el pronóstico.⁴⁷²
- Los tumores con menor índice proliferativo y una tasa de apoptosis mayor de 2.4% se asocian con menor riesgo de metástasis, mientras que aquellos con un índice de angiogénesis alto tienen un mayor riesgo.^{69,473} Los tumores de mayor tamaño se relacionan con un alto índice proliferativo y un índice de apoptosis bajo (< 2.4%),⁴⁷³ asociándose a un peor pronóstico.⁴⁷⁴⁻⁴⁷⁵ Por eso, la apoptosis inducida por citoquinas (interferón- γ y factor de necrosis tumoral- α) y ácido retinoico se investiga como posible método futuro de tratamiento.⁴⁷⁶⁻⁴⁷⁷
- El factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) ha sido relacionado con una mayor invasividad tumoral y con quimiorresistencia.⁴⁷⁸
- La localización tumoral intraocular no parece influir en el pronóstico vital, ni tampoco la presencia de siembra vítrea: algunos autores creen que empeora el pronóstico^{110,370} y otros no encuentran una asociación desfavorable.^{141,474}
- La leucocoria como signo de presentación no se asocia significativamente con una menor supervivencia (86% a 5 años), aunque se correlaciona con un mayor tamaño tumoral y peor supervivencia ocular. Cuando el signo de presentación es el estrabismo, la supervivencia media a 5 años es del 90%.⁴⁸⁰
- El factor que está relacionado indiscutiblemente con un mayor riesgo de enfermedad metastásica, enucleación y menor tasa de supervivencia es el retraso en el diagnóstico.⁴⁸¹⁻⁴⁸² Para algunos autores la edad al diagnóstico superior a 2 años se asocia con una menor supervivencia, por riesgo de desarrollar enfermedad extraocular o metástasis,^{109,107,459,467,210,} si bien otros autores no encuentran diferencias estadísticamente significativas (93.3% de supervivencia a 8 años en menores de 2 años vs. 88.5% en mayores de 2 años).^{466,483}

- La edad de presentación se asocia íntimamente con la lateralidad del proceso; en algunos estudios los pacientes con enfermedad unilateral tienen un peor pronóstico, por un mayor riesgo de extensión extraocular,^{107,110,474} mientras que otros no refieren diferencias en la supervivencia a 5 años según la lateralidad. Sin embargo, a largo plazo la bilateralidad, dado que es más frecuente en pacientes con mutación de la línea germinal, es un factor de riesgo para el desarrollo de segundos tumores, por lo que al aumentar el periodo de seguimiento hace que la tasa de supervivencia empeore.⁴⁸⁴

8.2. Pronóstico Funcional.

Como fue sugerido por Kundson en 1976,³⁰ un diagnóstico precoz del retinoblastoma junto con un tratamiento adecuado y una remisión oportuna, cuando el tumor es pequeño, es el principal factor en determinar la conservación del globo ocular. Un retraso en el diagnóstico inicial se asocia con el decremento de la supervivencia anatómica y funcional del globo ocular.

Haik y colaboradores evaluaron las causas que retrasan el diagnóstico,⁴⁸⁷ el primer retraso se debe a que el primer signo debe ser evidenciado por los familiares o las personas cercanas al paciente, habitualmente no hay un síntoma que identifique el propio paciente y que haga sospechar el diagnóstico. El segundo retraso se produce desde que se identifica el signo y se efectúa la visita al médico de atención primaria, en este sentido el nivel educativo o cultural de los padres es fundamental. El tercer retraso se produce desde que el paciente es referido desde el médico de atención primaria o el pediatra hasta el oftalmólogo pediátrico, en éste momento hay grandes variaciones según la accesibilidad geográfica y según si hay o no antecedentes familiares de retinoblastoma o enfermedad oftalmológica.⁴⁸⁷

En cuanto a las características morfológicas, parece existir un mejor pronóstico en cuanto a conservación del órgano visual en los pacientes que oftalmoscópicamente se observa formaciones quísticas en la superficie tumoral, que se ha descrito como un factor relacionado con una mejor respuesta al tratamiento con quimioterapia.⁴⁷⁹

La conservación de la visión es de especial importancia para el correcto desarrollo social y educativo de estos pacientes. La probabilidad de conservar la visión depende no sólo del tamaño y localización del tumor o tumores,¹³⁸ sino también del tratamiento utilizado y las complicaciones derivadas del mismo.³⁷⁴

La causa más importante de disminución de agudeza visual es la localización macular, aunque como se ha referido, se han descrito casos de recuperación visual en pacientes con retinoblastoma macular tratados con radioterapia externa. Los tumores pequeños que no afectan la fóvea presentan las mejores respuestas en cuanto a funcionalidad, consiguiéndose conservar una visión adecuada incluso con desprendimientos de retina que afectan el área foveolar,⁴⁸⁸⁻⁴⁸⁹ se han descrito casos de tumores maculares con una recuperación de la AV de la unidad, tras resolverse el líquido subretiniano presente en el diagnóstico.⁴⁸⁸ En algunos casos podría incluso recuperarse la fijación visual macular. En estos casos con una conservación visual excelente a pesar de tener afectación macular, lo que se considera como hipótesis es que el tumor emerge desde la superficie de la retina sin destruir los conos de la fóvea.

Por otro lado, la quimiorreducción permite reducir el volumen tumoral y que algunos tumores maculares dejen libre la fóvea, lo que aumenta las posibilidades de conservar la visión.³²⁷ Incluso se ha propuesto como tratamiento inicial el empleo de quimioterapia aislada para todos los tumores maculares.⁴⁹⁰

Desde que se ha instaurado la quimioterapia sistémica junto con los tratamientos de consolidación focal como tratamiento Gold Standard se ha establecido una clara correlación entre el estadio y el pronóstico vital y funcional que se resume en la Tabla 9. (Clasificación A-E. Los Angeles Study Group).

Tabla 9. Correlación del Estadio y Pronóstico Funcional y Supervivencia Órgano.

	AV	SUPERV ORGANO
A	EXELENTE	100%
B	20/20-20/200	94%
C		70%
D		50%
E		2%

En los casos con afectación macular el pronóstico visual suele ser en torno a 20/200 o peor, (aunque hay excepciones, como las señaladas anteriormente). Además se ha publicado un estudio con 17 pacientes y tumores maculares extensos tratados con radioterapia externa, la AV posterior variaba en un rango entre 5/200 y 20/50.⁴⁹¹

Tras el control del proceso tumoral, el siguiente paso es el tratamiento de la ambliopía. La terapia oclusiva proporciona buenos resultados incluso en ojos con afectación macular severa, pudiendo mejorar la agudeza visual hasta en un 80%.⁴⁹²⁻⁴⁹³

IX. SEGUIMIENTO

En general, los niños con retinoblastoma deben ser vigilados indefinidamente para evaluar el tumor primario, controlar las complicaciones derivadas del tratamiento y observar la posible aparición de segundas neoplasias.

La mayoría de recurrencias aparecen dentro de los dos primeros años tras el diagnóstico,^{195,198} aunque la aparición de tumores en la edad adulta y la bilateralización tardía obligan a ser cautos.^{49,53-54}

9.1. Patrones de Regresión.

Una vez aplicado el tratamiento y el tumor ha respondido, la morfología de éste se modifica adaptándose a alguno de los patrones de regresión descritos. Los distintos tipos de patrones de regresión son los que se detallan a continuación:

- **Tipo 0:** no aparecen cambios, o estos son mínimos localizados en el epitelio pigmentario retiniano (EPR), sin evidencia oftalmoscópica de tumor y/o calcio. Aparece en tumores < 3 mm. Descrito también tras braquiterapia y quimioterapia. Es poco frecuente y se considera un resultado excelente.⁴³⁰
- **Tipo I:** el tumor adquiere un aspecto blanco reluciente (requesón), calcificado, con zonas de hiperplasia o hipoplasia del epitelio pigmentario rodeándole y una importante reducción del volumen de la masa tumoral. Para algunos autores es el más frecuente, se asocia a un mayor tamaño tumoral inicial y tiene poca tendencia a la recidiva tumoral.³⁷¹ Se asume como una respuesta completa, y suele darse en algunos tumores que responden a quimioterapia ya desde el primer ciclo de tratamiento.
- **Tipo II:** aspecto gris traslúcido y homogéneo (escamas de pescado), con pocos cambios en el EPR, sin evidencia de calcio asociada y escasa disminución de tamaño. Obliga a una conducta vigilante, siendo difícil de diferenciar del tumor viable (por la opacidad y los vasos emisarios). Es el patrón menos frecuente,

aparece después de aplicar quimioterapia y puede evolucionar a los otros patrones de regresión.

- **Tipo III:** es el más frecuentemente desarrollado, y consiste en una combinación de los tipos I y II. El calcio se localiza en el centro de la lesión. Para algunos es tan frecuente como el tipo I pero parece asociarse a una mayor tendencia a la recurrencia.³⁷⁶
- **Tipo IV:** aparece una cicatriz coriorretiniana completa, plana y despigmentada, con desaparición total del tumor y un excelente pronóstico. Se desarrolla frecuentemente tras el empleo de crioterapia, braquiterapia o termoterapia transpupilar.

Tras la aplicación de quimioterapia sistémica puede aparecer cualquier patrón de regresión, aunque lo más frecuente es el tipo III; el tratamiento de consolidación lo que persigue es que las lesiones de tipo II y III tras la quimioterapia pasen a ser de tipo IV.

Cuando aparece una recidiva o un recrecimiento tumoral sobre una zona de regresión de tipo I, habitualmente se aplica fotocoagulación láser sobre la superficie calcificada.

Tras la radioterapia externa el patrón más frecuente es el II; aunque los tumores más grandes presentan una regresión tipo I y los más pequeños (1 DP o menores) pueden desaparecer por completo.³⁷¹ Tras aplicar braquiterapia el patrón más frecuente son el II y el IV.

El patrón de regresión adoptado por los tumores tratados con quimioterapia primaria aislada es similar al desarrollado por los tratados con radioterapia externa, y se suele definir ya a partir del segundo o tercer ciclo de tratamiento, cuando se trata de pacientes respondedores.

Los retinoblastomas precoces y bien diferenciados y los retinomas o retinocitomas no adquieren ningún patrón de regresión, su aspecto antes del tratamiento ya es el del patrón II, y no varía después de aplicar el tratamiento.

Hay guías clínicas que protocolizan la necesidad de aplicar un tratamiento de consolidación focal según el patrón de regresión que adopte el tumor.

Tabla 10. Patrones de regresión y su Manejo Clínico.

PATRÓN DE REGRESIÓN	DESCRIPCIÓN	TRATAMIENTO CONSOLIDACIÓN
0	Desaparición de las pequeñas lesiones intrarretinianas. Sin cambios en el EPR.	No
I	Calcificación completa de la masa. Cambios EPR.	Probablemente
II	Masa gris translúcida, homogénea “fish-flesh”	Si
III	La más frecuente, combinación de las dos anteriores	Si
IV	Cicatriz coriorretiniana completa, con importantes cambios en EPR.	Si
RB precoz /retinoma	Aspecto similar al patrón II antes del tratamiento y sin modificaciones. Posibles quistes intralesionales.	Desconocido

No existe una pauta reglada para realizar los controles sucesivos, dependiendo del tipo de regresión tumoral; los patrones de regresión 0, I y IV se considera un control adecuado, mientras que los tipos II y III no parecen ser un patrón de regresión tan “seguro” y obligan a ser más vigilantes. Con la quimioterapia es más frecuente la aparición de recurrencias y nuevos tumores intraoculares, por lo que se va a requerir un mayor número de revisiones.

9.2. Recurrencias y Nuevos Tumores Durante el Seguimiento.

La importancia de continuar las revisiones en los pacientes tratados de retinoblastoma se fundamenta en el riesgo de las recurrencias o la aparición de nuevos tumores. Esto es especialmente importante en los pacientes con afectación bilateral o con tumores heredables, es decir, con mutación en la línea germinal, con o sin antecedentes familiares conocidos. Aproximadamente el 24% de esos pacientes sufren la aparición de nuevos tumores,²⁷⁵⁻²⁷⁶ que no se nutren, en un principio, por aporte sanguíneo directo, sino por difusión desde el vítreo, por eso la quimioterapia sistémica no es eficaz en su prevención.

Según la experiencia de Murphee las recurrencias suelen desarrollarse durante los primeros 2-6 meses posteriores a la administración de quimioterapia, aunque hay casos que se manifiestan con años de diferencia; de los casos recidivados, las dos terceras partes se resuelven con enucleación, y los restantes con un nuevo ciclo de quimioterapia asociado a tratamiento de consolidación agresivo.

La Retcam constituye una herramienta útil para el seguimiento de éstos pacientes. La recurrencia suele manifestarse oftalmoscópicamente como una fina elevación rosada, sobre el tumor principal, con una fina vascularización; una angiografía fluoresceínica valorada fácilmente con una Retcam demostraría desde etapas precoces una hiperfluorescencia precoz y mantenida.

Lo más accesible es realizar exploraciones seriadas bajo anestesia hasta los 3 años de edad, siempre que se consiga una remisión, y posteriormente sin anestesia con una exploración con oftalmoscopia indirecta y ecografía en modo B.

X. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

El diagnóstico diferencial no plantea dudas en los casos típicos, pero hay series en las que el diagnóstico inicial debe cambiarse hasta en el 50% de los casos,⁴⁹⁵⁻⁴⁹⁶ siendo la persistencia de la vasculatura fetal, enfermedad de Coats y la toxocariasis ocular los procesos más frecuentemente diagnosticados como retinoblastoma.⁴⁹⁶ Una completa anamnesis y una correcta exploración oftalmológica permitirán catalogar a la mayoría de los pacientes; en el resto, la ecografía, TC, RM y angiografía fluoresceínica serán de gran ayuda.

En 1993 de Potter y colaboradores evaluaron el papel de la resonancia magnética en la discriminación entre tumores sólidos intraoculares y otras causas que asocian desprendimiento de retina primario.⁴⁹⁴

10.1. Persistencia de la Vasculatura Fetal

Es una malformación congénita que se diagnostica en el momento del nacimiento o a edades muy tempranas, la presentación clínica tiene un amplio espectro de posibilidades. Se debe a un defecto en la regresión, proceso fisiológico, de la arteria hialoidea. El vítreo primario, que está vascularizado en la etapa fetal, persiste después del nacimiento. Según la localización se clasifica en formas anteriores, posteriores o mixtas. Habitualmente aparece como una placa retroental de tejido conectivo fibrovascular en un ojo microftálmico, que se adhiere a la capsula posterior del cristalino, que a su vez se opacifica progresivamente, y tracciona de los procesos ciliares centripetamente. La progresiva intumescencia del cristalino y la elongación anterior de los procesos ciliares provocan el aplanamiento de la cámara anterior y a menudo un glaucoma por cierre angular. Es frecuente observar un tallo vítreo central con restos de la arteria hialoidea, fibrosada o con flujo sanguíneo, que puede sangrar y producir hemorragias vítreas. La tracción sobre la base del vítreo y la retina periférica puede desencadenar un desprendimiento de retina traccional. En la forma posterior pueden aparecer pliegues retinianos, displasia del nervio óptico y desprendimiento de retina peripapilar. El 90% de los casos son unilaterales, aunque pueden observarse alteraciones menores en el ojo adelfo, como la mancha de Mittendorf o la papila de Bergmeister.⁴⁹⁷ Suele manifestarse clínicamente con estrabismo, nistagmo o leucocoria. El microftalmos y los procesos ciliares elongados facilitan el diagnóstico diferencial con

otras causas de leucocoria. La ecografía descarta las calcificaciones, confirma la microftalmía y puede mostrar los restos de la arteria hialoidea; también se ha utilizado la ecografía doppler.⁴⁹⁸ La TC y RM ayudan al diagnóstico en los casos más difíciles;⁴⁹⁹ que, en ocasiones, sólo es posible tras el estudio anatomopatológico. El tratamiento quirúrgico precoz puede evitar las complicaciones, y en algunas formas anteriores consigue una buena agudeza visual,⁵⁰⁰ aunque la mayoría de pacientes desarrollan una ambliopía severa.

Existe en la literatura un caso descrito de persistencia de la vasculatura fetal asociado a retinoblastoma infiltrante difuso.⁵⁰¹

10.2. Enfermedad de Coats

Es una anomalía del desarrollo vascular retiniano, caracterizada por la presencia de vasos telangiectásicos y aneurismáticos con exudación lipídica asociada. El 90% de los casos son unilaterales, siendo varones dos terceras partes. Aunque las anomalías vasculares posiblemente estén presentes desde el momento del nacimiento, los síntomas no aparecen hasta más tarde; la máxima incidencia aparece al final de la primera década.⁵⁰²

Suele manifestarse como leucocoria (más frecuente en los menores de 6 años) de tinte amarillento, estrabismo o disminución de agudeza visual; en ocasiones puede ser un hallazgo casual en una exploración rutinaria. En la oftalmoscopia se observan vasos telangiectásicos y aneurismáticos, hemorragias retinianas, exudación subretiniana amarillenta y engrosamiento retiniano, pudiendo formarse quistes intrarretinianos. Las alteraciones suelen iniciarse en los cuadrantes temporales y evolucionar a un desprendimiento exudativo que puede llegar a contactar con el cristalino, sobretodo en los pacientes de menor edad.⁵⁰² Una vez desprendida la retina el pronóstico visual es muy malo.⁵⁰³ Sin tratamiento puede desarrollarse glaucoma neovascular y ptisis.

El diagnóstico diferencial puede ser especialmente difícil con el retinoblastoma infiltrativo difuso, que cursa sin una masa tumoral visible por oftalmoscopia o detectable por ecografía o TC. Los cristales de colesterol refringentes, localizados en el espacio subretiniano sugieren el diagnóstico. Ante la duda entre retinoblastoma y enfermedad de Coats avanzada, algunos autores propugnan la enucleación primaria del globo ocular.⁵⁰⁴

La angiografía pone de manifiesto las alteraciones vasculares propias de la enfermedad de Coats, mientras que en el retinoblastoma se observa la red vascular tumoral como vasos dilatados que se introducen en su interior, pudiendo apreciarse microaneurismas y anastomosis en los márgenes tumorales. La ecografía puede mostrar engrosamiento retiniano y desprendimiento de retina localizado o completo, siendo característica la ausencia de masas y calcificaciones. La TC evidencia un desprendimiento de retina con una densidad homogénea en el espacio subretiniano y excluye la presencia de masas y calcificaciones. La RM muestra una imagen hiperintensa tanto en T1 como en T2, a diferencia del retinoblastoma, que se detecta como una masa hiperintensa en T1 e hipointensa en T2.¹⁵⁵

En estadios precoces puede emplearse como tratamiento la fotocoagulación y la crioterapia, consiguiendo conservar o mejorar la visión.^{503,505} En los casos avanzados es necesario drenar el líquido subretiniano. Cuando se asocia desprendimiento de retina traccional o membranas epirretinianas se precisa de tratamiento quirúrgico.⁵⁰⁶

10.3. Toxocariasis Ocular

Es una enfermedad originada por un parásito, habitualmente el *Toxocara canis*, que suele aparecer en niños o adolescentes y se relaciona con malos hábitos higiénicos y el contacto con perros o gatos. Habitualmente es de afectación unilateral y predomina en varones. Presenta varias formas clínicas:⁵⁰⁷ la que con más frecuencia se confunde con retinoblastoma es la endoftalmitis crónica,⁵⁰⁸ la forma de presentación es la leucocoria, suele asociar desprendimiento de retina, uveítis granulomatosa e hipopion. Su evolución crónica conduce a un estadio cicatricial con formación de una membrana fibrocelular en el vítreo o una membrana ciclítica retrocristaliniana. Tiene muy mal pronóstico visual. Es la forma de presentación mas frecuente en menores de diez años. En otros casos se manifiesta como un granuloma en el polo posterior, que contiene la larva, y que puede cursar sin signos de inflamación vítrea. En adolescentes o adultos jóvenes suele presentarse como un granuloma inflamatorio periférico. En otros casos se presenta de forma atípica, con papilitis, atrofia óptica, coriorretinitis difusa e incluso un nematodo subretiniano móvil. En el polo anterior puede aparecer conjuntivitis, queratitis, escleritis, nódulos en iris y catarata.

El diagnóstico oftalmoscópico puede ser difícil en los casos con afección vítrea severa. El granuloma aparece en ecografía como una masa de alta reflectividad, pudiendo aparecer calcio en el interior en pacientes mayores.⁵⁰⁹ En la AGF se aprecian anomalías vasculares y rectificación del trayecto de los vasos retinianos. El diagnóstico se basa en los tests inmunológicos. El test de ELISA es la técnica más utilizada.⁵¹⁰ Las diluciones en la forma ocular deben ser superiores a 1/8, con una sensibilidad del 90% y especificidad del 91%. Su negatividad descarta la presencia de infestación ocular. La técnica del Western Blotting aumenta la especificidad. El test de ELISA en líquidos intraoculares permite detectar altos niveles de IgG en el humor acuoso y vítreo aspirado, incluso mayores que en el suero, pero debe evitarse si se sospecha retinoblastoma.

El tratamiento se inicia tras descartar la posibilidad de retinoblastoma y depende de la inflamación y los cambios estructurales asociados. La terapia antihelmíntica (tiabendazol o albendazol de elección) ha sido cuestionada en la afectación ocular, pues puede producir una reacción de hipersensibilidad tipo III por la liberación de antígenos tras la muerte de la larva. Se utilizan midriáticos si el polo anterior se encuentra comprometido y corticoides (tópicos, periorbitales o sistémicos) si hay compromiso visual por la reacción inflamatoria. La vitrectomía se indica si hay desprendimiento de retina, membrana fibrocelular intravítrea o epirretiniana e incluso para la extracción de la larva.⁵¹¹ El láser puede aplicarse en casos atípicos de nematodo móvil subretiniano.

10.4. Astrocitoma Retiniano

Los hamartomas astrocíticos de la retina y del nervio óptico se observan con frecuencia en la esclerosis tuberosa (enfermedad de Bourneville) y rara vez aparecen de forma aislada. Esta facomatosis se caracteriza por epilepsia, retraso mental, adenomas sebáceos, esclerosis nodular de la corteza cerebral y tumores en el riñón y otros órganos. El 70% de casos se presentan de forma esporádica y el 30% con carácter autosómico dominante. Los astrocitomas son el hallazgo oftalmológico más frecuente (50% de pacientes); en el 50% de casos son bilaterales. Su presencia tiene gran importancia en la evaluación de todo niño afecto de crisis epilépticas y retraso mental. También pueden aparecer drusas gigantes del nervio óptico, colobomas atípicos, manchas hipopigmentadas en retina e iris, opacidades en el cristalino y turbidez vítrea.⁵¹²

La existencia de más de un astrocitoma es propia de la esclerosis tuberosa y la presentación en solitario es más típica de la neurofibromatosis (más extensos, aunque

raros) y en sujetos sin afectación sistémica.⁵¹³ Su tamaño oscila entre 0.5-4 diámetros papilares y a veces sólo se manifiestan como un ligero engrosamiento de la retina. Se localizan en las capas internas de la retina, ocultando un vaso arterial y extendiéndose hacia los márgenes del disco óptico. Morfológicamente hay tres tipos, que pueden coexistir en el mismo ojo y podrían ser etapas evolutivas del mismo tumor;⁵¹⁴ otros autores no encuentran correlación entre el tipo de tumor, la edad del paciente y el estadio evolutivo de la enfermedad:

- Tipo I: planos, de superficie lisa, semitransparentes, de forma oval o circular, color salmón y localizados sobretodo en el polo posterior. Pueden confundirse con pequeños retinoblastomas; el seguimiento estrecho nos permitirá su diferenciación.
- Tipo II: nodulares o multinodulares, de color blanco opaco y a veces calcificado, lo que puede dificultar el diagnóstico diferencial con el retinoblastoma.
- Tipo III o mixto.

Puede presentar áreas quísticas de exudados serosos y sangre junto a áreas calcificadas, lo que indica crecimiento tumoral. Con el tiempo pueden calcificarse o crecer. La AGF es esencial para el diagnóstico y seguimiento; en tiempos coroides muestra una lesión hipofluorescente que se rellena y hace hiperfluorescente en tiempos precoces, difundiendo contraste en tiempos tardíos. Además son autofluorescentes, pudiendo descubrirse así tumores oftalmoscópicamente invisibles.⁵¹² No precisan tratamiento, debiendo realizar un seguimiento periódico. También se ha descrito la asociación de retinoblastoma y neurofibromatosis I.⁵¹⁵

10.5. Retinopatía del Prematuro

Vitreoretinopatía fibroproliferativa y vasoproliferativa periférica, de etiopatogenia poco conocida, que aparece en recién nacidos inmaduros, generalmente expuestos a oxigenoterapia. Los estadios más avanzados (grados 4 y 5) cursan con desprendimiento de retina que puede presentarse como leucocoria unilateral o bilateral e incluso como una masa retrolental.⁵¹⁶⁻⁵¹⁷ El diagnóstico diferencial con el retinoblastoma no suele ser difícil, conociendo los antecedentes personales del paciente, excepto en casos unilaterales muy evolucionados. El tratamiento quirúrgico con cerclaje

escleral y/o vitrectomía, en los casos en grado avanzado de retinopatía del prematuro intenta conseguir la reaplicación retiniana y la mejoría de la función visual.⁵¹⁸

10.6. Displasia Vítreoretiniana

Es una anomalía del desarrollo embrionario del vítreo y la retina que puede aparecer de forma aislada o formando parte de varios síndromes. Su presentación bilateral es común en la enfermedad de Norrie, incontinencia pigmenti (síndrome de Bloch-Sulzberger), síndrome de Walker-Warburg (HARD±E) y en la forma aislada, con un patrón de herencia autosómica recesiva; también aparece en la trisomía 13 (síndrome de Patau), trisomía 18 y asociada a una gran variedad de malformaciones cerebrales. El diagnóstico diferencial entre estos síndromes se basa en las anomalías sistémicas asociadas y los antecedentes familiares, pues los hallazgos clínicos y anatomopatológicos son comunes.⁵¹⁹ El diagnóstico diferencial es importante para ofrecer un consejo genético adecuado.

La displasia retiniana se manifiesta en el nacimiento o poco después como una masa retrolental bilateral, relativamente avascular y sin signos inflamatorios, sin antecedentes de prematuridad ni oxigenoterapia. Se asocia con una cámara anterior estrecha, cristalino transparente y en ocasiones microftalmos (trisomía 13) y procesos ciliares elongados. El glaucoma por cierre angular es una complicación frecuente, a veces difícil de diagnosticar pues el aumento de presión intraocular puede ser transitorio y no muy acusado.⁵²⁰ También aparecen pliegues retinianos, hemorragia vítrea y desprendimiento de retina de aparición precoz. Puede evolucionar a opacificación corneal, queratopatía en banda y ptisis. La ecografía y TC no muestran calcificación en la masa retrolental.

10.7. Otras Causas menos frecuentes

Catarata Congénita. Habitualmente una exploración oftalmológica completa es suficiente para hacer el diagnóstico. La ecografía y TC permiten descartar anomalías asociadas no visibles por la opacidad del cristalino.

Endoftalmitis Metastásica. Aparece como una gran opacificación vítrea. La presencia de signos inflamatorios y relacionados con la infección sistémica suele permitir el diagnóstico diferencial.⁴⁹⁶

Meduloepitelioma (dictyoma). Tumor originado del epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar. Es una masa blanquecina, friable, frecuentemente localizada en los cuadrantes inferiores, que se extiende desde el cuerpo ciliar e invade cámara anterior,⁵²¹ pudiendo causar un glaucoma neovascular,⁵²² especialmente en casos avanzados. Aparece de forma unilateral, a edades más tardías que el retinoblastoma (edad media 5 años), con frecuencia presentando pérdida de visión y dolor. Las pruebas de imagen establecen el diagnóstico en los casos avanzados que impiden la exploración oftalmoscópica.

Hemangiomas Capilares (Angiomatosis Retiniana). Los casos muy evolucionados con gran exudación intrarretiniana y/o subretiniana o los angiomas que sufren gliosis y se oscurecen por el desprendimiento suprayacente pueden ser difíciles de diferenciar del retinoblastoma. La AGF muestra el carácter vascular del hemangioma, con su efecto de shunt arteriovenoso, y la ecografía no aprecia calcificaciones.⁵²³

Hamartoma combinado de retina y EPR. Tumor congénito benigno y poco frecuente, suele aparecer en la neurofibromatosis tipo 2.⁵²⁴

Uveítis crónicas granulomatosas con hipopion. Puede ser difícil el diagnóstico diferencial con retinoblastomas en estadio avanzado.

Pars Planitis. Casos de larga evolución con inflamación difusa.

Pliegues retinianos congénitos.

XI. GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

11.1. AVANCES CLINICOS

La información epidemiológica muestra diferencias geográficas llamativas en la incidencia del retinoblastoma unilateral no heredable, sugiriendo que el ambiente puede jugar un papel en el desarrollo del retinoblastoma mayor de lo sospechado.

Los nuevos marcadores histopatológicos presentes en los ojos enucleados por retinoblastoma, como el área vascular tumoral relativa, pueden tener mayor valor predictivo sobre el riesgo de metástasis que, por ejemplo, la invasión tumoral de la lámina cribosa y la coroides combinadas.

Sabemos desde hace años que la radioterapia externa utilizada como tratamiento aumenta el riesgo de desarrollar neoplasias malignas secundarias. De manera similar, desde que se publicó un estudio en 2004, parece haber una fuerte evidencia de que la presencia de mutación en la línea germinal también proporciona un aumento en el riesgo de desarrollar segundos tumores, como el de pulmón y el de vejiga, que normalmente aparecen en adultos mayores de 50 años, supervivientes al retinoblastoma, con mutación germinal y que no han sido tratados con radioterapia externa.⁵²⁵

11.2. AVANCES CIENCIAS BASICAS

En los últimos años el desarrollo del conocimiento de la proteína codificada por el gen RB1 (pRB) en el campo de la biología del cáncer en general y del retinoblastoma en particular ha progresado de forma dramática. El conocimiento de la estructura tridimensional de esta proteína nos proporciona una mejor comprensión de su funcionamiento.⁵²⁶

- La pRB actúa como supresor tumoral inhibiendo la proliferación y promoviendo la diferenciación de las células progenitoras retinianas.⁵²⁸ La mutación del RB puede llevar al desarrollo de retinoblastoma produciendo un defecto en la diferenciación que desencadene un acumulo de células retinianas embrionicas proliferantes.

- A nivel molecular, la proteína pRB inhibe la expresión de genes específicos reclutando “chromatin remodeling proteins” que alteran la estructura local cromosómica y lo hacen inaccesible para la transcripción.⁵²⁹
- Puede unirse de forma simultánea a varias proteínas, actuando como un “coupling factor” reclutando proteínas a genes específicos.
- La baja penetrancia de la enfermedad se debe a la presencia de sutiles mutaciones en el gen RB que inactivan parcialmente la proteína resultante.⁵³⁰

11.3. GENETICA DEL RETINOBLASTOMA

11.3.1. Genética Clínica

El conocimiento y descripción del retinoblastoma ha sido fundamental en la comprensión de las bases genéticas del cáncer. Aunque la incidencia del retinoblastoma está en torno a 1/15000 nacidos vivos, por sus características genéticas ha sido decisivo en el conocimiento de la etiología y el desarrollo de otros tumores localizados por ejemplo en el pulmón, mama, próstata, y, virtualmente, en cualquier otra localización.

Es un gen especial, tanto por las características de su patrón hereditario como porque fue el primer gen supresor clonado.

El 60% de los pacientes con retinoblastoma presentan un tumor que no es hereditario, y que si se resuelve tienen una esperanza de vida normal. La edad media en el diagnóstico es de 24 meses, suelen ser de localización unilateral y presentar un riesgo de desarrollar segundos tumores igual que la población general.³⁹⁴

El 40% restante son pacientes que presentan una mutación germinal en el gen RB1, es un grupo identificado como “síndrome de predisposición al cáncer heredable”. Heredar un alelo inactivo del gen RB1 confiere una predisposición a desarrollar cáncer (se comporta como dominante) pero la segunda mutación que inactive el otro alelo debe producirse al menos en un retinoblasto para que aparezca el retinoblastoma.

La aparición del tumor requiere de la inactivación de los dos alelos del gen RB1; el gen RB1 tiene un patrón recesivo. Sin embargo, al elaborar el pedigrí el tumor parece ser dominante, porque todos los retinoblastos son susceptibles de sufrir la mutación; y es muy probable (90-95%) que al menos uno sufra la mutación requerida para desarrollar el tumor, dicho de otro modo, una persona que presente el síndrome de

predisposición genética para cáncer, es decir, que su genotipo sea RB1+/rb1- desarrollará retinoblastoma con una probabilidad de 90-95%.

Sin embargo solo entre 7-10% de los pacientes con retinoblastoma tienen historia familiar positiva. Por lo tanto el 30% restante, de los pacientes con mutación en la línea germinal, son mutaciones de novo o son tumores de baja penetrancia. En estos casos, con mutaciones en la línea germinal, la edad media en el momento del diagnóstico es menor de 12 meses, y están predispuestos al desarrollo de una amplia variedad de tumores a lo largo de su vida.³⁹⁴ En torno al 85% de estos pacientes presentan tumores bilaterales y multifocales. En un rango de edad que oscila entre 2-5 años, el 2-3% de los pacientes desarrollarán tumores intracraneales de la línea media (principalmente de la zona pineal o supraselar), el estudio anatomopatológico de estos tumores demuestra su similitud con los retinoblastomas; son pinealoblastomas o PNET y constituyen el denominado retinoblastoma trilateral. Son tumores intracraneales que no son metastáticos sino primarios, y pueden diagnosticarse antes, a la vez o en los dos años consecutivos al diagnóstico del retinoblastoma, aunque han sido descritos hasta 10 años tras el diagnóstico de retinoblastoma.

Los pacientes con retinoblastoma heredable presentan un riesgo elevado de presentar osteosarcomas, sarcomas de partes blandas, tumores mesenquimales en la adolescencia, melanomas, tumores cerebrales en la edad media y tumores epiteliales malignos de pulmón o vejiga, entre otros. Este riesgo está muy aumentado sobretodo en las zonas que han sido expuestas a radioterapia.

11.3.2. Terminología Genética

La terminología genética utilizada en torno al retinoblastoma es, cuanto menos, confusa. En algunos casos se utiliza el término unilateral para referirse a los casos esporádicos y no heredables, sin embargo, sabemos que el 15% de los heredables se manifiestan de forma unilateral.⁵³¹

Ésta es la razón por la que algunos trabajos epidemiológicos que reportan la lateralidad del tumor y no dan información acerca del genotipo RB1 probablemente estén contaminados por los casos unilaterales-heredables y den una falsa impresión de que los pacientes con tumores esporádicos presentan también un elevado riesgo de presentar segundos tumores.²⁴⁸

Se denomina esporádicos a los que no tienen historia familiar, lo que no quiere decir que no sean heredables. Aproximadamente el 90-93% de todos los retinoblastomas (hereditarios o no) que se presentan clínicamente como esporádicos, esto es, sin historia familiar conocida, son debidos a mutaciones de novo, pero éstas no son mutaciones germinales, que a su vez, son las que pueden ser hereditarias. Por definición, todas las mutaciones somáticas serán de novo, pero éstas no son importantes en relación a la heredabilidad.

Todos los casos en una misma familia se consideran hereditarios, aunque podría darse el caso de aparecer una agregación familiar de pacientes con tumores esporádicos. Por lo tanto, los pacientes con tumores no heredables presentan mutaciones somáticas o no germinales en el gen RB1 (que podrían estar presentes sólo en las células somáticas de la retina) o podrían ser mosaicos. Los pacientes con tumores heredables presentan mutación en la línea germinal RB1 (presente en todas las células del cuerpo, tanto en la línea somática como en la germinal).

Para un estudio científico y riguroso sería imprescindible conocer el análisis genético completo de todos los pacientes y sus familiares.

11.4. GENÉTICA MOLECULAR DEL RETINOBLASTOMA

El patrón de herencia del retinoblastoma simula ser autosómico dominante, es decir, dada la expresión fenotípica, durante muchos años se consideró al gen RB1 como un gen de expresión dominante.⁵³²

Alfred Knudson en 1971 fue el primero que propuso que el retinoblastoma era causado por la adición de dos eventos o mutaciones: una en la línea germinal y otra en una célula somática. En las formas no hereditarias ambas mutaciones tienen lugar en las células somática.⁵³¹ Se denominó la “two-hit theory”, e implicaba una recesividad del gen a nivel celular y una pregunta hasta aquel momento sin precedentes. Hoy en día sabemos que muchos tumores se desarrollan a través de genes recesivos o genes supresores tumorales.

La hipótesis de Knudson no tuvo ninguna trascendencia en la siguiente década, por la ausencia de métodos científicos para identificar el gen RB1. Una ayuda importante para la identificación del gen RB1 fue el reconocimiento en los años sesenta

que una porción del grupo de cromosomas D (13, 14 y 15) presentaba ocasionalmente deleciones en los casos de retinoblastoma. Poco después de aparecer la hipótesis de Knudson aparecieron nuevas técnicas de bandeado para cromosomas que permitieron identificar el cromosoma 13 como la diana de esas mutaciones. Posteriormente se identificó y mapeó la región que sufría las deleciones, entre cr13q14.1 y cr13q14.3.⁵³³

Una enzima con actividad medible, como es la esterasa D, fue también mapeada en el cromosoma 13 y tuvo un papel crítico en el análisis de ligamiento en la era previa a la tecnología del DNA recombinante.

La esterasa D fue muy útil en la identificación del gen RB1; es una enzima que presenta dos variantes, y cada alelo contribuye a la mitad de la actividad enzimática total, además su gen está localizado muy próximo al gen RB1. El loci del RB1 y el de la esterasa D están localizados en el mismo segmento “deleccionable” del cr13q.⁵³⁴ Usando un mapeo de deleción clásico Sparkes y col estudiaron 5 pacientes con retinoblastoma y encontraron que todos tenían reducida la actividad de la esterasa D al 50%. De este modo, valorando la actividad de la esterasa D, se hacía el screening de la deleción del cromosoma 13.⁵³⁵

Basados en el hecho de que la deleción del cromosoma 13 y el locus para la esterasa D estaban fuertemente relacionados con el desarrollo de retinoblastoma y que en muchas familias era clínica y patológicamente indistinguible, Murphree and Benedict argumentaron que probablemente solo existiera un locus RB1.⁵³⁶

Además, del tejido extraído de tumores intraoculares de pacientes con manifestación unilateral también se encontraba la deleción 13q14, sugiriendo que todos los retinoblastomas presentarían el mismo gen en el locus 13q14.⁵³⁷

Actualmente hay consenso en considerar que existe un único locus para retinoblastoma, RB1 (o RB), mutado en todas las formas de retinoblastoma.

Benedict y sus colaboradores identificaron en un paciente con retinoblastoma familiar que presentaba un 50% de reducción de la actividad de la esterasa D en las células somáticas, y una ausencia total de actividad de la enzima en las células tumorales.¹⁸⁸ Dryja y colaboradores utilizaron fragmentos de DNA de 13q14 para identificar que las mutaciones homocigóticas podrían ocasionalmente ser identificadas en el tejido del retinoblastoma.⁵³⁸

En 1983 Cavenee y colaboradores probaron fuera de dudas el carácter recesivo del gen RB y popularizaron el uso del término de “perdida de heterocigosidad”. En

1983 comenzaron a utilizar fragmentos de restricción de DNA polimórficos capaces de discriminar qué copia del cromosoma 13 es la de origen materno y cual la de origen paterno para buscar el material genético defectuoso.⁵³⁹ Comparando fragmentos de DNA del tejido tumoral y del tejido normal encontraron que la región en torno al gen RB del tejido tumoral, con frecuencia, presentaba “reducción a la homocigosidad”. Es decir, una de las copias de la región en torno al gen RB se había perdido durante la tumorigenesis. Los autores proporcionaron evidencias de que la alteración genética era debida a una falta de disyunción en la mitosis (con pérdida de parte del cromosoma normal) y una recombinación en la mitosis (proceso por el que durante la mitosis se pierde una parte de uno de los pares cr.13 y se repara mediante la duplicación y transferencia de la porción correspondiente del cromosoma homólogo). En 1985 los mismos autores dieron un paso más, identificando que en los casos unilaterales el locus 13q de la línea germinal (con la mutación) se transmitía a través de los miembros afectados de la familia y era siempre la misma que se mantenía en el tumor.⁵⁴⁰

Los mecanismos cromosómicos implicados en la “reducción a la homocigosidad” o en la “pérdida de la heterocigosidad” en el locus 13q14 se describen a continuación:

- No disyunción y pérdida de la copia del cromosoma 13.
- No disyunción y reduplicación de la copia del cromosoma 13.
- Recombinación en la mitosis.
- Delección 13q14.
- Inactivación genética.
- Mutación.

Todos ellos son mecanismos que alteran la segunda copia del 13q14, es decir, una de las dos copias del genotipo del retinoblasto presentaría la primera alteración definida como “*first hit*” (mutación o delección) y la segunda copia sería la que sufriría alguno de los procesos “*second hit*” en el genotipo de la célula tumoral, desencadenando el desarrollo del retinoblastoma.

El genotipo del retinoblasto con el “*first hit*” se representa como rb^-/Rb^+ , donde rb^- representaría el alelo alterado. El genotipo de las células que presentan el “*second hit*” se representa como $rb^-/(-)$ cuando se trata de la pérdida del alelo por no disyunción, o una delección y como rb^-/rb^- en el resto de los casos.

Un paso muy importante en la identificación del gen RB fue la clonación del gen de la esterasa D.⁵⁴¹⁻⁵⁴² Cuando se comenzaron a utilizar las técnicas de DNA recombinante era preciso que el gen que se pretendía clonar tuviera una actividad que pudiera ser cuantificable, como ocurre con la esterasa D. una vez el gen de la esterasa D fue clonado, su secuencia de DNA fue aprovechada para comprobar los fragmentos de DNA cromosómico adyacentes e identificar los genes próximos. Pocos meses después de la clonación del gen de la esterasa D, la búsqueda del gen RB culminó con la identificación de un gen muy largo que contenía delecciones en la mayoría de los retinoblastomas.⁵⁴³ Además el RNA mensajero (RNAm) transcrito a partir de este gen también presentaba un tamaño anormalmente corto en la mayoría de los casos con retinoblastoma. A pesar de que muchos investigadores dudaban de que ese gen fuera realmente el RB,⁵⁴⁴ trabajos posteriores lo confirmaron. Por ejemplo, la re-introducción del gen RB dentro de las células del retinoblastoma así como en otras células tumorales con alteraciones en el RB producía una supresión en el fenotipo neoplásico, demostrando que el gen RB se trata realmente de un gen supresor.⁵⁴⁵⁻⁵⁴⁶

A principios de los noventa gracias al desarrollo del conocimiento de la biología molecular se describe el patrón de herencia del retinoblastoma. La transmisión de una copia inactiva del RB condiciona la predisposición para desarrollar retinoblastoma. La inactivación de la segunda copia es lo que se precisa para que se desarrolle finalmente el tumor.

11.5. EL GEN RB

Se trata de un gen que contiene 27 exones a lo largo de más de 200 kilobases de DNA.⁵⁴⁷ Cada exón tiene un tamaño que oscila entre 31 pares de bases (pb) (exón 24) y 1889 pb (exon 27). El extremo 5' del gen está orientado hacia el centrómero del cromosoma 13. La región promotora no presenta el típico TATA box, pero contiene una región CpG-rich, también denominada *isla CpG*. Las mutaciones de la línea germinal se distribuyen a lo largo del gen presentando puntos calientes mutacionales localizados en los dinucleótidos CpG.⁵⁴⁸

Menos del 10% de los pacientes con retinoblastoma presentan una anomalía en el cromosoma 13q (habitualmente delecciones) que puedan ser identificadas con un cariotipo.⁵⁴⁹ Las delecciones que son más grandes pueden asociarse con el síndrome 13q, que presentan un fenotipo característico. Entre el 15 y el 20% de las mutaciones

germinales son demasiado pequeñas para detectarse con las pruebas citogenéticas habituales, pero pueden ser identificadas mediante análisis de reordenamiento del DNA, con la técnica de *southern blot*.

La mayoría de las mutaciones halladas en el gen RB que son alteraciones en uno o varios nucleótidos que son detectadas con métodos de alta resolución:

- polimorfismo conformacional de una hebra simple (SSCP)
- electroforesis en gel de gradiente desnaturalizado (DGGE)
- chemical cleavage mismatch detection (HOT technique)
- secuenciación directa.⁵⁵⁰⁻⁵⁵¹

La mayoría de las mutaciones identificadas son del tipo *frameshift* y *nonsense*. Con menor frecuencia aparecen alteraciones del tipo *inframe*, *missense* o *splicing*.⁵⁵²

Las mutaciones *frameshift* y *nonsense*, las más frecuentes, dan lugar a proteínas truncadas, no funcionales. Las mutaciones *inframe* dan lugar a proteínas con ausencia de uno o varios aminoácidos, pero no son proteínas truncadas, y se suelen asociar a fenotipos de baja penetrancia. Las mutaciones *missense* provocan un cambio de aminoácido por otro, que tampoco ocasionan proteínas truncadas y están casi siempre asociadas a fenotipos de baja penetrancia. Las mutaciones del tipo *splicing* afectan al procesamiento del ARN, y dependiendo del exón afectado pueden dar lugar a proteínas truncadas o proteínas con alteraciones similares a las ocasionadas por las mutaciones del tipo *inframe*.

La posibilidad de utilizar las proteínas Rb truncadas, producto de una mutación experimental, y ver el comportamiento del retinoblastoma que ocasionan, ha sido propuesta hace muchos años, y es una técnica viable desde hace poco tiempo.⁵⁵³

Sorprendentemente se ha descrito que la mayoría de las mutaciones en la línea germinal tienen origen en la copia heredada por vía paterna, sugiriendo que los genes son más susceptibles a las mutaciones durante la espermatogénesis que durante la ovogénesis.⁵⁵⁴

La mutación sobre el segundo alelo del gen RB se debe habitualmente a aberraciones cromosómicas, condicionando la pérdida de heterocigosidad, que se valora

utilizando el análisis de polimorfismo.⁵⁴⁰ Estas segundas mutaciones presentan una tasa de incidencia mucho mayor que las de la línea germinal, (aproximadamente 10^3 comparado con 10^7 para la primera mutación).⁵⁵⁵ El mecanismo más frecuentemente implicado en la pérdida de heterocigosidad es la recombinación mitótica (50%), seguido de la no disyunción asociada o no a reduplicación posterior (cerca del 40%).⁵⁵⁶ Otros mecanismos implicados, con mucha menor incidencia son pequeñas deleciones y conversiones genéticas.

11.6. RETINOBLASTOMA DE BAJA PENETRANCIA

Penetrancia es el término que se utiliza para definir la frecuencia con la que una enfermedad hereditaria se manifiesta en la descendencia de los individuos afectados.

Expresividad es el término que define la variabilidad en las manifestaciones clínicas de los individuos afectados. Por ejemplo, los pacientes con retinoblastoma heredable que desarrollan únicamente una enfermedad unilateral, presentan una reducida expresividad.

En líneas generales una reducida penetrancia y reducida expresividad tiende a segregarse en las mismas familias.⁵⁵⁷

Globalmente, la penetrancia del retinoblastoma ronda en torno 80-90%, pero esto es valorando en conjunto un grupo heterogéneo de familias con alta y baja penetrancia como un mismo grupo.⁵⁵⁷

La proporción de ojos afectados (la proporción del número de ojos con tumor respecto del número de portadores de la mutación en una misma familia) ha sido inventado para identificar cuantitativamente las familias con retinoblastoma de baja penetrancia teniendo en cuenta tanto la penetrancia como la expresividad.⁵⁵² La mayoría de las familias con enfermedad de baja penetrancia tienen una proporción de ojos afectados menores de 1.5, mientras que las familias con enfermedades con penetrancia completa típicamente tienen una ratio de 1.5 o mayor. En un principio los investigadores postularon que los retinoblastomas de baja penetrancia eran debidos a factores inmunológicos, metilación del DNA, mecanismos epigenéticos, mutaciones retrasadas, factores de resistencia del huésped, genes moduladores o segundos locus para retinoblastoma.⁵⁵⁷⁻⁵⁵⁹ Sin embargo, recientes estudios han demostrado que los retinoblastomas de baja penetrancia resultan de mutaciones en el locus del RB que dan lugar al desarrollo de proteínas de actividad reducida.⁵⁶⁰⁻⁵⁶² Una de las más comunes de

esas mutaciones que determinan una baja penetrancia es una alteración de tipo missense localizada en el codón 661 (exon 20).⁵⁶³ Otras mutaciones que determinan baja penetrancia incluyen la delección 3-bp en el exon 16, que resulta en la delección de Asn 480,⁵⁶⁰ una delección de 4-kb que incluye los exones 24 y 25,⁵⁶⁴ y mutaciones splicing en la última base del exon 21.^{562,565}

Todo lo que se ha desvelado acerca de las mutaciones de los retinoblastomas de baja penetrancia ha aportado mucha información al conocimiento del funcionamiento de la proteína Rb.⁵³⁰

11.7. MUTACIONES DEL GEN RB EN TUMORES

Como es esperable, las mutaciones del gen RB tienen lugar con frecuencia en tumores relacionados con el retinoblastoma, como son los osteosarcomas, sarcomas de partes blandas y otros tumores mesenquimales.^{31,566-567} También se encuentra alterado en tumores malignos de adultos, como son los de mama, pulmón y próstata.⁵⁶⁸⁻⁵⁷⁰

Con los últimos avances en el conocimiento del gen RB y la proteína que codifica, sabemos que existe una disrupción del gen RB en la mayoría de las neoplasias humanas, por mutaciones del gen o, más frecuentemente, por inactivación funcional de la proteína Rb.⁵⁷¹

11.7.1. Proteína Rb y Supresión Tumoral

El gen RB codifica un RNAm de 4.7 kb que cuando se transcribe produce una proteína de 110 kilodaltons y 928 aminoácidos. Ésta proteína es fosforilada de un modo dependiente del ciclo celular y se localiza en el núcleo celular.⁵⁷²⁻⁵⁷³ La forma hipofosforilada es la predominante en las células en fase de diferenciación o quiescentes, mientras que la forma hiperfosforilada se acumulan en las células en ciclo celular, cuando entran en la fase de síntesis del DNA (fase S).⁵⁷⁴⁻⁵⁷⁶

La forma hipofosforilada se une a algunas oncoproteínas virales, incluyendo el antígeno T grande de SV40,⁵⁷⁷ la proteína adenoviral E1a,⁵⁷⁸ y la proteína E7 del papilomavirus humano.⁵⁷⁹ Cuando éstas oncoproteínas se unen a la proteína Rb se estimula la división celular. De lo que se deduce que la forma hipofosforilada desencadena una regulación negativa del ciclo celular y que esta actividad inhibitoria puede frustrarse mediante una fosforilación o mediante la unión con oncoproteínas

virales. Trabajos posteriores han demostrado que la principal función de la proteína Rb en el ciclo celular es inhibir la transición de las células de la fase gap 1 (G1) a la fase S.⁵⁸⁰ Sin embargo también desempeña otros papeles en otras fases del ciclo celular.⁵⁸¹

El principal adelanto en el conocimiento de la regulación del ciclo celular por la proteína Rb, fue la observación de la unión de la proteína con la familia de los factores de transcripción E2F.⁵⁸²⁻⁵⁸⁴ La función de la proteína Rb es altamente dependiente de la interacción con los E2F.⁵⁸⁵ Los sitios E2F están localizados en la región promotora de muchos genes que son importantes para la progresión del ciclo celular, la Rb reprime la transcripción de esos genes a través de su interacción con los E2F.⁵⁸⁶⁻⁵⁸⁸

Los E2F, y no la Rb, presentan un dominio de unión al DNA; la asociación Rb-E2F podría explicar como el Rb es atraído a elementos específicos del DNA para ejercer su efecto. La mayoría de los E2F presentan un dominio de transactivación que estimula la expresión de genes que contienen sitios de unión a E2F en sus propios promotores. Rb se une al E2F dentro del dominio de transactivación, enmascarando este dominio, y de ese modo, inhibiendo su actividad.⁵⁸⁹ Ya que los factores de transcripción E2F activan genes involucrados en la división celular,⁵⁹⁰ la inhibición de los E2F proporciona una explicación del mecanismo por el que la proteína Rb inactiva la división celular.

Sin embargo, todo se complica cuando se reconoce que la proteína Rb también tiene actividad como represor transcripcional de forma activa o intrínseca y es capaz por si sola de bloquear la expresión de genes cuando se une de forma artificial a promotores mediante otras proteínas distintas del grupo E2F.⁵⁹¹⁻⁵⁹⁴

Estos hallazgos sugieren una complicada relación entre Rb y E2F; en algunas situaciones Rb inhibiría la expresión de determinados genes únicamente enmascarando el dominio de transactivación de E2F, mientras que en otras situaciones E2F serviría como “courier” para poner en contacto a la Rb con genes específicos para desencadenar una represión activa.

La importancia de la “represión activa” del Rb es señalada en muchos estudios que demuestran que su actividad es requerida para inhibir el paso de G1 a S en la transición del ciclo celular. Varios autores han elaborado una hipótesis sobre el modo en el que la proteína Rb podría reprimir la transcripción de una manera activa; la proteína Rb se uniría y reclutaría a ciertos promotores de proteínas que alterarían la estructura de la cromatina, como son la deacetilasa de histonas,⁵⁹⁵⁻⁵⁹⁶ la ATPasa SWI-SNF,⁵⁹⁷⁻⁵⁹⁹ la

metiltransferasa de DNA,⁶⁰⁰ los complejos polycomb,⁶⁰¹ y la metilasa de histonas.⁶⁰² La transformación local de la estructura de la cromatina en una conformación restringida impide el acceso a la maquinaria transcripcional, de ese modo inhibe la expresión, mientras que la reorganización dinámica de la cromatina en una configuración abierta permite la transcripción genética. Dependiendo de la naturaleza del complejo de remodelado de la cromatina que halla reclutado la proteína Rb la inhibición del ciclo celular puede ser temporal, como ocurre durante el periodo de quiescencia durante la división celular, o permanente, como ocurre durante la diferenciación celular y la senescencia.⁵²⁹

Estudios acerca de la estructura tridimensional de la proteína Rb proporciona un mejor conocimiento de cómo la proteína lleva a cabo esas complicadas funciones. La región central de la proteína Rb presenta un box A y un box B, que han sido muy conservados y presentan una alta homología tanto en el reino animal como en el vegetal. Estas regiones interactúan entre sí a través de un interdominio para formar el bolsillo A-B.⁵⁹¹ La función de ese bolsillo es crítica para la función supresora de Rb, y es alterado por la mayoría de las mutaciones germinales de los pacientes con tumores hereditarios y de las mutaciones somáticas localizadas solamente en las células tumorales.⁶⁰³⁻⁶⁰⁴

Éste bolsillo es fundamental para llevar a cabo las uniones con:

- E2F
- Enzimas de remodelación de la cromatina
- Oncoproteínas virales
- Otras moléculas.

Muchas de esas proteínas que se unen a Rb contienen una región (o *binding motif*) con el motivo LxCxE (leucina-aa variable-cysteína-aa variable-acido glutámico), el cuál ha sido evidenciado por cristalografía y localizado en el box B.⁵²⁷

El box B no adquiere una configuración activa hasta que se une al box A, de ese modo proporciona una explicación de cómo ambos boxes del dominio del bolsillo son requeridos para la correcta actividad de Rb.

El grupo de los E2F, sin embargo, no presentan el motivo LxCxE mencionado anteriormente, sino que se une a Rb a través de otra estructura bioquímica.⁵²⁶ Así se explica de forma estructural como Rb puede unirse de forma simultánea a E2F y a otras proteínas de remodelado de la cromatina que se unen a través del motivo LxCxE.⁵⁹⁹

La función molecular actual de Rb es encargarse de organizar complejos de multiproteínas que reclutarían los promotores específicos a través de E2F, controlando así el acceso a la maquinaria transcripcional. De ese modo, Rb regularía de un modo dinámico e integrado la expresión de genes específicos, involucrados en la división celular, la diferenciación y la apoptosis.⁶⁰⁵

El extremo carboxiterminal de la proteína Rb también tiene un papel crítico en su funcionamiento, es requerido, junto con el bolsillo, en la unión con E2F.⁶⁰⁶ Es además donde se localizan la mayoría de los sitios de fosforilación de la proteína, a través de los cuales se regula la actividad de la proteína.⁶⁰⁷

Recientes trabajos han demostrado que la fosforilación del extremo carboxiterminal de la proteína Rb inicia una nueva interacción intramolecular que progresivamente desactiva la Rb y la célula entra en ciclo celular.⁶⁰⁸ La región carboxiterminal también presenta zonas de unión con oncoproteínas como son c-abl y MDM2.⁶⁰⁹⁻⁶¹⁰

La actividad tirosin-quinasa de c-abl se bloquea cuando ésta forma un complejo con Rb,⁶⁰⁹ dicha interacción es muy importante para la supresión del crecimiento mediado por Rb.⁶¹¹ Además, bloqueando directamente c-abl, la región carboxiterminal también parece participar en el acoplamiento de complejos multiméricos que contienen Rb, E2F, c-abl y, potencialmente, otras proteínas.⁶¹²

La importancia de la interacción Rb-MDM2 es menos clara. MDM2 interacciona con el p53, proteína supresora tumoral y se opone a su actividad proapoptótica reprimiendo la activación transcripcional del p53 y facilitando (mediando) su degradación.⁶¹³

Mientras que los resultados iniciales demostraban que MDM2 bloqueaba la función de Rb, estudios más recientes han demostrado que Rb forma un complejo trimérico junto con MDM2 y p53, bloqueando de este modo la actividad antiapoptótica de MDM2, previniendo la degradación de p53.⁶¹⁴

La función del extremo aminoterminal de Rb es mucho más desconocida. Ésta región contiene sitios susceptibles de fosforilaciones que regularían la actividad de la proteína. Esta región aminoterminal también puede interactuar con muchas otras proteínas, incluyendo un factor autorizador de la replicación (MCM7),⁶¹⁵ una nueva kinasa reguladora del ciclo G2/M,⁶¹⁶ y otras proteínas.⁶¹⁷ Sin embargo la función de éstas interacciones no ha sido establecida.

Hay un modelo experimental de ratón (Rb+/-) que desarrolla tumores hipofisarios. Sin embargo, los ratones (Rb+/-) que desarrollaron tumores hipofisarios debido a la pérdida de Rb no pudieron ser “rescatados” por la expresión de una forma mutante de Rb que carecía de la región aminoterminal, aunque el inicio de estos tumores fue más tardío. En otros experimentos, la supresión tumoral mediada por Rb estaría realmente aumentada cuando la región aminoterminal ha sido eliminada.^{503,618} De este modo, la región aminoterminal parece contribuir de manera decisiva en la actividad supresora tumoral del Rb.

El gen RB no sólo ha sido el primer gen identificado como supresor tumoral, la ruta de Rb también ha sido la primera y sigue siendo una de las principales rutas de los genes supresores tumorales en el cáncer humano.⁵⁷¹ Como ha sido descrito, la proteína Rb es crítica en la regulación del ciclo celular, tanto en la senescencia, como en la diferenciación y la apoptosis celular, todos esos procesos son regulados durante el desarrollo tumoral.⁶¹⁹⁻⁶²³

Mientras que la ruta de Rb está disregulada virtualmente en todos los tumores,⁵⁷¹ el gen RB solo aparece mutado en un limitado espectro de tumores. En los demás, la proteína Rb es inactivada manteniéndose en un estado de hiperfosforilación.

La disregulación de la ruta de Rb se consigue mediante el control del estado de fosforilación del Rb a través de kinasas e inhibidores de kinasas.

11.7.2. Vía del Supresor Tumoral RB1

La progresión normal del ciclo celular tiene lugar cuando Rb se inactiva por medio de su fosforilación, lo cual es catalizado por las kinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que forman complejos con las ciclinas correspondientes.^{574,624}

Rb contiene 16 sitios susceptibles de sufrir fosforilación mediada por CDK; su estado, en las células en ciclo celular, oscila entre las formas hipofosforiladas y las hiperfosforiladas. Al menos se conocen tres complejos kinasa/CDK que median la fosforilación de Rb durante el ciclo celular:

- ciclina D-CDK4/6 fosforila Rb en fase precoz de G1.
- ciclina E-CDK2 fosforila Rb en fase tardía de G1.
- ciclina A-CDK2 mantiene la fosforilación durante la fase S.⁵⁷¹

La fosforilación de ciertos sitios específicos regula distintas funciones de Rb, sugiriendo una compleja ordenación. Por ejemplo, la unión con E2F de proteínas con región LxCxE y c-abl está regulada mediante la fosforilación de distintos puntos en la región carboxi-terminal.^{625,626}

Rb va fosforilándose de forma secuencial, según un patrón prediseñado, gracias a diferentes CDKs durante el ciclo celular. Realmente, las fosforilaciones sucesivas de Rb por los complejos ciclina D-CDK4/6 y ciclina E-CDK2 parecen ser necesarios para hiperfosforilar completamente la proteína Rb.⁶²⁴

Recientemente se ha elaborado una teoría acerca del mecanismo mediante el cual los complejos ciclina D-CDK4/6 y ciclina E-CDK2 podrían regular distintas funciones de Rb.⁶⁰⁸

El complejo ciclina D-CDK4/6 fosforila determinados sitios específicos en la región carboxiterminal, lo que desencadena una interacción intramolecular entre la región carboxiterminal fosforilada y un “lysine patch” cargado positivamente envolviendo el sitio de unión LxCxE en el box B del bolsillo A-B. Esta interacción desplaza a las proteínas con motivo LxCxE, como la histona deacetilasa, del bolsillo, de ese modo se bloquea la posibilidad de que Rb detenga el ciclo celular.⁶⁰⁸ Sin embargo, la proteína Rb, en ése estado parcialmente fosforilado, aún puede unirse a E2F. Bajo condiciones de hiperfosforilación, la interacción intramolecular entre el extremo carboxiterminal del Rb y el bolsillo AB también puede reclutar ciclina E-CDK2 en el

bolsillo, donde fosforila a la serina-567, que de otra manera está oculta o enterrada dentro del bolsillo resultando inaccesible.⁶⁰⁸

La serina-567 establece contactos decisivos entre los dominios A y B, y su fosforilación altera la interfase A-B interrumpiendo la unión entre Rb y E2F. La localización crítica de esta serina queda puesta de manifiesto por el hecho de que se trata del único fosforeceptor de CDK en Rb diana de mutaciones missense de aparición natural en tumores.⁶²⁷ La inactivación más completa de Rb, indicada por la fosforilación de la serina-567, conduce a la liberación de E2F y a un aumento de la apoptosis.⁶²² Considerados de forma conjunta, estos hallazgos sugieren que el ciclo celular normal puede estar regulado parcialmente por la fosforilación de Rb catalizada por la ciclina D-CDK4/6, mientras que la fosforilación completa, que requiere de la actuación de la ciclina E-CDK2, podría servir como punto de control frente a un estado hiperproliferativo anormal, que desencadenaría la muerte celular.

Las proteínas denominadas inhibidores de kinasas dependientes de ciclina (CDKIs) y que inhiben las kinasas que fosforilan Rb, añaden un estrato de complejidad en la regulación de Rb. La proteína p16^{INK4a} es una CDKI que inhibe específicamente CDK4, la cual cataliza la fosforilación temprana de Rb.⁶²⁸ Como proteína supresora de tumores que es, p16^{INK4a} se encuentra mutada o inactivada en muchos tipos de cáncer, incluyendo el melanoma cutáneo y ungueal.⁶²⁹ La pérdida de p16^{INK4a} permite a la ciclina D-CDK4 actuar libremente en la fosforilación de Rb, lo cual resulta en una inactivación funcional de Rb. Debido a que Rb y p16^{INK4a} actúan en la misma vía y puesto que la mutación de cualquiera de estos genes resulta en una disregulación similar del ciclo celular, ambos genes se encuentran excepcionalmente mutados en un mismo tumor.⁶³⁰ Otras CDKI como p21 y p27 tienen un papel más amplio en la regulación del ciclo celular.⁶³¹

La complejidad de la vía supresora de tumores de Rb se encuentra significativamente aumentada por el hecho de que existen dos miembros más de la familia Rb –p107 y p130– así como siete o más miembros de la familia E2F.⁶⁰⁵ Los genes que codifican p107 (RBL1) y p130 (RBL2) han sido clonados y mapeados en las regiones del cromosoma humano 20q11.2 y 16q12.2 respectivamente.⁶³²⁻⁶³³ Las proteínas p107 y p130 comparten una extensa homología con Rb respecto al dominio

bolsillo, y están implicadas en la regulación del ciclo celular.⁶³⁴ Aunque todavía no está claro por qué son necesarios tantos miembros de la familia Rb y E2F, trabajos recientes sugieren que miembros específicos de la familia de Rb interactúan de forma preferente con miembros específicos de la familia E2F durante fases muy precisas del ciclo celular. Así, Rb interactúa fundamentalmente con E2F1-3 y es especialmente activa durante la transición de la fase G1 a S. En contraposición, p130 interactúa fundamentalmente con E2F4 y E2F5 y es especialmente activa durante G0, la fase quiescente del ciclo celular.⁶⁰⁵ Todo ello conforma un modelo de gran precisión en el que la red Rb-E2F regula la expresión genética mediante interacciones complejas y dependientes del contexto entre proteínas de bolsillo, miembros de la familia E2F y otros co-factores tales como los de remodelación de la cromatina.

Actualmente existen evidencias que apoyan la hipótesis de que la inactivación mutacional de Rb es el evento desencadenante en el retinoblastoma. Sin embargo, todavía persisten numerosas cuestiones por contestar respecto a la patogenia de este tumor. Así, si Rb es importante en la regulación normal del crecimiento celular y la desdiferenciación de todo el organismo, ¿por qué motivo una mutación en la línea germinal del gen RB predispone primariamente a padecer éste tumor tan poco frecuente? Indudablemente, los portadores de mutaciones de RB se encuentran predispuestos al desarrollo de una gran variedad de tumores, pero la edad a la que aparece la mayor susceptibilidad es diferente para cada tumor. Mientras el retinoblastoma ocurre preferentemente desde el nacimiento a los 5 años de vida, los tumores mesenquimales tienden a aparecer en la adolescencia y el melanoma tiene su pico de incidencia algo más tarde. Un trabajo reciente demuestra que la incidencia de tumores epiteliales se encuentra incrementada en los supervivientes de retinoblastoma, aunque este efecto sólo se manifieste a partir de los 40 años de edad.⁵²⁵ De esta forma, parece probable que la pérdida de RB predisponga a un amplio espectro de neoplasias, cada una de las cuales precisa diferente número y tipo de “impactos” para que la tumorigénesis sea manifiesta; cuantos menos “impactos” se precisen, más temprana será la presentación tumoral.

Si bien la mutación del gen RB es claramente necesaria para la formación del retinoblastoma, no está claro que la inactivación de RB aislada sea suficiente para la poner en marcha el proceso de tumorigénesis. Algunos investigadores han argumentado

que son precisas mutaciones adicionales en otros genes de acuerdo a las siguientes observaciones;

- En primer lugar, la delección de RB en células normales desencadena la apoptosis y no la transformación tumoral, ya que desencadena una respuesta apoptótica mediada por p53.⁶³⁵ Ello probablemente explica por qué la mayoría de los cánceres contienen mutaciones tanto en RB como en p53.⁶³⁶
- En segundo lugar, los retinoblastomas no pueden ser reproducidos en ratones a menos que tanto RB como p53 se encuentren inactivados.⁶³⁷ Esto llevó a la búsqueda de mutaciones en p53 u otros genes pro-apoptóticos en el retinoblastoma. De forma interesante, sin embargo, p53 se encuentra mutada raramente en el retinoblastoma en humanos⁶³⁸. Recientemente se ha descubierto que el gen MDMX, al igual que el MDM2, se une a p53 e induce su degradación por el proteosoma, está amplificado en los retinoblastomas y ha sido estudiado en modelos animales de retinoblastoma.⁶³⁹
- Por último, las alteraciones citogenéticas en otros cromosomas (p.e. 6p), se observan frecuentemente en los retinoblastomas, sugiriendo potencialmente la presencia de otros genes asociados a retinoblastoma localizados en dichas regiones cromosómicas.⁶⁴⁰⁻⁶⁴¹

Mientras que ésta línea de trabajo que apoya la existencia de un “segundo gen RB” no puede ser afirmada o negada en el momento actual, el patrón de herencia en el retinoblastoma indica que las mutaciones en el gen RB son claramente limitadoras de la tasa de incidencia, por lo que otros fenómenos deben acontecer con una incidencia tan elevada que no afecten el patrón clínico hereditario. El énfasis depositado en los modelos murinos para comprender la génesis del retinoblastoma puede tener sus limitaciones. Los retinoblastomas que acontecen de forma espontánea son virtualmente inexistentes en ratones y otros animales, sugiriendo que la retina humana en su desarrollo puede presentar factores anatómicos, celulares y moleculares que le hacen particularmente susceptible a desarrollar éste tumor.

Una explicación alternativa para la patogénesis del retinoblastoma simplemente es que las células retinianas progenitoras pasan por un periodo ventana de susceptibilidad previo a su diferenciación terminal, en la cual la pérdida de Rb genera un defecto en la diferenciación (más que una respuesta apoptótica) y ésta promueve la

acumulación de células embrionarias retinianas proliferativas. Ésta hipótesis no requiere la existencia de más “genes retinoblastoma” y explica un buen número de observaciones tanto clínicas como del desarrollo.⁶⁴² Indudablemente Rb requiere una forma autónoma en la célula para la salida adecuada del ciclo celular y la diferenciación de las células progenitoras de la retina.⁵²⁸ Además, la distribución topográfica de los tumores retinianos es superponible al patrón de diferenciación retiniano: la retina se diferencia en el tiempo siguiendo el patrón de una onda con una ruta posterior-anterior desde el polo posterior a la ora serrata.⁶⁴³ De forma interesante, el desarrollo cronológico del retinoblastoma sigue éste mismo patrón, de forma que los tumores más precoces ocurren en localización más posterior y los tardíos ocurren más frecuentemente en la periferia^{486,644}. Las células progenitoras retinianas que conservan la capacidad para diferenciarse en fotorreceptores, neuronas y glia pueden ser identificadas en la retina incluso hasta después del nacimiento⁶⁴⁵, sugiriendo que existe una ventana de susceptibilidad desde la semana 12 del desarrollo fetal hasta la edad de 4-5 años durante la cual la pérdida de ambos alelos del gen RB tiene la capacidad de producir retinoblastomas.

Otro punto de controversia existe en lo que respecta al origen del retinoblastoma. Los retinoblastomas derivan de células epiteliales inmaduras de la capa interna de la copa óptica que tienen la capacidad de diferenciarse en fotorreceptores, conos y bastones, así como en células de Müller.⁶⁴⁶ Diversos estudios han demostrado la presencia de marcadores específicos de conos, como la transducina, pigmentos de cono (opsina roja y verde) y fosfodiesterasas de cono en retinoblastomas.⁶⁴⁷ Sin embargo, ya que la diferenciación en conos puede representar una vía “por defecto” en ausencia de la señalización normal,⁶⁴⁸ no queda claro si los retinoblastomas se originan de neuroblastos que se han encaminado en la línea de diferenciación de los conos, o si bien los retinoblastos que pierden Rb son incapaces de diferenciarse a lo largo de su propia vía y convergen en la de los conos.

2. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

El retinoblastoma es el tumor intraocular primario mas frecuente en la infancia, y supone entre el 1 y el 3% de los tumores pediátricos. Esta es la principal dificultad para su estudio, su baja frecuencia.

El servicio de oftalmología infantil del Hospital La Paz de Madrid es el principal centro de referencia nacional para el tratamiento del retinoblastoma. Se emplean prácticamente todas las técnicas terapéuticas disponibles para el retinoblastoma, por eso en algunos casos es considerado como una referencia internacional. Esta es la razón por la que podemos presentar el análisis de una importante serie de casos de una entidad con una baja frecuencia, y obtener algunas conclusiones extrapolables a la población de pacientes con retinoblastoma.

Las técnicas para el estudio genético y el conocimiento del funcionamiento de la biología molecular han sufrido un crecimiento y desarrollo meteórico en los últimos años. Son herramientas diagnosticas sencillas, accesibles y mínimamente invasivas, que nos pueden aportar una información muy valiosa y que beneficie a nuestros pacientes.

Hace quince años el estudio genético se limitaba al análisis del cariotipo, que revelaba alteraciones cromosómicas en muy pocos casos, proporcionando una información muy parca, y con poca utilidad practica.

Sin embargo, con el desarrollo de la ingeniería genética, muy impulsada con la aparición de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por

Kary Mullis,^[1] año en el que su propulsor recibió el premio novel, así como las técnicas de western blot, secuenciación, análisis de microsatélites, etc...y su accesibilidad, han propiciado que se haya avanzado tanto en el estudio genético de muchas enfermedades, sobretodo oncológicas, y dentro de estas, con un carácter especial, dadas sus características, del retinoblastoma.

El gen Rb ha sido el primer antioncogen o gen supresor tumoral descrito. Bishop y Varmus descubren en la década de los ochenta el primer oncogén humano. Con sus hallazgos se pudo comprender la producción de tumores malignos a partir de cambios que se producen en genes normales de una célula, que no sólo son producidos por virus, sino que también pueden ser producidos por radiaciones, sustancias químicas, etc...

Bishop y Varmus fueron galardonados con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1989.

La clonación del gen Rb se llevo a cabo de forma independiente por T. P. Dryja y R. A. Weinberg , Y-K. Fung y W. F. Benedict, y W-H. Lee a lo largo de 1986 y 1987, confirmando inequívocamente la hipótesis de A. G. Knudson y revolucionando conceptualmente el campo del cáncer al hacerse patente la existencia de genes normales que inhiben o suprimen la proliferación de las células cancerosas y, por consiguiente, cuya inactivación puede originar un tumor.

En los primeros años en los que se empezó a utilizar el estudio genético, solo se incluía en él a los pacientes con antecedentes familiares conocidos, posteriormente se incluyó a todos los casos con afectación bilateral, y hoy en día, a la vista de los datos obtenidos, proponemos el análisis a la totalidad de los pacientes que sean diagnosticados, así como a sus familiares en los casos en que se evidencie alteraciones en la línea germinal.

La hipótesis fundamental de este trabajo es la propuesta de que el análisis genético en los pacientes con retinoblastoma no es solo una herramienta accesible y sencilla con valor diagnóstico, sino también con capacidad pronóstica.

Las cuestiones que intentamos responder en el estudio que nos ocupa son las siguientes;

1. Realizar un estudio descriptivo de la población de retinoblastomas tratados en nuestro centro.
2. Realizar un análisis bivariante de la población analizando el valor pronóstico en el momento del diagnóstico de la morfología tumoral, los antecedentes familiares y los tratamientos recibidos, así como la edad al diagnóstico, valorado tanto según la supervivencia del globo ocular como de su funcionalidad.
3. Realizar un estudio descriptivo de la serie de pacientes en los que se ha realizado el análisis genético y su homogeneidad con la población de retinoblastomas.
4. Determinar en cuantos casos el análisis genético es capaz de identificar mutaciones en la línea germinal en pacientes sin antecedentes familiares conocidos y la importancia del análisis genético para un consejo genético adecuado.
5. Determinar el valor pronóstico del análisis genético y si este es capaz de identificar a los pacientes que presentan mayores tasas de resistencia al tratamiento con quimioterapia.
6. Determinar el valor pronóstico del análisis genético a la hora de identificar los pacientes con riesgo de presentar un retinoblastoma trilateral.

3. MATERIAL Y METODOS

Estudiamos una serie de pacientes con retinoblastoma, con un total de 206 pacientes y 282 ojos, que han sido diagnosticados en el Hospital Universitario La Paz de Madrid desde enero de 1983 hasta diciembre de 2007 en el servicio de Oftalmología Pediátrica.

Los pacientes han recibido un tratamiento multidisciplinar, para el que se ha precisado la colaboración de los departamentos de Oncología Pediátrica del Hospital La Paz, Radiología Pediátrica del Hospital La Paz y Clínica Nuestra Señora del Rosario, Oncología Radioterápica del Hospital Puerta de Hierro, del Hospital La Paz y de la Clínica Ruber Internacional, servicio de Radiofísica del Hospital La Paz, cirugía Maxilofacial del Hospital La Paz y Oncolab, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM. En algunos casos se ha precisado de colaboración nacional del instituto de Microcirugía Ocular (IMO) e internacional, de Potter (Bruselas), Paul Finger (NYC) y Shields (Philadelphia).

Algunos casos han sido remitidos desde otros países para recibir un tratamiento específico, hasta encontrarse en remisión tumoral, en estos casos, como el seguimiento llevado a cabo en nuestro centro se ha visto interrumpido, han sido excluidos en esta revisión.

3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Para el estudio descriptivo y analítico de la población de retinoblastomas tomamos el conjunto de los pacientes con diagnóstico retinoblastoma que han sido seguidos en el Hospital Universitario La Paz desde enero de 1983 hasta diciembre de 2007. No han sido incluidos los pacientes diagnosticados durante el año 2007, dado que

la mayoría no están en una situación de estabilidad, necesaria para su estudio. La población en estudio consta de un total de 206 pacientes.

Posteriormente trabajamos con la serie de pacientes con estudio genético, excluyendo al resto de pacientes. Dado el tamaño muestral, las conclusiones obtenidas son representativas del total de la población. Como se ha señalado anteriormente, hoy en día proponemos el estudio genético en la totalidad de los pacientes diagnosticados de retinoblastoma. Sin embargo, no a todos nuestros pacientes se les ha practicado, y esto se debe a que algunos han sido diagnosticados hace muchos años, cuando aun no era una práctica protocolizada. En estos casos el análisis se está practicando con posterioridad, aun cuando ya estén siendo tratados o incluso lleven años en regresión. La serie con análisis genético es de 115 pacientes.

3.2. RECOGIDA DE DATOS

Se han revisado las historias clínicas del Servicio de Oftalmología Infantil del Hospital La Paz de los pacientes diagnosticados de retinoblastoma que han sido revisados entre los años 1983 y 2007, así como los informes de los estudios realizados de los servicios de radiología, anatomía patológica, oncología y radioterapia de nuestro centro o de los que hubieran sido remitidos los pacientes para recibir el procedimiento indicado, así como los informes remitidos desde el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de la Universidad Autónoma de Madrid.

1. Datos epidemiológicos

- 1.1. Sexo.
- 1.2. Fecha de nacimiento.
- 1.3. Fecha de diagnóstico de la enfermedad.
- 1.4. Lugar de nacimiento (Provincia, País).
- 1.5. Antecedentes familiares conocidos.
 - 1.5.1. Identificados.
 - 1.5.2. Grado de parentesco.

2. Datos clínicos

- 2.1. Motivo de consulta.

- 2.1.1. Leucocoria.
- 2.1.2. Estrabismo.
- 2.1.3. Ambos.
- 2.1.4. Disminución agudeza visual.
- 2.1.5. Uveítis.
- 2.1.6. Celulitas.
- 2.1.7. Buftalmos.
- 2.1.8. Hallazgo casual.
- 2.2. Lateralidad en el diagnóstico.
 - 2.2.1. Unilateral.
 - 2.2.2. Bilateral.
- 2.3. Fecha de bilateralización.
 - 2.3.1. Bilateral al diagnóstico.
 - 2.3.2. Bilateralización tardía.
- 2.4. Ojo afecto: derecho, izquierdo.
- 2.5. Morfología tumoral.
 - 2.5.1. Endofítico.
 - 2.5.2. Exofítico.
 - 2.5.3. Infiltrante.
 - 2.5.4. Otros (infiltra cámara anterior, masivo...)
- 2.6. Localización intraocular.
 - 2.6.1. Macular-foveal.
 - 2.6.2. Macular-extrafoveal.
 - 2.6.3. Extramacular.
 - 2.6.4. Masivo.
- 2.7. Estadio Reese-Elsworth.
 - 2.7.1. Clásica.
 - 2.7.2. Modificada (excluyendo siembras vítreas).
- 2.8. Presencia siembras vítreas.
 - 2.8.1. En el diagnóstico.
 - 2.8.2. Posterior al diagnóstico.
- 2.9. Presencia siembras subretinianas.
- 2.10. Desprendimiento de retina.
 - 2.10.1. En el diagnóstico.

- 2.10.2. Posterior al diagnóstico.
- 2.11. Lesiones en la línea media.
 - 2.11.1. Pinealoblastoma/ quiste pineal.
 - 2.11.2. Adenoma hipofisario.
- 2.12. Segundas neoplasias malignas.
- 2.13. Metástasis.
- 2.14. Otras alteraciones sistema nervioso central.
 - 2.14.1. Síndrome Arnold-Chiari.
 - 2.14.2. Quistes coroideos.

3. Tratamientos recibidos.

- 3.1. Quimioterapia.
 - 3.1.1. Sistémica primaria.
 - Fecha administración.
 - Pauta administrada.
 - 3.1.2. Sistémica segunda línea.
 - Fecha.
 - Pauta administración.
 - 3.1.3. Sistémica pre/post enucleación.
 - Fecha.
 - Pauta administración.
 - 3.1.4. Inyección subtenoniana.
 - Fecha.
 - Pauta administración.
 - 3.1.5. Inyección intravítrea.
 - Fecha.
 - Pauta administración.
 - 3.1.6. Tratamiento intratecal.
 - Fecha.
 - Pauta administración.
- 3.2. Radioterapia externa.
 - 3.2.1. Fecha administración.
 - 3.2.2. Dosis administrada.

3.2.3. Efectos secundarios.

- Catarata
- Retinopatía
- Neuropatía
- Xeroftalmia
- Queratopatía
- Hipoplasia hemifacial

3.3. Braquiterapia

3.3.1. Fecha administración.

3.3.2. Dosis administrada.

3.3.3. Efectos secundarios.

3.4. Fotocoagulación.

3.5. Crioterapia.

3.6. Termoterapia transpupilar.

3.7. Cirugía.

3.7.1. Enucleación.

- Fecha cirugía.
- Estudio anatomopatológico.

3.7.2. Evisceración.

- Fecha cirugía.
- Estudio anatomopatológico.

4. Resultados clínicos

4.1. Patrón de regresión.

4.2. Agudeza visual.

4.2.1. Enucleación.

4.2.2. Amaurosis.

4.2.3. <0,1. Ambliopía severa.

4.2.4. 0,1-0,5. Ambliopía moderada.

4.2.5. 0,5-1. Adecuada.

4.3. Fecha de la última revisión.

5. Datos genéticos

5.1. Análisis en sangre periférica.

5.1.1. Mutación cDNA (mutación en la secuencia codificante).

5.1.2. Exón/intrón del gen RB1 afectado por la mutación.

5.1.3. Mutación gDNA (mutación a nivel genómico).

5.1.4. Tipo de mutación (frameshift, nonsense, missense, splicing, delección).

5.1.5. Efecto de la mutación sobre la proteína Rb.

5.2. Análisis intratumoral.

5.2.1. Mutación cDNA (mutación en la secuencia codificante).

5.2.2. Exón/intrón del gen RB1 afectado por la mutación.

5.2.3. Mutación gDNA (mutación a nivel genómico).

5.2.4. Tipo de mutación (frameshift, nonsense, missense, splicing, delección).

5.2.5. Efecto de la mutación sobre la proteína Rb.

3.3. CRITERIOS DE EVALUACIÓN

3.3.1. Inicio del Análisis y Seguimiento

Este trabajo es un estudio retrospectivo en el que se analizan todos los pacientes con retinoblastoma que han sido tratados y seguidos en el servicio de Oftalmología Infantil del Hospital La Paz.

El primero de estos pacientes fue diagnosticado en 1983 y ha seguido revisiones periódicas hasta diciembre de 2007, fecha en la que termina la revisión de los casos. Como se ha señalado, tampoco han sido incluidos los pacientes diagnosticados en el año 2007. La valoración se realiza a través de los datos recogidos en la historia clínica, y el

periodo de seguimiento se refiere hasta la fecha de la última revisión, independientemente de que se conserve o no el globo ocular.

3.3.2. Extensión de la Enfermedad

Los pacientes se han clasificado tomando como referencia los datos reflejados en la historia clínica, dado lo dilatado del periodo que se considera de inclusión, se ha tomado como modelo la Clasificación de Reese-Ellsworth, que permite homogeneizar a todos los casos, aunque actualmente no goce de la vigencia que tenía con anterioridad.

En un intento de actualizar la clasificación se ha tomado por separado los datos referidos a la presencia o ausencia tanto de siembras vítreas como subretinianas.

Se ha registrado también la afectación extraocular tumoral; los casos con afectación orbitaria, metastásica, o que hayan desarrollado segundos tumores primarios, en el área sometida a radiación externa o no, así como la asociación con lesiones cerebrales de la línea media, considerando los quistes pineales como una variante benigna del pinealoblastoma.

3.3.3. Enucleación

Es considerada como una variable desenlace. Se somete a enucleación a los pacientes que a priori no son candidatos a conservar el globo ocular (mirar indicaciones) así como a los que no responden a los tratamientos aplicados. En algunos casos se consigue la inactividad tumoral pero como consecuencia de los tratamientos precisados el ojo entra en ptosis, esos casos también son susceptibles de enucleación.

Se ha codificado tanto la fecha de la enucleación, así como si fue precedida o seguida de quimioterapia adyuvante (según las características de la lesión) y los datos resultado del análisis anatomopatológico.

3.3.4. Agudeza Visual

También es una variable de desenlace. Es muy difícil su valoración. Para homogeneizar los datos y hacer posible un análisis útil, independientemente del sistema utilizado para su obtención, los resultados se han categorizado en 4 grupos:

- amaurosis
- <0.1. ambliopia severa: percepción de luz, bultos, contar dedos...
- 0.1-0.5. Ambliopia moderada: permite cierta independencia, pero con dificultad para los trabajos delicados.
- 0.5-1. Capacidad funcional aceptable para un desarrollo normal.

Se ha tomado como valido el valor de la agudeza visual de los pacientes colaboradores tratados y en regresión, tomando como referencia el valor en la ultima revisión realizada.

3.3.5. Estudio Genético

El estudio genético se ha llevado a cabo gracias a la colaboración con el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” y a su accesibilidad e interés. La colaboración para el estudio de los retinoblastomas comenzó en 1999. En todos los casos se han tomado muestras de sangre periférica de los pacientes, así como de sus familiares directos cuando se ha encontrado mutación en la línea germinal, y en los familiares menos próximos cuando se ha precisado y ha sido posible. Así han podido describirse en algunos casos patrones familiares de herencia completos.

Más recientemente se ha incorporado como práctica habitual el análisis genético del material tumoral en los casos enucleados de pacientes con enfermedad unilateral. Para determinar las alteraciones y proceder después al estudio en sangre periférica, que sería fundamental, por ejemplo, en los pacientes del grupo de los “mosaico”.

Diagnostico Molecular. Técnicas.

Para hacer el análisis genético de las muestras tomadas, en primer lugar se realiza PCR para amplificar la región del cromosoma 13 que codifica el gen RB. El análisis posterior se realiza utilizando diversas técnicas (secuenciación, southern blot y análisis de fragmentos). El análisis de la proteína Rb se realiza con la técnica de western blot.

PCR. Es la técnica que se emplea para amplificar un fragmento de DNA. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para

separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas. Hoy, todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. Es utilizada para muchos procesos en el campo de la medicina y la biología, por ejemplo, en el diagnóstico de enfermedades hereditarias presentes en el genoma. La identificación de mutaciones es un proceso largo y complicado que puede acortarse significativamente gracias a la PCR.

En el caso del retinoblastoma, se amplifican mediante PCR los 27 exones del gen del retinoblastoma mediante el empleo de unos primers específicos. Una vez obtenidos estos productos de amplificación se someten a secuenciación directa para la identificación de mutaciones puntuales.

Secuenciación. Esta técnica nos permite localizar mutaciones en la secuencia de ADN. Se emplea así la secuenciación de ADN como un método de diagnóstico: una vez que se ha caracterizado la relación con una enfermedad de una determinada mutación puntual o de una pequeña delección. La secuenciación automática puede emplearse como método de screening en la localización de nuevas mutaciones.

En el caso concreto del retinoblastoma cada producto de PCR se somete a secuenciación mediante un secuenciador automático (ABI 3100) utilizando la técnica dideoxi que utiliza nucleótidos terminadores marcados con un compuesto fluorescente. Los productos de la reacción se detectan directamente durante la electroforesis al pasar por delante de un láser que al excitar los fluoróforos permite detectar la fluorescencia emitida. Una vez obtenida la secuencia está se compara manualmente a la secuencia del retinoblastoma descrita. Si una mutación es identificada, está se confirma mediante la realización de una nueva reacción de PCR y de secuenciación.

Análisis de Fragmentos. (Genotipado de ADN) Son técnicas que engloban a los marcadores moleculares para la identificación. En nuestro caso se ha utilizado la técnica de microsatélites. Esta técnica ha sido utilizada para detectar el patrón de segregación alélica en los casos familiares y la identificación de delecciones intragénicas. Esta técnica también ha sido utilizada para identificar pérdidas de heterocigosis en tumores.⁶⁵⁰

Se denomina microsatélite o SSR (Simple Séquense Repeats) a unas secuencias de ADN en las que una secuencia cuyo tamaño va desde un par de bases hasta cuatro pares de bases se repite de manera consecutiva. La variación en el número de repeticiones crea diferentes alelos los cuales se distinguen entre sí por la longitud total del fragmento. Un microsatélite está típicamente conformado por un motivo repetitivo, en el cual se encuentra contenida la secuencia repetida, y dos regiones flanqueantes, las cuales se encuentran a ambos lados del motivo repetitivo. Para que un microsatélite sea considerado útil como marcador molecular, toda la variación de la secuencia o polimorfismo debe hallarse dentro del motivo repetitivo, y por el contrario, las regiones flanqueantes deben estar altamente conservadas al punto de no presentar ninguna variación en la secuencia.

Partiendo de estos datos, se diseñan primers o cebadores (uno de ellos marcado con un fluoróforo), para poder amplificar un microsatélite a través de una PCR.

En nuestro caso se han utilizado seis microsatélites extragénicos (tres teloméricos y tres centroméricos) y tres intragénicos. Una vez producidos los correspondientes productos de PCR de cada microsatélite, estos son separados en un secuenciador automático con el objeto de determinar el tamaño de cada alelo. Cada alelo se hereda de manera codominante. Un individuo puede presentar un único tamaño de fragmentos, cuando ambos progenitores le han transmitido dos alelos de la misma secuencia y tamaño (homocigosis) o dos tamaños diferentes, cuando cada progenitor ha transmitido un alelo de tamaño diferente (heterocigosis). Cuando un paciente necesariamente debe ser heterocigótico para un microsatélite (dos tamaños diferentes) en virtud del genotipo de sus padres, pero presenta un único tamaño, entonces uno de los alelos de RB ha sido deleciónado (hemizigosis)

Southern blot. La técnica de hibridación o southern blot denominada así en honor a quien la desarrolló en 1975, se emplea para identificar fragmentos específicos de ADN en una mezcla compleja. Inicialmente se digiere el ADN que queremos estudiar con una o más enzimas de restricción, las cuales cortan en puntos específicos de la secuencia, generando fragmentos de varios tamaños. Los fragmentos son separados por tamaños mediante una electroforesis en un gel. A continuación los fragmentos de ADN de doble cadena son desnaturalizados mediante un proceso químico separando las dos hebras componentes de ADN en sus cadenas sencillas.

Seguidamente, estos fragmentos se separan por su tamaño en un gel de agarosa empleando corriente eléctrica y luego se transfieren a una membrana de nylon. Para la detección del fragmento de interés en la membrana, utilizamos otro fragmento de ADN o ARN que se llama sonda (cadena con secuencia de nucleótidos conocida) y que contiene la secuencia complementaria al fragmento que queremos identificar. La sonda, se marca con un isótopo radiactivo, se agrega a una solución y se incuba con la membrana por varias horas. Esta hibridación, hace que la sonda se adhiera al fragmento de ADN en la membrana, el cual contiene las bases complementarias. Al exponer la membrana a una película de fotografía, podemos identificar el fragmento y establecer así si está o no está contenido en el ADN que estamos estudiando. Esta técnica ha sido fundamental en el estudio del ADN. Existen dos tipos de hibridaciones de ácidos nucleicos que se usan frecuentemente en los laboratorios que utilizan técnicas de biología molecular.

Diagnóstico genético. Elementos analizados

Todos los elementos que son analizados, son los mismos, tanto cuando el origen de la muestra es la sangre periférica como cuando lo es el tejido tumoral.

DNA genómico o DNA cromosómico es el obtenido desde la muestra, ya sea de sangre periférica o tumoral, y es sobre el que se trabaja para identificar directamente la mutación afecta. Se amplifica utilizando la técnica de PCR.

DNAc (DNA complementario). Es un ADN de cadena sencilla. Se sintetiza a partir de una hebra simple de ARNm maduro, que en el caso de las células eucariotas presenta intrones, secuencias no codificantes que deben ser extraídas (con procesos de corte y empalme, splicing) del ARNm antes de ser traducido a proteínas. Este ADN despojado de intrones es el ADN complementario, o ADNc. Aunque existen varios métodos de síntesis, el ADNc es sintetizado casi siempre de ARNm maduro (sin secuencias intrónicas) utilizando la enzima retrotranscriptasa. Esta enzima trabaja sobre un *molde* de cadena simple de ARN, creando el ADN complementario basado en la correspondencia de bases ARN (A,U, G, C) con las bases ADN complementarias (T, A, C, G). La retrotranscriptasa va recorriendo la cadena de ARNm y sintetizando la cadena

de ADN complementaria del molde de ARNm (ADNc). El ADNc se utiliza a menudo en clonación de genes.

Tipo de mutaciones identificadas

Nonsense. Se trata de una mutación puntual en la secuencia de DNA que codifica un codón de stop en el mRNA, y por tanto a una proteína truncada no funcional.

Frameshift (corrimiento del marco de lectura). Son mutaciones debidas a la inserción o delección de uno o varios nucleótidos. Como en la mayoría de estas ocasiones estas alteraciones no son múltiplos de tres se produce, por la estructura triploide de los codones, un cambio en el marco de lectura. Estos cambios en el marco de lectura dan lugar a la aparición de codones stop prematuros y por tanto a proteínas truncadas no funcionales.

Missense. Es una mutación puntual que altera un nucleótido que conlleva a la síntesis de un codón que codifica para un aminoácido (aa) distinto, lo que puede dar lugar a una proteína con la funcionalidad alterada, o ser un cambio silente, sin alteraciones en la función de la proteína.

Splicing. Estas mutaciones afectan al normal procesamiento del pre-mRNA. Las mutaciones de splicing afectan a secuencias conservadas en las zonas de frontera entre los exones y los intrones, provocando que el exón afectado sea incorrectamente eliminado durante el procesamiento del pre-mRNA. . De esa manera se crean versiones diferentes del ARN mensajero que dan lugar a proteínas truncadas o aberrantes.

Delección. Es la pérdida de parte de la secuencia de DNA, que puede afectar desde un solo nucleótido hasta una parte importante de un gen o de un cromosoma. Si la delección afecta a una parte importante del gen suele tener lugar durante la meiosis. En la mayoría de estos casos no se produce proteína.

Pérdida de heterocigosidad (LOH, *loss of heterocigosity*). Es un concepto empleado en ontogénesis, muy utilizado para referirse al retinoblastoma. Se dice que una persona es heterocigota para el gen RB cuando ha heredado una copia mutada de uno de los progenitores, por lo que es heterocigota para ése alelo, lo que no quiere decir que presente enfermedad, cuando se produce el “second hit”, se altera el otro alelo del mismo gen, se pierde la heterocigosidad y aparece la enfermedad. Lo normal es que en el análisis aparezca como heterocigoto en las células germinales y homocigoto en las tumorales; este tipo de alteración se identifica mediante dos procedimientos de análisis de marcadores polimórficos, como son los microsatélites o el análisis de polimorfismo de nucleótido sencillo.

3.4. CARACTERISTICAS DE LA SERIE

En el estudio descriptivo se toma como muestra el total de los pacientes de la serie, lo que constituye un total de 206 pacientes y 282 ojos. Tomando todos los pacientes, no solo los que tienen estudio genético, se pretende hacer un estudio más exhaustivo y dar mayor rigor a los datos presentados.

El subgrupo constituido por los pacientes a los que se les ha realizado estudio genético (115 pacientes y 175 ojos) no presenta diferencias estadísticamente significativas con la totalidad de la serie, en cuanto al estudio descriptivo.

Las características de la serie se detallan en el análisis descriptivo en el primer apartado del bloque de resultados.

3.5. METODO ESTADÍSTICO

El análisis estadístico ha sido realizado utilizando como herramienta el programa informático SPSS para Windows en su versión 15.0.

En las variables cuantitativas se refieren en el estudio descriptivo los valores correspondientes a la media, mediana y desviación típica así como el intervalo de confianza al 95%. Igualmente se describe la distribución por cuartiles representada gráficamente por los diagramas de cajas y el rango intercuartílico, cuando estos valores

se consideran informativos. De forma análoga, en los casos relevantes se describe la distribución que sigue una determinada variable (normal, uniforme exponencial) así como la significación asociada a dicha distribución mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnoff. En las variables cualitativas se refiere la frecuencia y el porcentaje equivalente de cada uno de los datos. Con el fin de evitar la dispersión de los datos, aumentar la potencia estadística y facilitar la interpretación de los resultados, determinadas variables cuantitativas son categorizadas para su posterior análisis, como sucede, p.e., en el caso de la variable “meses desde el diagnóstico a la enucleación”.

En lo referente al análisis bivalente empleamos para la comparación de proporciones las pruebas de Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher cuando el valor observado para alguno de los subgrupos fue inferior a cinco. A partir de las tablas de 2x2 se calcularon las *odds ratio* (razones de ventaja) de Mantel-Haenszel como medida de riesgo. Finalmente, en el estudio de los índices de validez interna del análisis genético respecto a la enucleación se calcularon los valores de sensibilidad y especificidad también a partir de tablas de 2x2.

Para el estudio de comparación de medias utilizamos la prueba de T de Student para el análisis de dos muestras independientes y la prueba del análisis de la varianza cuando se compararon tres o más grupos. En caso de identificar diferencias significativas en el estudio del análisis de la varianza, éstas se depuraron en el análisis post-hoc (pruebas de Scheffé, Bonferroni) y no mediante comparaciones pareadas múltiples. Cuando no fue posible aplicar pruebas paramétricas por no poder asumirse una distribución normal y contar con un pequeño tamaño muestral, las variables cuantitativas continuas se analizaron con el test de la U de Mann-Whitney, que compara las medias de dos grupos independientes, y el test de Kruskal-Wallis, que analiza las medianas de varios grupos independientes. Estos métodos tienen menor potencia y sensibilidad que las pruebas paramétricas y no permiten construir intervalos de confianza.

Para el análisis de supervivencia empleamos en primer lugar el método de Kaplan-Meier 430. Evitamos el uso de comparaciones directas de proporciones de pacientes supervivientes a un determinado tiempo (como por ejemplo la tasa de supervivencia a los 5 años) ya incluiría información de pacientes censurados en el

análisis. Para la comparación de la distribución global de las curvas de supervivencia se utilizaron como pruebas de contraste la prueba del log-rango y el test de Breslow.

El nivel de significación estadística se situó a priori en todas la pruebas en un valor de probabilidad (p) menor a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA SERIE.

1. Sexo.

En la distribución por sexos se identifica 97(47,1%) varones y 109(52,9%) mujeres, lo que significa que no hay predilección por sexo, al igual que en el resto de las series. (Chi-cuadrado $p > 0.05$).

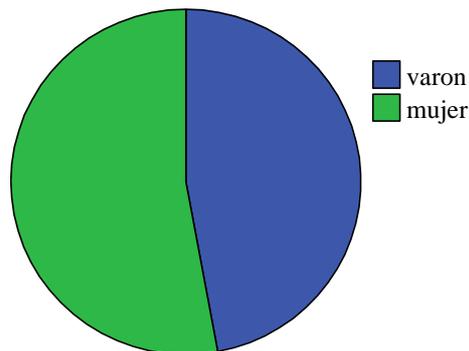


Gráfico 1. Distribución por sexo.

2. Edad al diagnóstico.

La clasificación de los pacientes según su edad en el momento del diagnóstico no sigue una distribución normal (Gráfica 2), sino exponencial, lo que ha sido analizado utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

El valor de Z de Kolmogorov-Smirnov es de 1,081, con un grado de significación asintótica (bilateral) de $p = 0,193$.

La mediana de edad en el momento del diagnóstico en nuestra población es de 13 meses, y la media de 18,49 meses (desv típica (DT) 17,312). [Intervalo de Confianza (IC) 95%; 0-89 meses]. (Gráfico 2)

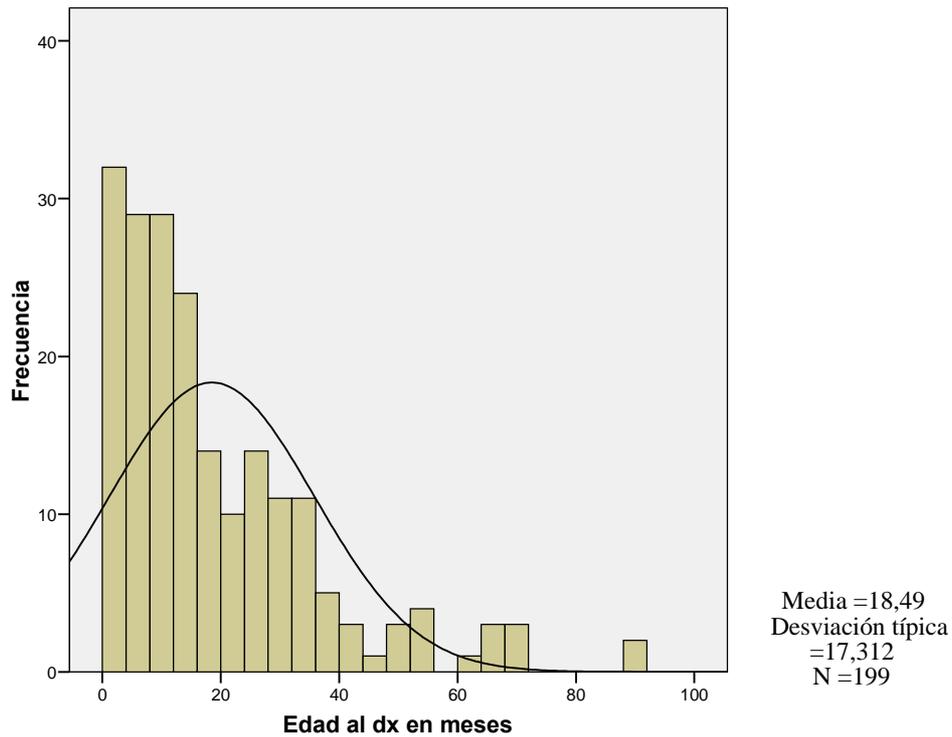


Gráfico 2. Edad al diagnóstico.

3. Antecedentes Familiares.

La valoración de la existencia de antecedentes familiares se realiza mediante una encuesta en la consulta ordinaria. De los 206 pacientes incluidos en nuestro trabajo 15 (7,3%) presentaban antecedentes familiares conocidos, el resto 191(92%) no (Gráfico 3); la relación de parentesco con el paciente se describe a continuación. (Tabla 11)

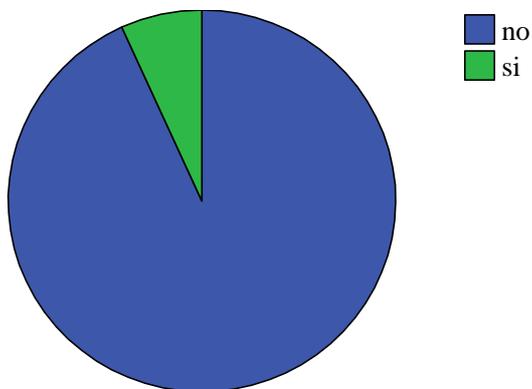


Tabla 11.

PARENTESCO	Nºcasos
Padre	5
Madre	6
Hermano y primo	4
Hermano	1
Otros	3

Gráfico 3. Antecedentes familiares conocidos.

4. Síndrome Dismórfico.

Se ha identificado 3 casos (1,45%) de retinoblastoma asociado a síndrome del cromosoma 13. Se trata de un síndrome dismórfico con un fenotipo característico, uno de los pacientes fue clasificado como Sd. Sotos,⁵⁰⁰ compartiendo características fenotípicas con el síndrome q13.

5. Tumor Pineal.

En nuestra serie no se ha identificado ningún caso de retinoblastoma trilateral, con desarrollo de PNET en la línea media. Sin embargo, es llamativa la identificación en el estudio por resonancia magnética, con cierta frecuencia, de quistes localizados en la región pineal.

Se han identificado también 3 casos asociados a síndrome de Arnold-Chiari, 2 a microadenoma de hipófisis, 1 a angioma cerebral y 2 a la presencia de quistes aracnoideos.

La distribución de los pacientes con quistes pineales según la lateralidad del retinoblastoma se describe en la siguiente tabla:

Tabla 12.

		Tumor pineal
LATERALIDAD	UL	8
	BL	9
Total		17

6. Segundas Neoplasias Malignas

Al contrario que en otras series publicadas, sólo uno de nuestros casos ha presentado otra neoplasia maligna primaria, se trataba de una leucemia, que respondió al tratamiento de forma satisfactoria, en un paciente con predisposición genética a padecer cáncer, esto es, con mutación del gen Rb presente en la línea germinal.

7. Mortalidad.

Sólo un caso de nuestra serie resultó ser éxitus, el paciente falleció con metástasis cerebrales; se trataba de un caso cuyo diagnóstico fue muy tardío, en un estadio muy avanzado, presentaba las metástasis cuando se identificó el retinoblastoma y extensión directa intracraneal a través del nervio óptico. Se trataba de un paciente con afectación bilateral, antecedentes familiares de la enfermedad y mutación identificada en la línea germinal.

8. Exanteración.

En 3 casos se ha precisado exanteración. Por sospecha de afectación orbitaria, que solo ha sido confirmada por el estudio histopatológico en uno de los tres casos. Dos de los casos se trataba pacientes con enfermedad bilateral y uno unilateral.

9. Lugar de Origen.

El Servicio de oftalmología pediátrica del Hospital La Paz es un Centro de referencia nacional para el tratamiento y seguimiento de pacientes afectados de retinoblastoma desde hace 20 años, por eso el lugar de origen de los casos de esta serie es muy variado. La distribución geográfica de los casos se describe a continuación (Tabla 13). Los pacientes que aparecen con un doble origen son pacientes nacidos en otro país y que se han trasladado de manera definitiva a España. Sólo el 26,2% de los pacientes documentados en esta serie son residentes en la comunidad de Madrid.

Tabla 13.

	Frecuencia	Porcentaje
ALAVA	3	1,5
ALBACETE	2	1,0
ALICANTE	3	1,5
ALMERIA	3	1,5
ASTURIAS	6	2,9
AVILA	1	,5
BADAJOS	4	1,9
BALEARES	1	,5
BARCELONA	5	2,4

BURGOS	2	1,0
C REAL	4	1,9
CACERES	4	1,9
CADIZ	9	4,4
CANTABRIA	3	1,5
CASTELLON	1	,5
COLOMBIA/CANTABRIA	1	,5
CORDOBA	3	1,5
CUENCA	2	1,0
CHINA/CADIZ	1	,5
ECUADOR/ALMERIA	1	,5
GERONA	1	,5
GRAN CANARIA	8	3,9
GRANADA	4	1,9
GUIPUZCOA	4	1,9
HUELVA	2	1,0
JAEN	7	3,4
LA CORUÑA	3	1,5
LA RIOJA	2	1,0
LEON	2	1,0
LUGO	1	,5
MADRID	52	25,2
MELILLA	1	,5
MURCIA	5	2,4
NAVARRA	2	1,0
ORENSE	2	1,0
OVIEDO	1	,5
PALENCIA	2	1,0
PERU/MADRID	2	1,0
PONTEVEDRA	4	1,9
SALAMANCA	2	1,0
SEGOVIA	2	1,0
SEVILLA	12	5,8
TENERIFE	2	1,0
TERUEL	1	,5
TOLEDO	6	2,9
VALENCIA	1	,5
VALLADOLID	3	1,5
VIZCAYA	7	3,4
ZAMORA	1	,5
ZARAGOZA	4	1,9
Total	206	100,0

10. Lateralidad.

De los 206 pacientes estudiados, 130 (63,1%) presentaban una enfermedad unilateral, mientras que 76 casos (36,9%) tenían afectación bilateral. (Gráfico 4)

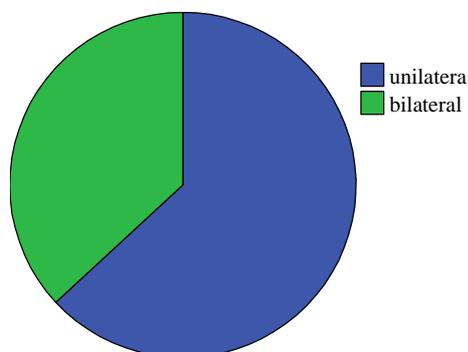


Gráfico 4. Lateralidad al diagnóstico.

Dentro de los casos con afectación unilateral, 69 casos (53,1%) presentan la lesión en el ojo derecho, y 61 (46,9%) casos el ojo izquierdo. (Gráfico 5). No hay predilección por uno de los ojos.

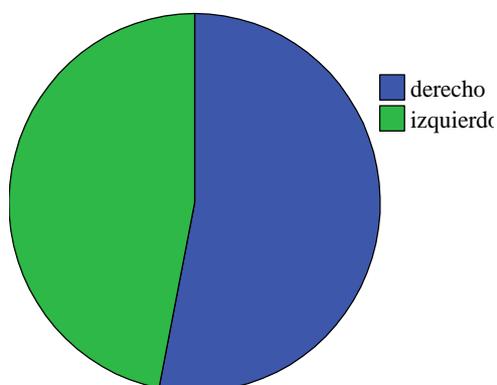


Gráfico 5. Ojo afecto

De los casos con afectación bilateral, 54 (71,1%) eran bilaterales en el momento de diagnóstico y 20 (26,3%) se bilateralizaron posteriormente, una vez iniciado el tratamiento en el ojo debutante.

En el Gráfico 6 se representa los pacientes con enfermedad bilateral distinguiendo los bilaterales en el momento del diagnóstico de los que se bilateralizan de forma tardía.

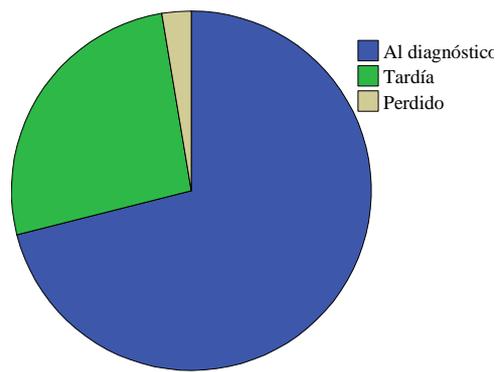


Gráfico 6. Bilateralización primaria o tardía.

En la Tabla 14 se señala los periodos que tardaron en bilateralizar. La mayoría de las bilateralizaciones tardías se produjeron en los doce meses siguientes, salvo en dos casos, en los que la bilateralización se produjo más de 3 años después de diagnosticarse la enfermedad en el ojo contralateral. (Gráfico 7)

Tabla 14. Retraso en el diagnóstico de la bilateralización.

Periodo (meses)		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	0	54	26,2
	1	7	3,4
	2	3	1,5
	3	2	1,0
	4	2	1,0
	5	1	,5
	6	2	1,0
	9	1	,5
	42	1	,5
	45	1	,5
	Total	74	35,9
Perdidos	Sistema	(UL) 132	64,1
Total		206	100,0

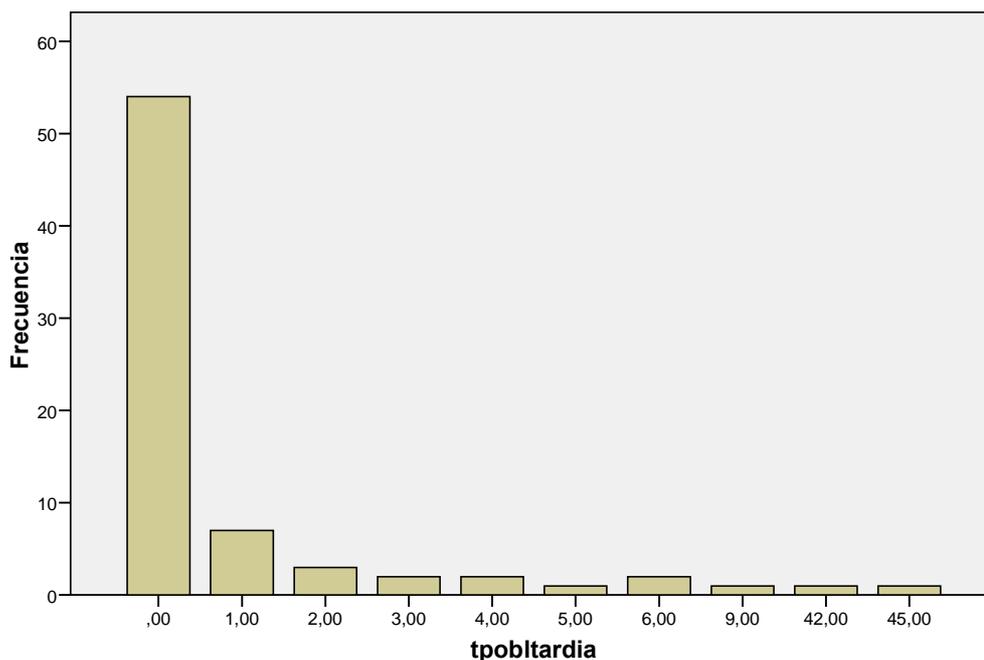


Gráfico 7. Distribución en el tiempo de la bilateralización.

11. Primer Signo al Diagnóstico.

La clínica en el momento del diagnóstico es muy diversa (Tabla 15), codificamos como ambos los casos que asocian estrabismo y leucocoria. Hay 7 casos perdidos, corresponden a pacientes remitidos desde otro centro que presentaban una historia clínica incompleta. El signo clínico identificado con mayor frecuencia (55,8%) de los casos es la leucocoria, seguido del estrabismo (22,3%).

Tabla 15. Motivo de diagnóstico.

		Frecuencia	Porcentaje
	LEUCOCORIA	115	55,8
	ESTRABISMO	46	22,3
	H CASUAL	16	7,8
	AMBOS	10	4,9
	BUFTALMOS	5	2,4
	CELULITIS	3	1,5
	MENOR AV	4	1,9
	Total	199	96,6
Perd	Sistema	7	3,4

Los pacientes que son diagnosticados como un hallazgo casual corresponden en 7 (43,8%) casos a pacientes con antecedentes familiares a los que se realiza un examen rutinario para un diagnóstico precoz, en caso de estar afectados.

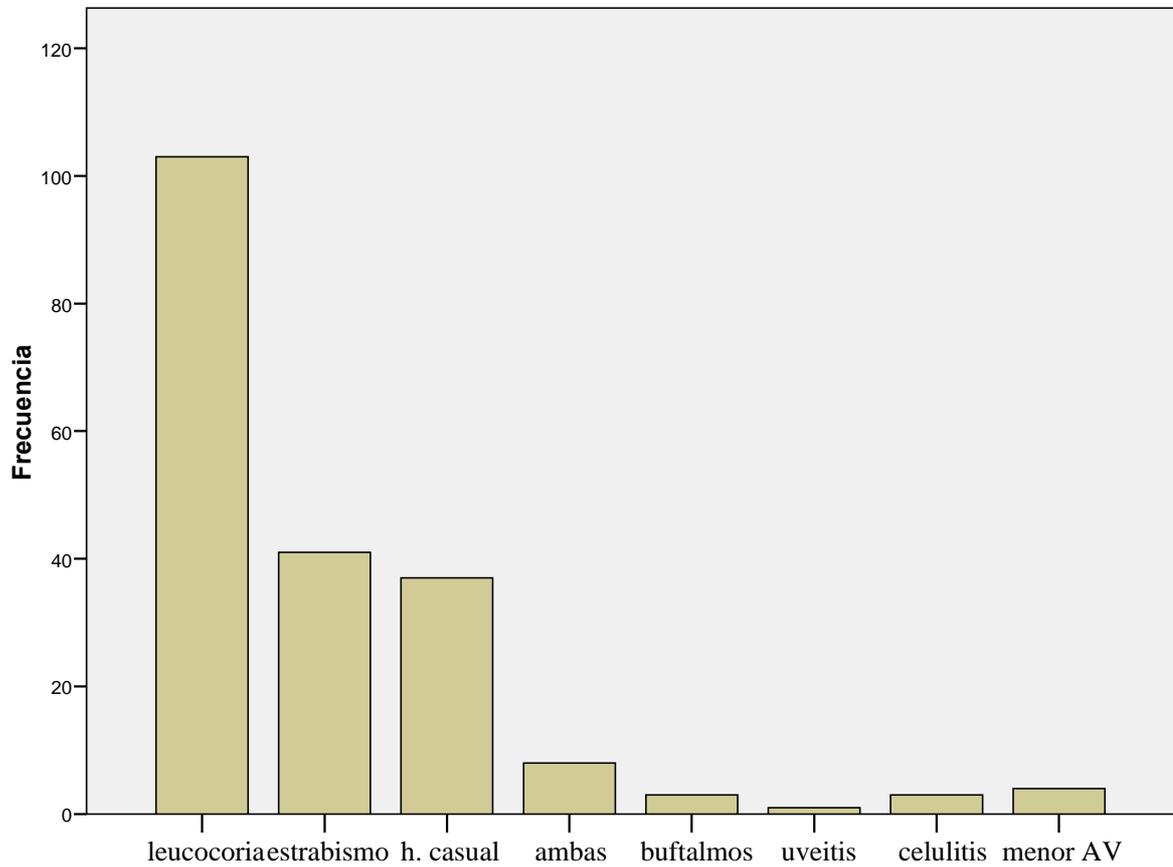


Gráfico 8. Primer signo clínico.

12. Clínica unilateral o bilateral en los casos bilaterales.

De los casos bilaterales sólo 21 (31,82%) se presentaron con clínica bilateral, el resto, es decir, 45 casos (68,18%) tenían clínica unilateral, de los que conocemos la forma de presentación. De los casos perdidos por el sistema, 5 fueron un hallazgo casual, y los otros 5 se desconoce la forma de presentación, dado que fueron remitidos desde otro centro.

Tabla 16. Lateralidad de la clínica.

LATERALIDAD		Frecuencia	Porcentaje
	UL	45	59,2
	BL	21	27,6
	Total	66	86,8
Perdidos	Sistema	10	13,2
Total		76	100,0

13. Estadio al diagnóstico. Clasificación de Reese-Elsworth.

El estadiaje de los casos se ha realizado según la clasificación clásica para el retinoblastoma, es decir, la clasificación de Reese-Elsworth. La razón por la que no se ha empleado una clasificación más reciente es por la dificultad en reclasificar pacientes que han sido diagnosticados hace tiempo, dado el amplio rango temporal en el que se han incluido los casos para este estudio. (Tabla 17)

Como método de corrección o normalización de la clasificación, los pacientes se han codificado por un lado siguiendo la clasificación clásica, y por otro prescindiendo de la identificación de siembras vítreas en el momento del diagnóstico. De este modo se clasifica el tumor en función de su tamaño, localización y la presencia de uno o varios focos, independientemente de la presencia de siembras vítreas. La distribución de los pacientes es la siguiente (Gráfico 9):

Tabla 17. Distribución de los pacientes según clasificación Reese-Elsworth modificada.

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
Válidos	1a	34	12,1	12,4
	1b	18	6,4	6,6
	2a	38	13,5	13,9
	2b	21	7,4	7,7
	3a	20	7,1	7,3
	3b	11	3,9	4,0
	4a	12	4,3	4,4
	4b	8	2,8	2,9
	5a	112	39,7	40,9
	Total	274	97,2	100,0
Perdidos	Sistema	8	2,8	

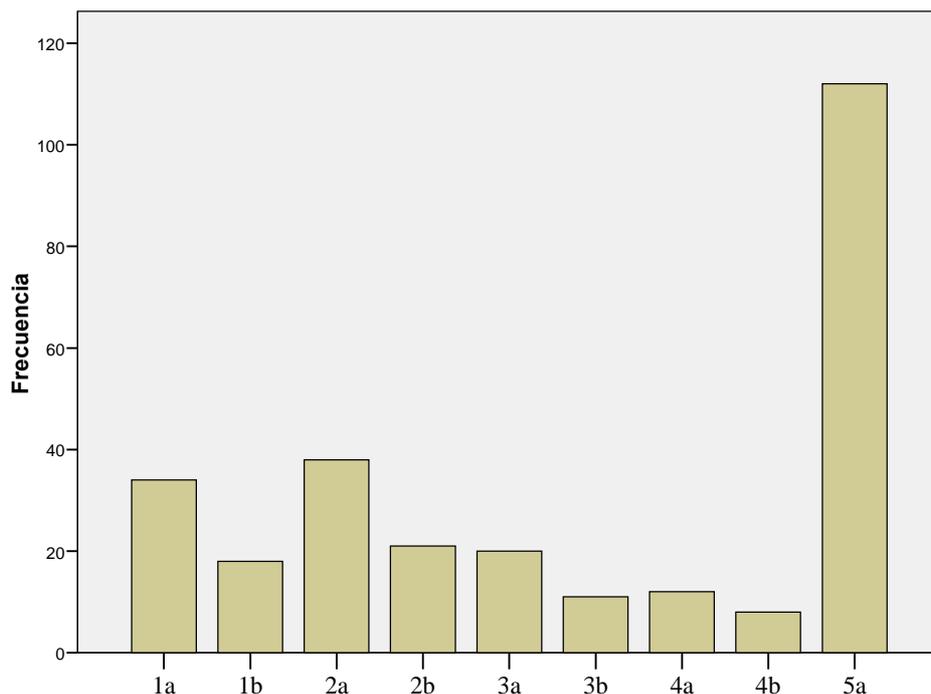


Gráfico 9. Estadío al diagnóstico según la clasificación R-E modificada.

Es llamativo el porcentaje de pacientes que se diagnostican en estadio 5a, esto es, con presencia de tumores masivos, ocupando más del 50% de la superficie retiniana.

Cuando incluimos la presencia de siembras vítreas en el momento del diagnóstico, es decir, contando con el estadio 5b de la clasificación de Reese-Elsworth, la distribución de los pacientes es la siguiente:

Tabla 18. Estadío según la Clasificación de R-E.

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	1a	30	10,6
	1b	17	6,0
	2a	29	10,3
	2b	12	4,3
	3a	11	3,9
	3b	5	1,8
	4a	7	2,5
	4b	2	,7
	5a	65	23,0
	5b	96	34,0
	Total	274	97,2
Perdidos	Sistema	8	2,8
Total		282	100,0

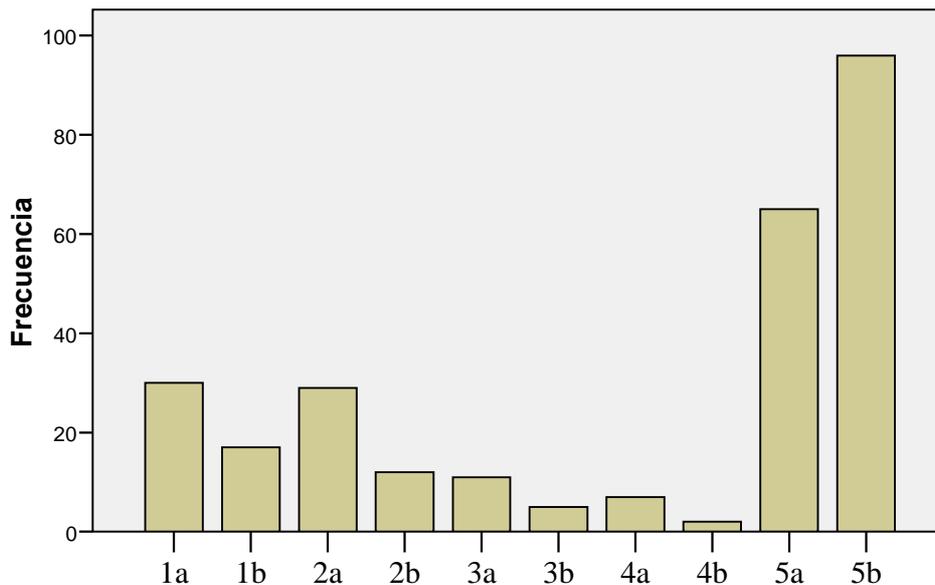


Gráfico 10. Estadío según la Clasificación de R-E.

El grupo más numeroso es el del estadio 5b, que corresponde a tumores con presencia de siembras vítreas independientemente del resto de las características tumorales. Lo que diferencia nuestra serie de otras publicadas.

14. Siembras Vítreas.

Atendiendo a la presencia de siembras vítreas en el momento de diagnóstico nos encontramos con un total de 96 ojos (34%), un porcentaje muy superior al de otras series publicadas. Los casos perdidos son los que han sido enucleados antes de llegar a nuestro centro o que no aportaban una historia clínica completa.

Así la distribución según el estadio al diagnóstico teniendo en cuenta la presencia de siembras vítreas, sería la siguiente:

Tabla 19. Presencia de siembras vítreas.

SIEMBRA VITREA		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
	NO	175	62,1	64,6
	SI	96	34,0	35,4
	Total	271	96,1	100,0
Perdidos	Sistema	11	3,9	

15. Siembras Subretinianas.

También se han identificado la presencia de siembras subretinianas, que en la mayoría de las ocasiones coincide con la descripción de un tumor de características exofíticas. Este es uno de los parámetros que no está considerado en la clasificación de Reese-Elsworth, y sí en la nueva Clasificación Internacional.

Tabla 20. Siembras Subretinianas.

SIEMBRA SUBRETINIANA		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
	NO	238	84,4	86,9
	SI	36	12,8	13,1
	Total	274	97,2	100,0
Perds	Sistema	8	2,8	
Total		282	100,0	

16. Morfología.

La mayoría de los tumores de nuestra serie, 242 casos (85,8%), son etiquetados como endofíticos, 31 casos (11%) son exofíticos, 7 casos (2,5%) son identificados como mixtos, dado que compartían características propias de los tumores endofíticos y de los exofíticos al mismo tiempo, y 2 casos han sido etiquetados como infiltrantes, en los casos en los que aparecían tumores con un engrosamiento difuso de la retina, llegando prácticamente hasta el cuerpo ciliar. (Gráfico 11)

En el momento del diagnóstico 7 casos presentaban extensión tumoral a la cámara anterior, todos ellos fueron tratados con enucleación primaria.

Tabla 21. Morfología.

	Frecuencia	Porcentaje
ENDOFITICO	242	85,8
EXOFITICO	31	11,0
MIXTO	7	2,5
INFILTRANTE	2	,7
Total	282	100,0

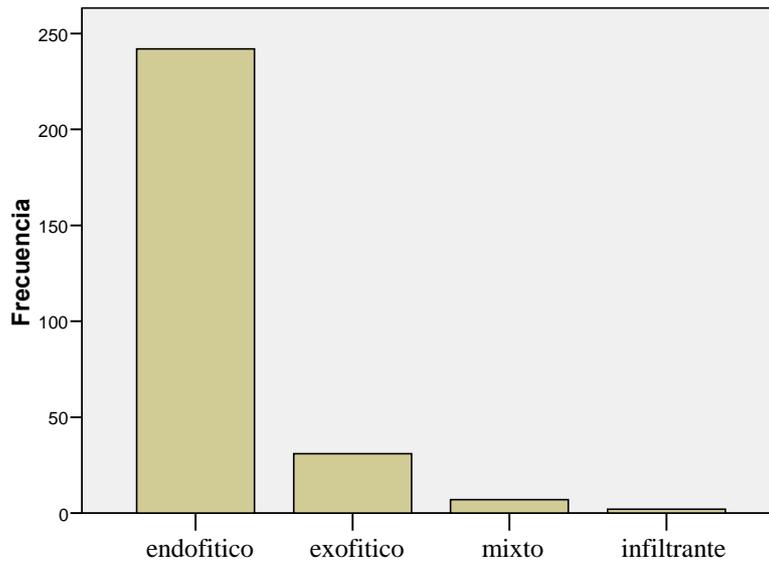


Gráfico 11. Morfología.

17. Localización.

La localización de las lesiones se ha clasificado en cuatro grupos, siendo la localización más frecuente la masiva, considerando como tal a los tumores que ocupan mas del 50% de la superficie retiniana.

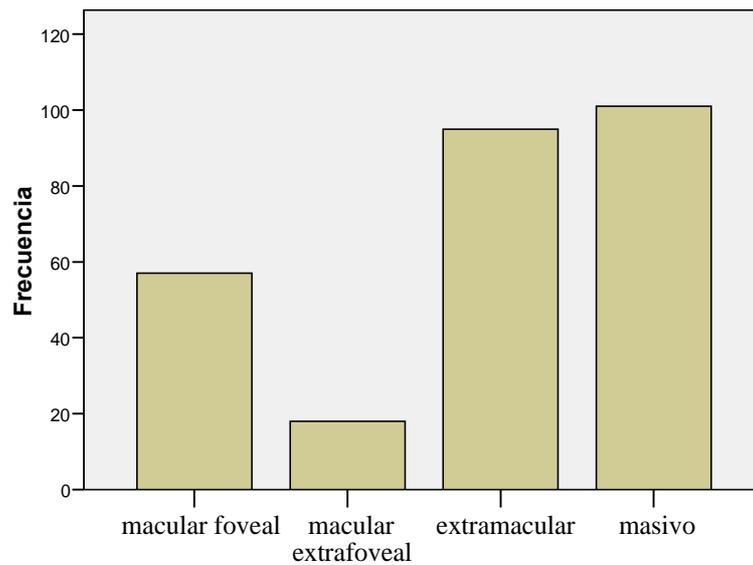


Gráfico 12. Localización tumoral intraocular.

Tabla 21. Localización tumoral intraocular.

	Frecuencia	Porcentaje
Macular foveal	57	20,2
Macular extrafoveal	18	6,4
Extramacular	95	33,7
Masivo	101	35,8
Total	271	96,1

18. Desprendimiento de Retina.

Otro dato recogido es la presencia de desprendimiento de retina, diferenciando si éste ha sido descrito en el momento del diagnóstico, o posteriormente, una vez iniciado el tratamiento.

En la tabla adjunta se observa que la mayoría de los pacientes de nuestra serie que presentaron desprendimiento de retina, fue identificado en el momento del diagnóstico, así como que la mayor parte de los pacientes (54,3%) han presentado desprendimiento de retina a lo largo de la evolución de su enfermedad; muchos de ellos se han reaplicado.

Tabla 22. Desprendimiento de retina.

		Frecuencia	Porcentaje
DR	NO	129	45,7
	Al dco	137	48,6
	Post tto	16	5,7
	Total	282	100,0

19. Error Diagnostico.

Algunos de los pacientes fueron remitidos a nuestro centro con un error en el diagnostico inicial, en la mayor parte de ellos el diagnostico se había hecho solamente mediante oftalmoscopia, sin valorar con ninguna prueba complementaria.

En 7 casos se diagnosticó retinoblastoma tratándose en realidad de otra entidad, que describo a continuación:

- Neuroblastoma. Fue diagnosticado mediante estudio histológico tras la enucleación.
- Enfermedad de Coats.
- Meduloepitelioma.
- Quiste del epitelio pigmentario de la retina.
- Posible hemangioma; lesión identificada que remitió completamente tras aplicar el primer ciclo de quimioterapia.
- Toxocariasis, en la forma quística posterior.

20. Tratamiento.

20.1. Quimioterapia.

20.1.1. Quimioterapia Sistémica.

La quimioterapia se administra habitualmente con una pauta de 6 ciclos de una semana de duración, intercalados por 3 semanas de descanso. El protocolo utilizado habitualmente es CEV. Se ha administrado a un total de 122 pacientes:

Tabla 23. Quimioterapia sistémica.

		Frecuencia	Porcentaje
QTP	NO	84	40,8
	SI	122	59,2
	Total	206	100,0

20.1.2. Quimioterapia Intraventricular.

Se administra en dos casos, en ambos pacientes si identificaron tumores bilaterales masivos, precisando una doble enucleación, con quimioterapia adyuvante, metotrexate intratecal; uno de los pacientes fue tratado en julio de 1992 y el otro en noviembre de 1993. En uno de los casos en la anatomía patológica se identificó infiltración de la coroides y la lamina cribosa de uno de los globos oculares. En el otro caso uno de los globos oculares presentaba infiltración de la lámina cribosa de uno de

los ojos y un tumor masivo con infiltración en la cámara anterior e implantes en el iris del ojo contralateral, que fue exanterado.

20.1.3. Quimioterapia intravítrea.

Es una terapia empleada en tres de los pacientes de nuestra serie. En dos de los pacientes se administraron 4 inyecciones intravítreas de 4mgrs de Thiotepa con una frecuencia semanal, el tratamiento fue realizado en Bruselas, por el r. De Potter, y consiguió el control local de las siembras vítreas.

Al tercero de los pacientes (Jhonatan Guirao Alcaraz) se le administra (8.7.96) una inyección intravítrea de 0.1 ml (75 mg) de VP16 junto con 0.1 ml (3mgr) de carboplatino, en un ojo único con un tumor que no respondía a quimioterapia sistémica, creciendo sobre la papila, con turbidez vítrea, y que posteriormente fue exanterado, recibiendo quimioterapia adyuvante, por presentar en el estudio histopatológico infiltración transescleral.

20.1.4. Quimioterapia Subtenoniana.

Es una técnica que se ha empleado en 3 casos de nuestra serie, todos ellos eran pacientes que estaban siendo tratados con quimioterapia sistémica, a la que respondían parcialmente, y se aplicaba junto con termoterapia transpupilar. Todos ellos eran pacientes con afectación severa bilateral, todos presentaban siembras vítreas con actividad tumoral, y en dos casos el tumor se acompañaba de un desprendimiento de retina presente desde el momento del diagnóstico.

20.1.5. Quimioterapia de Rescate.

Se considera quimioterapia sistémica de rescate cuando se administra una segunda pauta de quimioterapia. Se ha administrado en un total de 17 pacientes (8,3%). 7 de ellos presentaban afectación bilateral. 14 ojos fueron enucleados por no presentar control de la enfermedad con la quimioterapia de segunda línea.

La quimioterapia de segunda línea se ha administrado a un total de 17 pacientes, que equivale al 8,3% del total, todos ellos son casos de especial mal pronóstico.

Tabla 24. Pautas de quimioterapia de rescate.

MOTIVO	PAUTA	Nº CASOS
Aparición nuevos focos. Respuesta parcial VEC	VEC(entre 2 y 6 dosis)	8
Administración poca dosis en QTP primera línea por la edad.	Topotecan+ciclofosfamida	1
Continúa la actividad. Respuesta parcial.	VEC	2
Nuevo foco	VC	2
Corta edad	CE	1
Nuevos focos	V+genoxal	2
Nuevos focos	C+Adriamicina	1

Al hacer el análisis por ojo, no por paciente, vemos que 14 globos oculares, de un total de 24, correspondientes a 14 pacientes tratados con quimioterapia de segunda línea, terminaron en enucleación:

Tabla 25. Ojos enucleados en pacientes tratados con quimioterapia de rescate.

		ENUCLEACION	
		NO	SI
QTP rescate	NO	113	143
	SI	10	14
Total		123	157

20.1.6. Otros Fármacos.

Un paciente ha sido tratado con Inmunoferrón, sin éxito, se trata de una paciente sin antecedentes familiares, con afectación bilateral y un retinoblastoma que responde sólo parcialmente a la quimioterapia, en ambos ojos se emplea como tratamiento de consolidación la termoterapia transpupilar, así como placas de rutenio y crioterapia para las lesiones más periféricas, que continúan apareciendo. Tras la administración del inmunoferron aparecen nuevas lesiones periféricas y un sangrado sobre la lesión principal de uno de los ojos, que finalmente se enuclea. El otro globo ocular se controla con la aplicación de tratamientos locales de consolidación.

20.1.7. Quimioterapia Postenucleacion.

En nuestra serie se ha administrado quimioterapia adyuvante en 39 ojos, y 38 pacientes, todos ellos eran pacientes que presentaban infiltración de la lamina cribosa o de las envolturas oculares, identificado histopatológicamente. No en todos los casos de infiltración prelaminar se administro quimioterapia adyuvante.

Se administraron entre 2 y 6 ciclos de la pauta ordinaria, VEC, durante una semana de duración y separadas por un periodo de tres semanas.

Tabla 26. Enucleaciones y quimioterapia posterior.

		Enucleación		Total
		NO	SI	
QTP postenucleación	NO	123	118	241
	SI	0	39	39
Total		123	157	280

20.2. Radioterapia Externa

Se administra radioterapia externa a un total de 66 pacientes (23,4%), la dosis media empleada es de 41 Gy (mín. 21 y máx. 49). En un caso se administró a un menor de un año de edad dado que no había respondido a quimioterapia sistémica ni local y era un caso bilateral de estadio avanzado.

36 de los ojos tratados desarrollaron cataratas, de los que 29 fueron intervenidos. En todos los casos se produjo una mejora de la agudeza visual y ninguno de los pacientes sufrió complicaciones relevantes.³⁸¹ Los resultados de las distintas técnicas empleadas para la extracción del cristalino, con colocación o no de lente intraocular y la funcionalidad visual ha sido reportada previamente por el grupo del Hospital La Paz. Ninguno de los pacientes intervenidos presentó recidiva tumoral, y todos ellos llevaban más de un año es estadio de regresión.

20.3. Tratamiento Local

Se incluye en este apartado tanto los pacientes que recibieron termoterapia transpupilar, como los que recibieron fotocoagulación, crioterapia o braquiterapia. El empleo de las distintas terapias se distribuye de la siguiente manera:

Un total de 127 pacientes (45%) han recibido alguna de las modalidades de tratamiento local, pero sólo 16 (6,4%) de ellos se han controlado con la aplicación aislada de una terapia local, todos los demás han precisado asociar otra disciplina para controlar el proceso tumoral.

La **braquiterapia** que se ha administrado en nuestra serie se ha realizado aplicando placas de Rutenio; del total de 62 pacientes en los que se ha empleado ésta disciplina. En 61 casos (98,39%) se ha utilizado la braquiterapia como parte de una terapia combinada, y ha sido eficaz para el control local de la enfermedad utilizado de manera aislada únicamente en 1 caso (1,69% de los que reciben braquiterapia), lo que es equivalente al 0,354% de todos los casos de nuestra serie.

La **termoterapia transpupilar** (TTT) ha sido un tratamiento que se ha utilizado en tumores de hasta 4,5 mm de altura sobre la superficie de la retina. Ha sido empleada en 63 ojos (22,3%), y ha sido suficiente para controlar el desarrollo de la enfermedad en 4 casos, es decir, en el 6,35% de todos los casos en los que se aplica, o el 1,4% del total de los pacientes de nuestra serie.

La **crioterapia** ha sido administrada de forma transescleral utilizando un terminal de frío, su uso se ha indicado en tumores de menos de 1,5 mm de diámetro y de localización periférica. En los 9 casos en los que ha servido como terapia definitiva se trataba de estadios muy precoces en el diagnóstico de la enfermedad, tumores de pequeño tamaño que se identifican como un hallazgo casual. Ha sido útil en el control de la enfermedad en 9 casos (3,2% del total de los pacientes de nuestra serie).

La **fotocoagulación** se emplea en tumores también de localización periférica, pero de difícil acceso para la sonda de criocoagulación. Se ha practicado empleando una

sonda de láser diodo. Se ha empleado de forma aislada únicamente en dos casos. Su uso no es muy frecuente dada la posibilidad de recidiva tumoral a partir de los bordes de la lesión que es tratada.

Tabla 27. Distribución de los pacientes con tratamiento local aislado o combinado.

	Nº CASOS	Nº CASOS AISLADO	PORCENTAJE DEL TOTAL	PORCENTAJE TOTAL AISLADO
BRAQUITERAPIA	62	1	21.3	0.36
TERMOTERAPIA	63	4	22.3	1.4
CRIOTERAPIA	78	9	27.7	3.2
FOTOCOAGULACION	8	2	2.8	0.7

20.4. Tratamientos Combinados

En la mayoría de los pacientes de nuestra serie un tratamiento utilizado de forma aislada no es suficiente para conseguir el control tumoral.

La terapia combinada con mayor tasa de éxitos es el uso de la quimioterapia sistémica junto con tratamientos locales; lo que se denomina, como se ha explicado anteriormente, quimiorreducción y tratamiento de consolidación. Ha sido empleada en 97 de los ojos de nuestra serie, lo que equivale al 34,4% del total.

Los resultados del análisis de los pacientes de nuestra serie tratados con ésta disciplina y la tasa de éxitos así como las escasas complicaciones posteriores, comparada con las reportadas con otros tratamientos más agresivos ha sido publicada por el grupo de trabajo del Hospital La Paz recientemente.⁶⁴⁹

Tabla 28. Quimiorreducción tratamiento de consolidación focal.

	Frecuencia	Porcentaje
Otros ttos	185	65,6
QTP + CL	97	34,4
Total	282	100,0

Los casos resistentes a quimioterapia sistémica, fueron tratados con radioterapia externa, en los casos en los que estaba indicado, según los criterios expuestos en el apartado de la introducción. Un total de 43 ojos (15.2%) recibieron éste tratamiento.

Los casos más resistentes, 19 en total, recibieron la combinación de los tres tipos de terapia; quimioterapia sistémica junto con tratamiento de consolidación y radioterapia externa, 10 de los pacientes así tratados (52,6%) controlaron la progresión de la enfermedad; el resto, 47,4% (9 casos) precisaron enucleación.

Tabla 29. Quimioterapia sistémica combinada con radioterapia externa.

	Frecuencia	Porcentaje
QTP+RTP	43	15,2
QTP+RTP+local	19	6,76

Otro pequeño porcentaje de pacientes recibió radioterapia externa junto con tratamiento local, un total de 10 pacientes fueron candidatos a esta modalidad de tratamiento.

A continuación aparece una tabla en la que se detalla en resumen el tipo de tratamiento administrado al conjunto de los pacientes. En el grupo denominado enucleación se identifican los pacientes que han sido enucleados de forma primaria, sin aplicárseles ningún tratamiento previamente.

Tabla 30. Distribución de los tratamientos en nuestra serie.

	Frecuencia	Porcentaje
ENUCLEACIÓN	72	25,5
QTP	44	15,6
RTP	14	5,0
LOCAL	17	6,0
QTP+RTP	24	8,5
QTP+LOCAL	82	29,1
RTP+LOCAL	10	3,5
QTP+RTP+LOCAL	19	6,7
Total	282	100,0

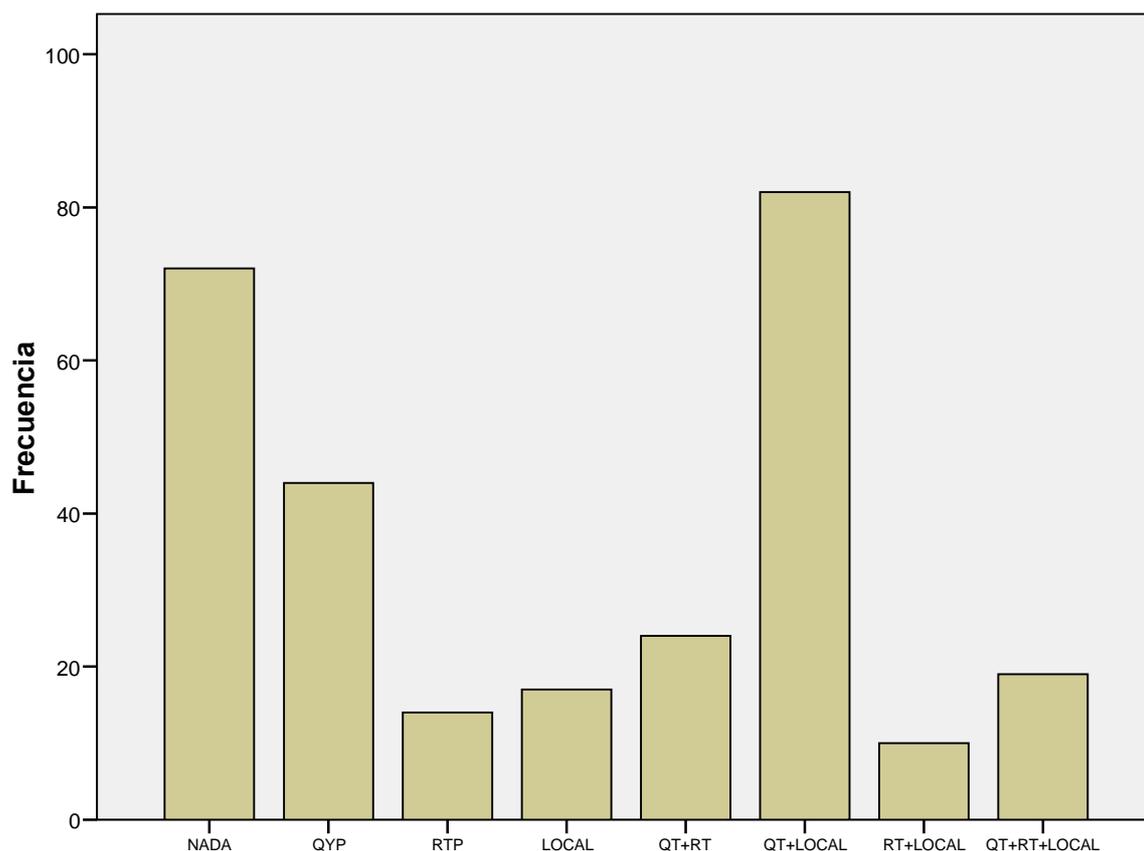


Gráfico 13. Distribución de los tratamientos en nuestra serie.

La siguiente tabla es una modificación de la anterior, en la que se distribuyen los pacientes estudiados en nuestra serie excluyendo a aquellos que fueron enucleados de forma primaria, según el tratamiento que han recibido.

Tabla 31. Porcentaje de tipo de tratamiento en nuestra serie, excluyendo las enucleaciones primarias.

		Frecuencia	Porcentaje
	QTP	44	21,0
	RTP	14	6,7
	LOCAL	17	8,1
	QTP+RTP	24	11,4
	QTP+LOCAL	82	39,0
	RTP+LOCAL	10	4,8
	QTP+RTP+LOCAL	19	9,0
	Total	210	100,0

21. Tiempo de Seguimiento de los Pacientes.

El tiempo de seguimiento es un parámetro referido al paciente, cuantifica el tiempo transcurrido desde el momento del diagnóstico hasta la última revisión, independientemente de si ha habido enucleación o no. Los datos perdidos son pacientes referidos desde otros centros en los que no se ha podido precisar la fecha del diagnóstico.

La media de seguimiento de nuestros pacientes es de 58.84 meses (mín. 12 y máx. 321).

Tabla 32. Análisis descriptivo del tiempo de seguimiento de nuestra serie.

N	Válidos	197
	Perdidos	9
Media		58,84
Mediana		43,00
Mínimo		12
Máximo		321

Todos nuestros pacientes siguen revisiones periódicas, y una vez entran en regresión y están estables, las revisiones pueden ser más espaciadas, pero nunca suspendidas.

22. Tiempo de Seguimiento Hasta la Enucleación.

Del total de los 282 ojos de nuestra serie el 55,7% (157 ojos) fueron enucleados. El tiempo medio transcurrido hasta la enucleación es de 6,71 meses (mín. 0 y máx. 70). También corresponde a una distribución de tipo exponencial. La distribución de las distintas frecuencias se describe en el Gráfico 14.

En el gráfico aparece reflejado que la mayoría de los ojos que son enucleados (38,9%), lo son en el primer mes tras el diagnóstico, la mayoría de ellos son enucleados de forma primaria, sin recibir ningún tipo de tratamiento previo. Esto es verosímil dado el estadio tan avanzado que presentan los pacientes de nuestra serie en el momento en que se hace el diagnóstico.

De todos los pacientes enucleados sólo 5 han sido enucleados de forma bilateral, sus casos concretos se especifican posteriormente.

Tabla 33. Frecuencia de la edad de enucleación.

		Frecuencia	Porcentaje
	0 meses	61	38,9
	1-3 meses	17	10,8
	4-12 meses	37	23,6
	+12 meses	28	17,8
	Total	143	91,1
Perdidos	Sistema	14	8,9
Total		157	100,0

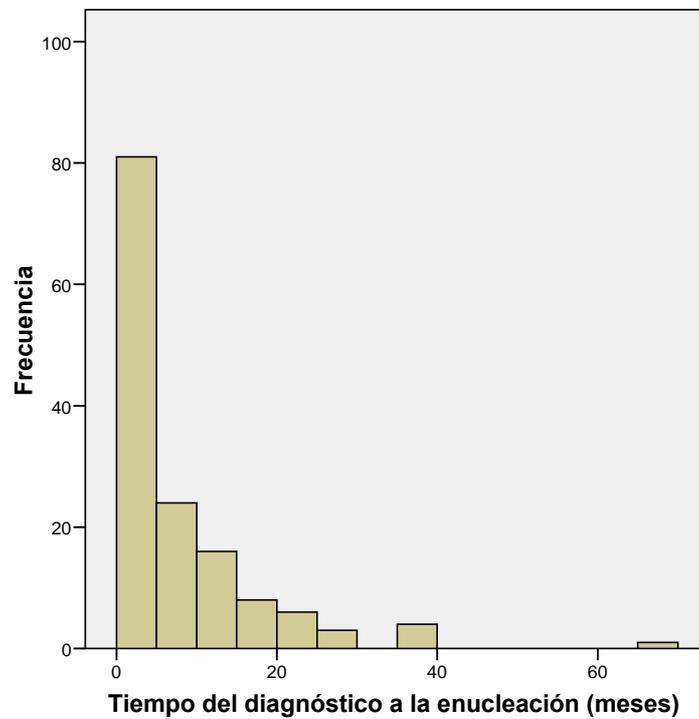


Gráfico 14. Periodo libre de enucleación.

Dada la distribución de los casos, de forma exponencial, resulta más representativo el valor de la mediana que el de la media, por eso resulta muy significativa la representación del diagrama de cajas, que se expone a continuación (Gráfico 15).

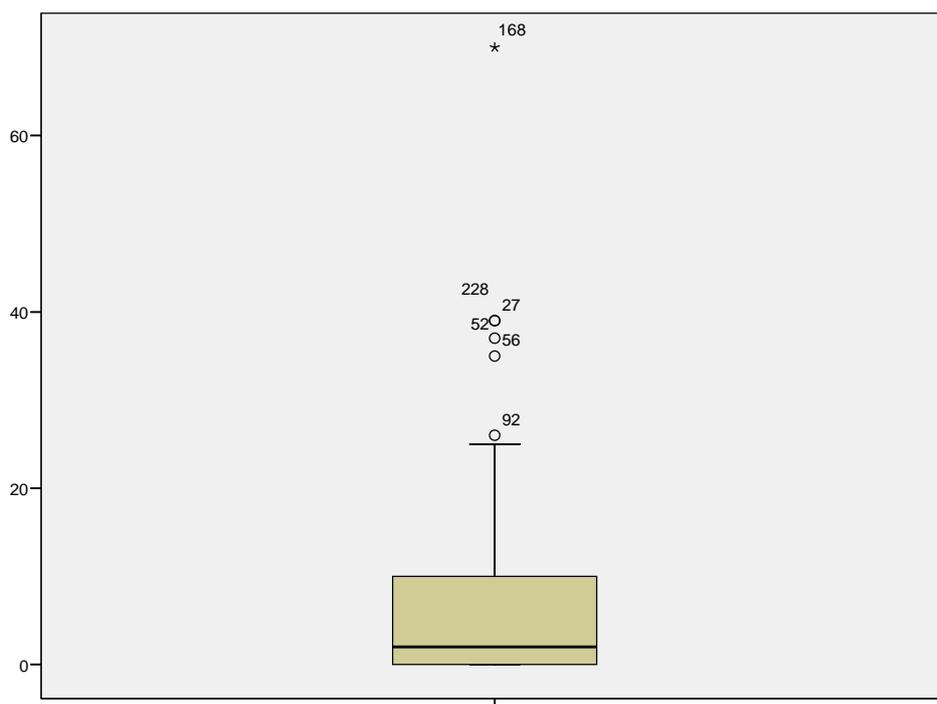


Gráfico 15. Diagrama de cajas del periodo libre de enucleación.

Tabla 34. Análisis descriptivo del periodo libre de enucleación.

N	Válidos	143
	Perdidos	139
Media		6,71
Mediana		2,00
Desv. típ.		10,160
Mínimo		0
Máximo		70
Percentiles	25	,00
	50	2,00
	75	10,00
	90	19,60

23. Tiempo de Seguimiento del Retinoblastoma

Sin embargo cuando consideramos los globos oculares que presentan retinoblastoma de modo independiente, podemos elaborar una curva de supervivencia que evalúa cómo de heterogéneos son nuestros datos en cuanto al tiempo de seguimiento. Tomamos un total de 270 casos (globos oculares), de los que 150 sufren

enucleación (considerado como evento), los 120 casos restantes se consideran censurados en la fecha en la que se les realiza la última revisión.

Así resulta una curva de supervivencia que valora el tiempo de seguimiento de cada globo ocular con tumor hasta que es enucleado o hasta que se realiza la última revisión.

La estimación de la media de éste parámetro es de 126,57 meses, con un error típico de 10,323 (IC95% 106,338-146,338). La estimación de la mediana es de 15, con un error típico de 2,959 (IC 95% 9,201-20,799). La representación de ésta curva de supervivencia es el Gráfico 16.

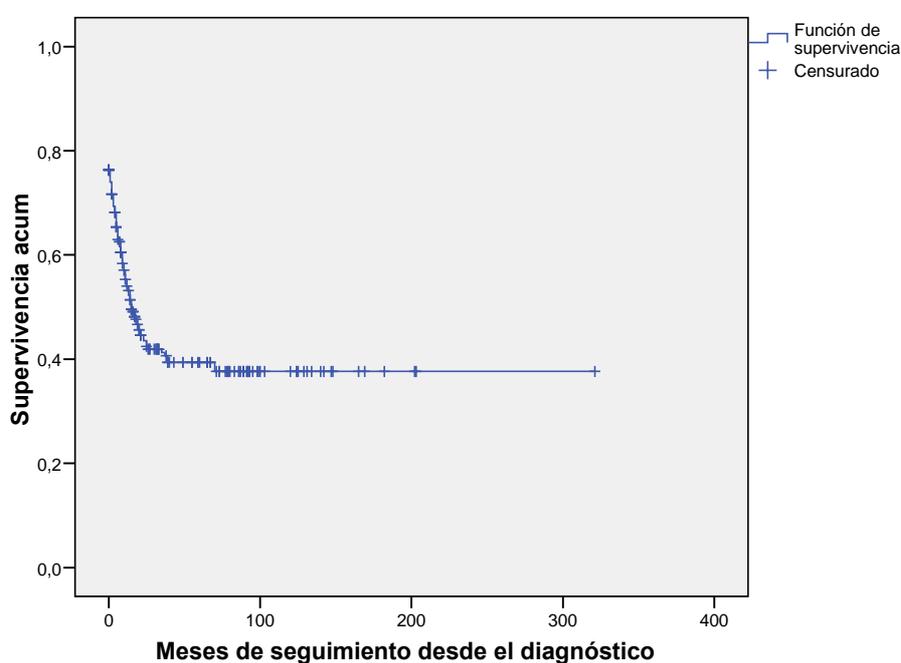


Gráfico 16. Periodo de seguimiento de los globos oculares con retinoblastoma.

24. Agudeza Visual Final.

Se realiza una valoración cuantitativa del estado funcional del globo ocular. Éste es un parámetro con muchas dificultades para su obtención. Por un lado, se trata de pacientes de muy corta edad, en muchos casos no son colaboradores para este tipo de exploración y por otro lado, son pacientes que en ocasiones presentan dificultades visuales y que en la consulta, bajo una situación de estrés, se hace más difícil la fiabilidad de los datos.

No en todos los casos puede utilizarse para la exploración el test de Snellen, que serviría para homogeneizarlos, sino que, en ocasiones, se han utilizado el test de Pigassou u otras valoraciones más groseras, como son la cuenta de dedos, el movimiento de manos, o la percepción de luz.

En la Tabla 35 se recoge la distribución de las agudezas visuales de los pacientes de nuestra serie en los que ha sido posible una valoración cuantitativa, recogiendo los datos de cada ojo con enfermedad de forma independiente (no se recoge la funcionalidad visual de los ojos libres de enfermedad).

Dada la dispersión de los datos, para hacer más sencilla su interpretación se ha categorizado la variable en 4 grupos, y los ojos enucleados no han sido tenidos en cuenta en esta distribución. Los datos perdidos por el sistema son los ojos de pacientes no enucleados que no colaboran para hacer una valoración objetiva de su funcionalidad visual. De los pacientes que conservan el globo ocular y son colaboradores para medir la función visual, la mayor parte presentan una agudeza visual entre 0,5 y 1.

En el Gráfico 17 se representa con un diagrama de barras la distribución de los pacientes que conservan el globo ocular según su agudeza visual final.

Tabla 35. Agudeza visual final de los pacientes tratados por retinoblastoma.

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
Válidos	<0,1	22	17,9	29,3
	0,1-0,5	19	15,4	25,3
	0,5-1	34	27,6	45,3
	Total	75	61,0	100,0
Perdidos	Sistema	48	39,0	
Total		123	100,0	

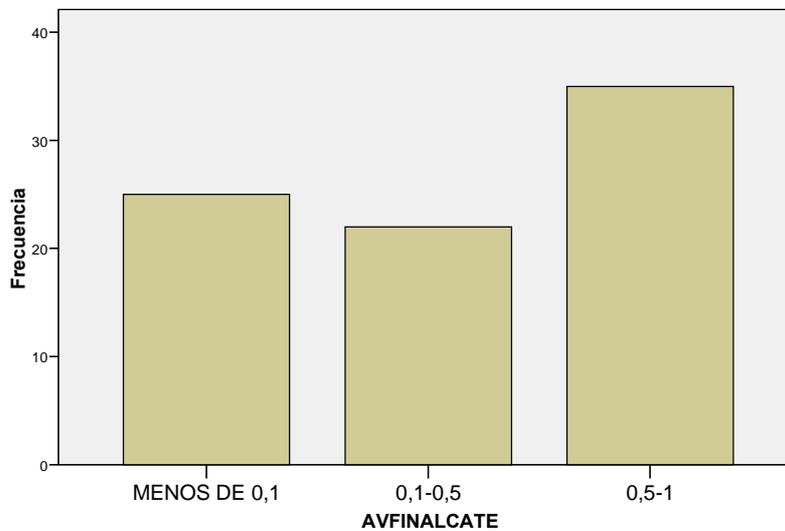


Gráfico 17. Agudeza visual final de los globos oculares conservados y tratados.

4.2. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE DIAGNÓSTICO Y LOS ANTECEDENTES FAMILIARES CONOCIDOS.

La distribución de la edad de diagnóstico de los pacientes de nuestra serie no sigue una curva normal, sino exponencial; al separar el grupo de pacientes que presenta antecedentes familiares de enfermedad de los pacientes que no los tienen y realizar un estudio descriptivo se obtienen dos curvas diferentes (Gráficos 18 y 19).

El grupo que no tiene antecedentes familiares de enfermedad tiene una edad media de presentación de 19,05 meses (IC 95% (16.50, 21.61)) mientras que el grupo con antecedentes familiares conocidos tiene una edad media de presentación de 11,53 meses (IC 95%(4.89, 18.17)).

Para valorar las diferencias entre ambas realizamos test de U-Mann Whitney (test no paramétrico) que muestra diferencias estadísticamente significativas, con un valor de $Z = -2,186$ ($p = 0.029$).

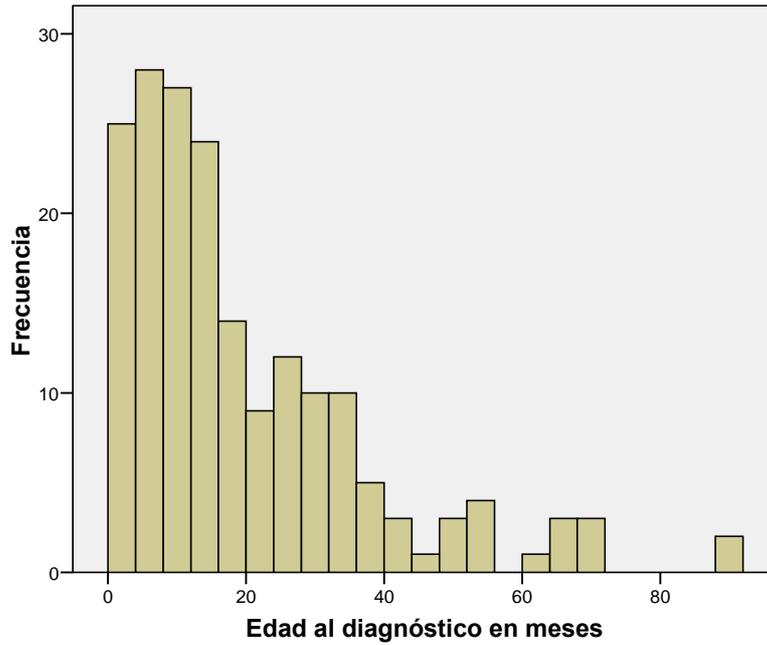


Gráfico 18. Edad de diagnóstico en los pacientes sin antecedentes familiares conocidos.

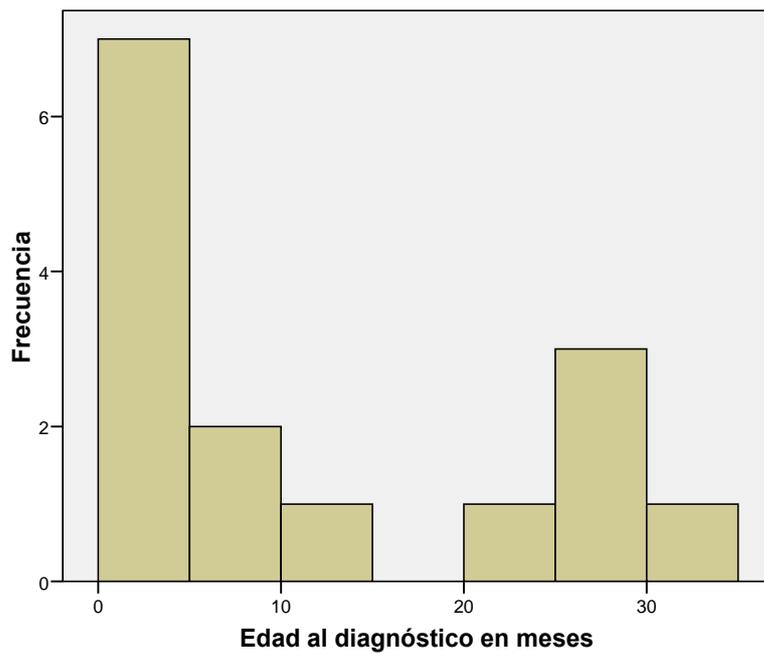


Gráfico 19. Edad de diagnóstico en los pacientes con antecedentes familiares conocidos.

La mediana de la edad de diagnóstico para los pacientes sin antecedentes familiares es de 13,50 meses, mientras que para los pacientes con antecedentes es de 5 meses; dada la distribución de los datos, éste parámetro resulta más representativo que el valor de la media, se aprecia claramente la diferencia en el diagrama de cajas.

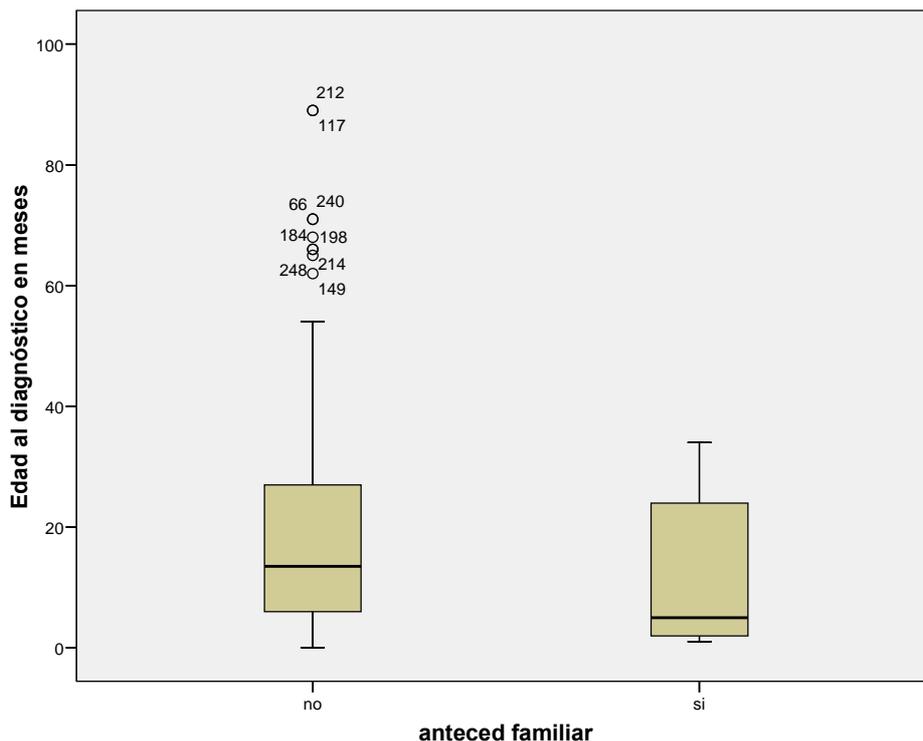


Gráfico 20. Edad de diagnóstico según la presencia de antecedentes familiares.

Al repetir el estudio de correlación categorizando la edad en cuatro grupos (Tabla 36) encontramos que la edad de presentación en los casos con antecedentes familiares es más precoz que en los casos esporádicos, aplicando una prueba exacta de Fisher, el resultado es estadísticamente significativo presentando un valor de $p=0,042$.

Tabla 36. Edad de diagnóstico y antecedentes familiares.

		AA FF		Total
		NO	SI	
Edad dco	<6 meses	49	8	57
	6-12 meses	37	2	39
	12-24 meses	46	1	47
	mas 24 meses	59	4	63
Total		191	15	206

En el Gráfico 21 se representa mediante un diagrama de barras la distribución de los pacientes por edad de diagnóstico categorizada, según tengan o no antecedentes familiares conocidos.

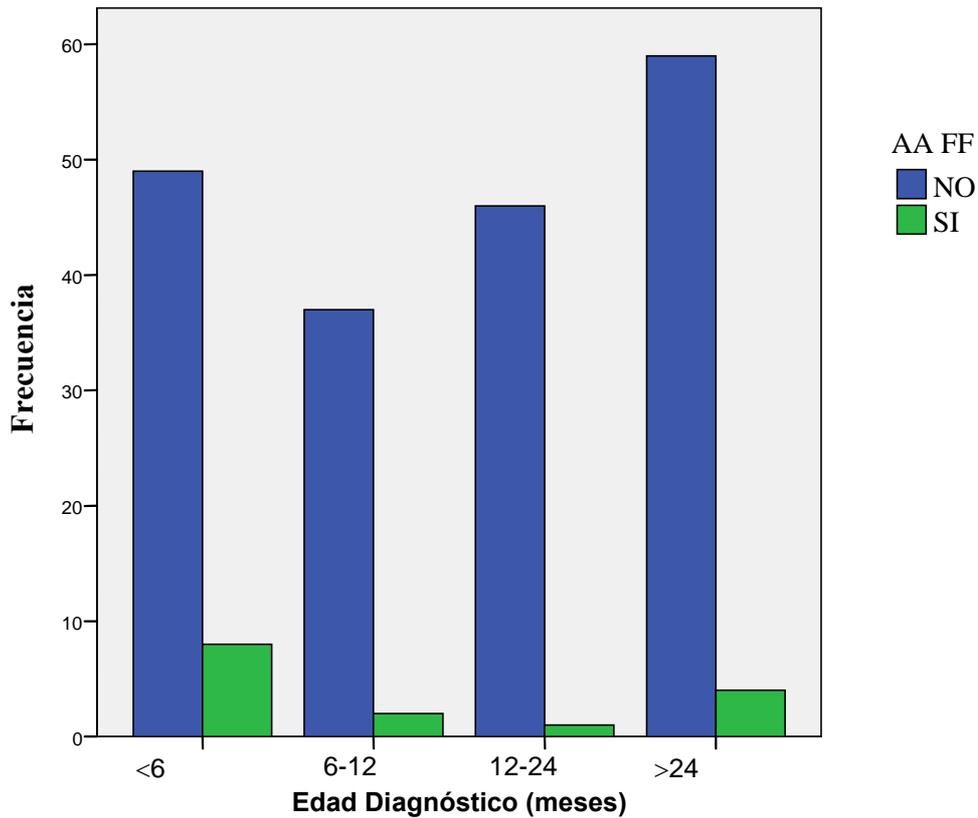


Gráfico 21. Edad de diagnóstico categorizada según los antecedentes familiares.

4.3. RELACIÓN ENTRE EDAD AL DIAGNÓSTICO Y FORMA DE PRESENTACIÓN.

El retinoblastoma, es una patología que aparece en la edad pediátrica y que habitualmente se diagnostica por la presencia de signos, no síntomas.

Los distintos signos en el momento del diagnóstico, según la edad de presentación, siguen la distribución de la Tabla 37.

Se han tomado datos de 200 pacientes, los 6 casos perdidos son los que no se ha podido establecer con exactitud la fecha del diagnóstico. En el grupo denominado “ambos” se clasifican los pacientes que en el momento del diagnóstico presentaban tanto leucocoria como estrabismo.

Tabla 37. Distribución del signo diagnóstico según la edad de presentación.

EDAD DCO	PRIMER SIGNO								Total
	Leucocoria	Estrabismo	H. Casual	Ambos	Buftalmos	Uveítis	Celulitis	< AV	
< 6 m	39	6	5	3	3	0	0	0	56
6-12 m	18	16	3	0	0	0	0	0	37
12-24 m	24	12	1	4	1	0	3	1	46
>24 m	34	12	7	3	1	1	0	3	61
Total	115	46	16	10	5	1	3	4	200

Analizamos los datos utilizando la prueba Chi-cuadrado de Pearson y no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p=0.011$), aunque sí una cierta tendencia.

El signo más prevalente en todos los grupos de edad es la leucocoria, como hay signos que se presentan con muy poca frecuencia, reagrupamos las categorías, y obtenemos los siguientes resultados:

Tabla 38. Primer signo categorizado y edad de diagnóstico.

EDAD DCO	PRIMER SIGNO					Total
	Leucocoria	Estrabismo	H Casual	Ambos	Otros	
< 6 m	39	6	5	3	3	56
6-12 m	18	16	3	0	0	37
12-24 m	24	12	1	4	5	46
mas 24 m	34	12	7	3	5	61
Total	115	46	16	10	13	200

Analizamos de nuevo los datos utilizando la prueba Chi-cuadrado de Pearson y tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p=0.015$).

Sin embargo, al observar la distribución de los casos (Gráfico 22) vemos que aún siendo la leucocoria el signo más prevalente en todos los grupos de edad, la proporción respecto de las otras categorías es mayor a edades tempranas y el estrabismo aparece como signo clínico en relación a las otras entidades en mayor proporción en

pacientes de más edad, así como los otros signos, más infrecuentes, como son la uveítis, la celulitis o los signos indirectos de glaucoma, que aparecen como primera manifestación en los pacientes de mayor edad. Las diferencias no son estadísticamente significativas, dado que son muchas categorías, algunas de ellas con un número muy reducido de casos, lo que hace que no sean comparables entre sí.

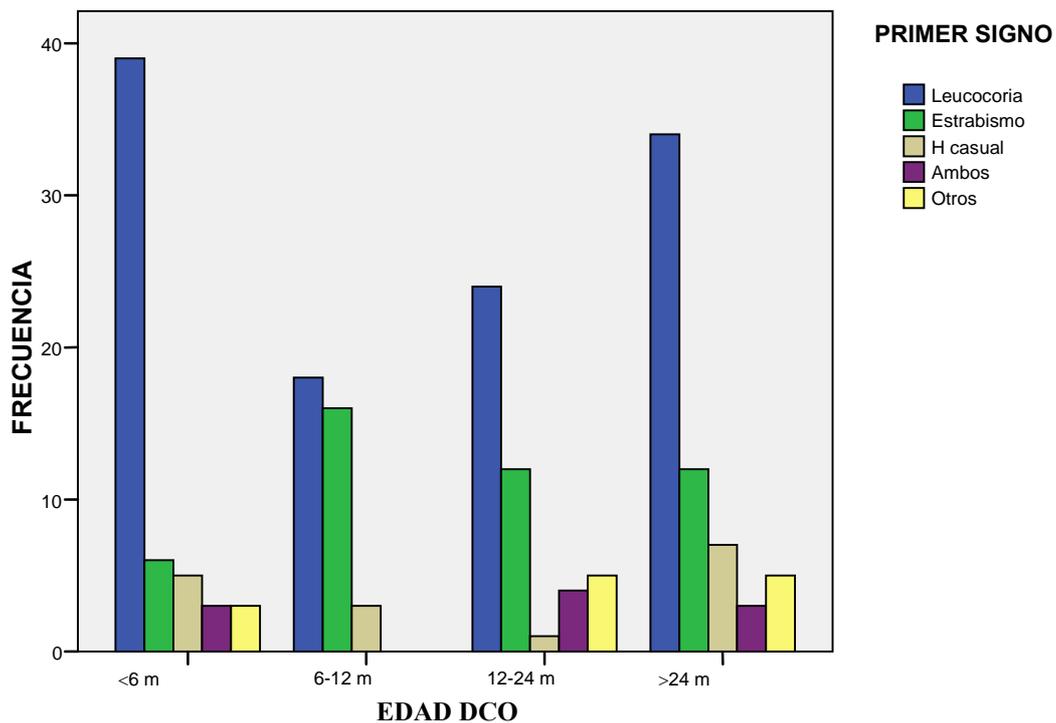


Gráfico 22. Distribución de los casos según edad y forma de presentación del retinoblastoma.

4.4. RELACIÓN ENTRE LA MORFOLOGÍA Y EDAD DE DIAGNÓSTICO.

No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre la morfología del tumor y la edad de presentación de la enfermedad. (Prueba Exacta de Fisher, $p=0.388$).

El hecho de que solo dos tumores presenten características anatomopatológicas de enfermedad infiltrante, y ambos se diagnostiquen a edades tardías, tampoco es significativo, dado que son muy pocos casos, comparados con el grupo de nuestra serie.

Tabla 39. Morfología y edad de diagnóstico.

EDAD DCO (por ojo)	MORFOLOGIA				TOTAL
	ENDOFITICO	EXOFITICO	MIXTO	INFILTRANTE	
<6 m	78	10	1	0	89
6-12 m	45	8	1	0	54
12-24 m	52	8	2	2	64
>24 m	59	4	3	0	66
Total	234	30	7	2	273

Prueba exacta de Fisher, $p=0.388$.

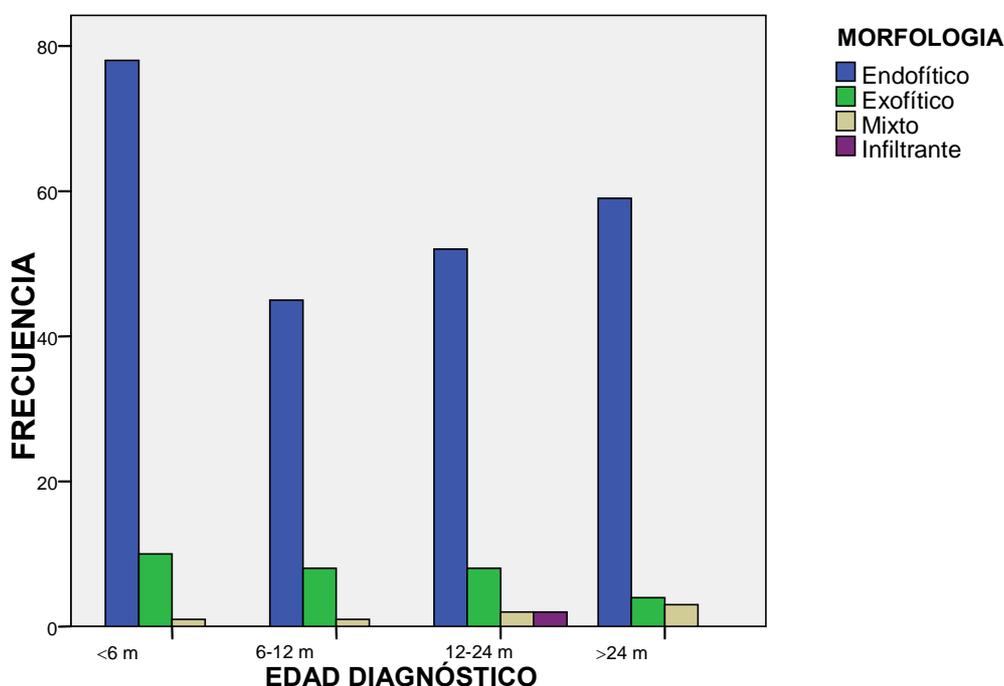


Gráfico 23. Morfología y edad de diagnóstico.

4. 5. RELACIÓN ENTRE MORFOLOGÍA Y SIGNO DE PRESENTACIÓN.

Los datos estadísticos demuestran que los pacientes con tumores exofíticos se manifiestan clínicamente con leucocoria con mayor proporción de la esperada por azar, o que los signos clínicos especiales, categorizados como “otros” aparecen con mayor frecuencia en los tumores de tipo endofítico. (Prueba exacta de Fisher $p=0.001$)

Tabla 40. Signo de presentación y morfología tumoral.

PRIMER SIGNO	MORFOLOGÍA				TOTAL
	ENDOFÍTICO	EXOFÍTICO	MIXTO	INFILTRANTE	
Leucocoria	99	22	5	1	127
Estrabismo	42	7	2	1	52
Otros	81	1	0	0	82
Ambos	11	1	0	0	12
TOTAL	233	31	7	2	273

Prueba exacta de Fisher p=0.001

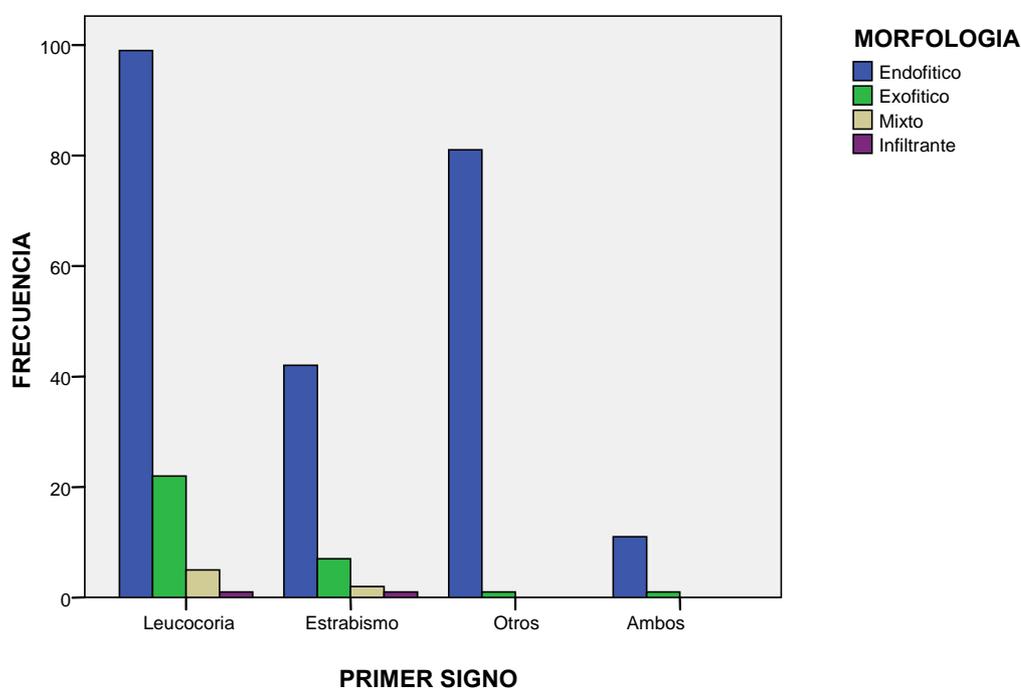


Gráfico 24. Signo de presentación y morfología.

4.6. RELACION ENTRE ESTADIO TUMORAL Y RIESGO DE ENUCLEACIÓN.

La relación entre el estadio de Reese-Elsworth en el momento del diagnóstico y la enucleación es clara; en el conjunto de nuestros pacientes (algunos de ellos pertenecientes a la era pre-quimioterapia) ésta clasificación tiene validez como factor pronóstico, valorando como desenlace la pérdida del globo ocular.

Hemos clasificado a los pacientes de la serie primero según el tamaño y la localización de los tumores, prescindiendo de la presencia o ausencia de siembras vítreas:

Tabla 41. Estadio Reese-Elsworth modificado* y riesgo de enucleación.

ESTADIO DCO	ENUCLEADO		TOTAL
	NO	SI	
1a	32	2	34
1b	17	1	18
2a	27	11	38
2b	12	8	20
3a	13	7	20
3b	4	7	11
4a	3	9	12
4b	4	4	8
5a	9	102	111
Total	121	151	272

*Prescindiendo de la presencia de siembras vítreas.

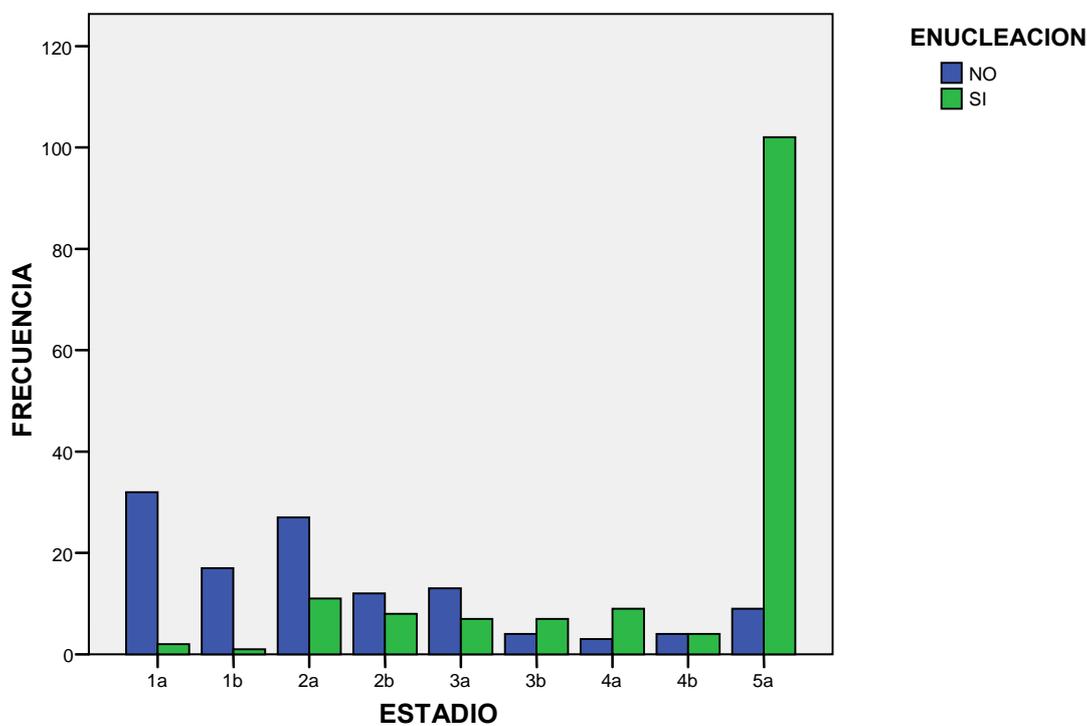


Gráfico 25. Clasificación Reese-Elsworth modificada y enucleación.

Aplicando una Prueba exacta de Fisher se obtiene un valor de $p=0.001$, con lo que se concluye que el estadio en el momento del diagnóstico en nuestra serie, tiene un valor pronóstico en cuanto a la conservación del globo ocular, utilizando la clasificación de Reese-Elsworth modificada.

El resultado del mismo análisis utilizando la clasificación clásica de Reese-Elsworth, en el que todos los pacientes con presencia de siembras vítreas se incluyen en el grupo 5b, también se encuentra diferencias estadísticamente significativas, con lo que también tendría un valor pronóstico, al menos en cuanto a conservación del globo ocular. (Prueba exacta de Fisher, $p<0.001$). La distribución de los casos se representa en el Gráfico 26.

Tabla 42. Clasificación Reese-Elsworth y enucleación.

ESTADIO	ENUCLEACION		TOTAL
	NO	SI	
1a	30	0	30
1b	16	1	17
2a	21	8	29
2b	9	2	11
3a	8	3	11
3b	2	3	5
4a	2	5	7
4b	1	1	2
5a	6	58	64
5b	26	70	96
Total	121	151	272

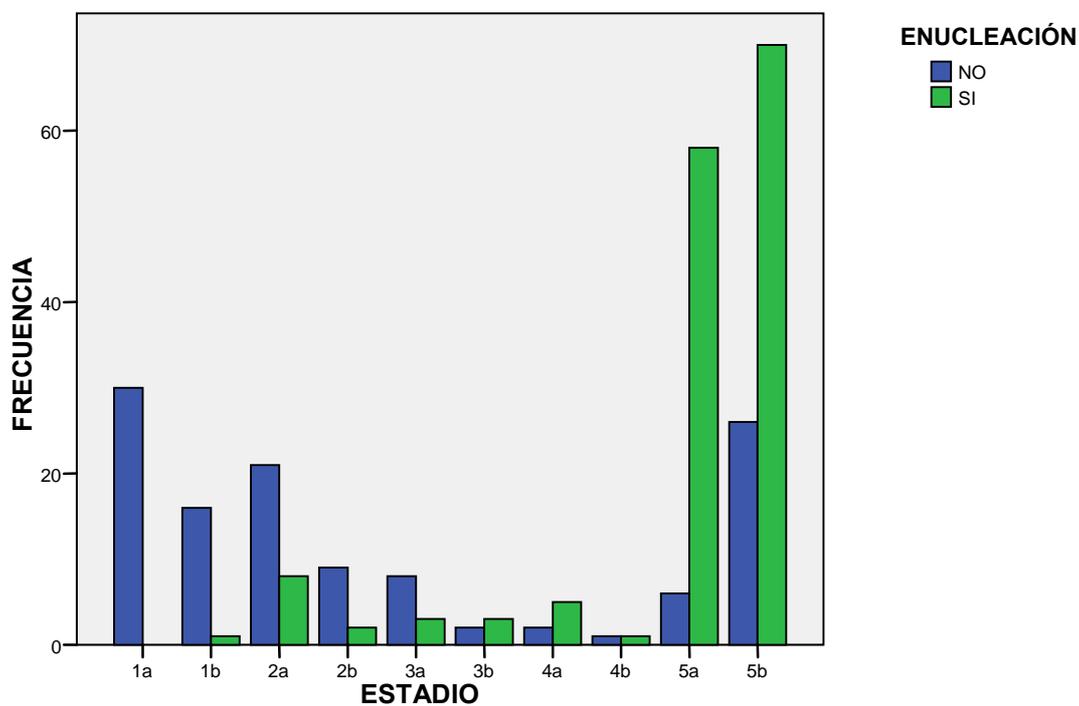


Gráfico 26. Clasificación Reese-Elsworth y enucleación.

4.7. RELACION ENTRE SIEMBRAS VÍTREAS Y ENUCLEACIÓN.

Si valoramos las siembras vítreas de forma independiente, esto es, sin tener en cuenta el tamaño y la localización de los tumores primarios, resulta que también tienen un valor predictivo en cuanto a la conservación del globo ocular, aplicando una Prueba de Chi-cuadrado de Pearson, con un valor de $p < 0,0001$.

Tabla 43. Siembras vítreas y enucleación.

SIEMBRA VITREA	ENUCLEACION		TOTAL
	NO	SI	
NO	95	79	174
SI	25	71	96
Total	120	150	270

Prueba de Chi cuadrado de Pearson, $p < 0.0001$.

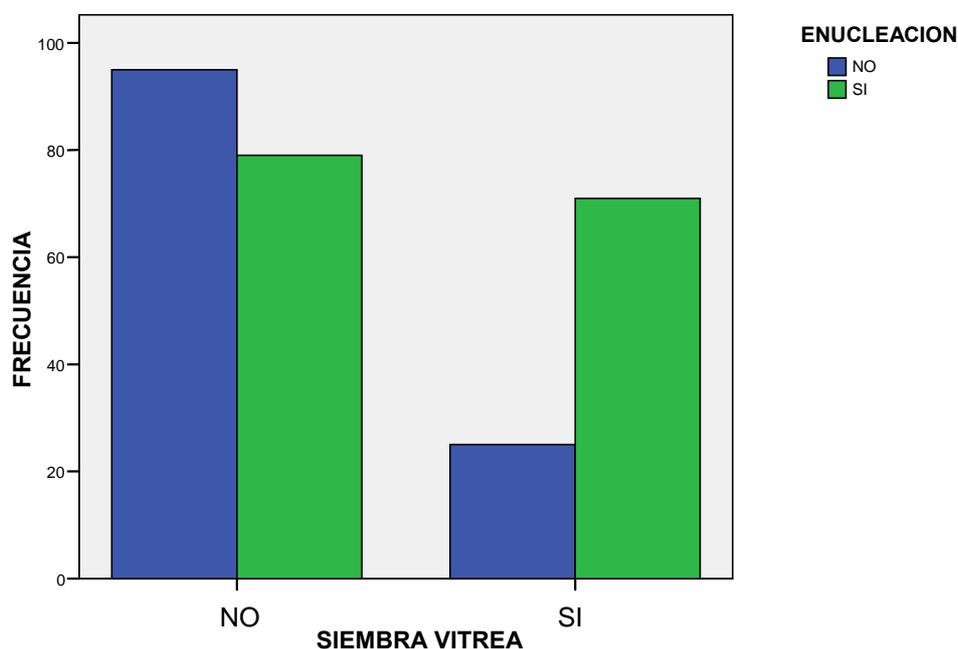


Gráfico 27. Siembra vítrea y enucleación.

Mediante el estadístico de Mantel-Haenszel se calcula el valor de la odds ratio (OR), que es de 3,415, ($p < 0.001$) (IC 95% 1.981-5.889) es decir, la probabilidad de ser enucleado respecto de no serlo (odds de enucleación) es 3,4 veces superior en el grupo de pacientes que presentan siembras vítreas en el momento del diagnóstico respecto a los que no las presentan.

4.8. CORRELACIÓN ENTRE EL TRATAMIENTO RECIBIDO Y ENUCLEACIÓN POSTERIOR.

Realizamos un análisis bivalente por cada pauta terapéutica comparada por un lado con el resto de tratamientos aplicados, y por otro lado con el resto de tratamientos excluyendo los pacientes que recibieron como tratamiento enucleación primaria. Así se determina cuál es la tasa de control tumoral de cada una de las pautas terapéuticas. Se considera la enucleación final como fracaso del tratamiento aplicado.

4.8.1. Tratamiento local.

Los pacientes que sólo reciben tratamiento local tienen menor riesgo de enucleación comparado con el resto de posibilidades terapéuticas (test exacto de Fisher $p=0,001$). En éste caso no se puede calcular el valor de la OR porque en todos los pacientes en los que se empleó tratamiento local de manera aislada el tumor fue controlado, ninguno de los casos fue enucleado.

En el grupo de pacientes con tratamiento local incluimos a los pacientes que han recibido tratamiento con termoterapia transpupilar, fotocoagulación, crioterapia o braquiterapia, de forma aislada y no como parte de una terapia de consolidación tras recibir quimioterapia sistémica. Tampoco se incluye a los pacientes que recibieron radioterapia externa.

Tabla 44. Enucleación y tratamiento local frente a otras alternativas terapéuticas.

TTO LOCAL	ENUCLEACION		TOTAL
	NO	SI	
NO	106	158	264
SI	16	0	16
TOTAL	122	158	280

Estadístico exacto de Fisher $p<0,001$

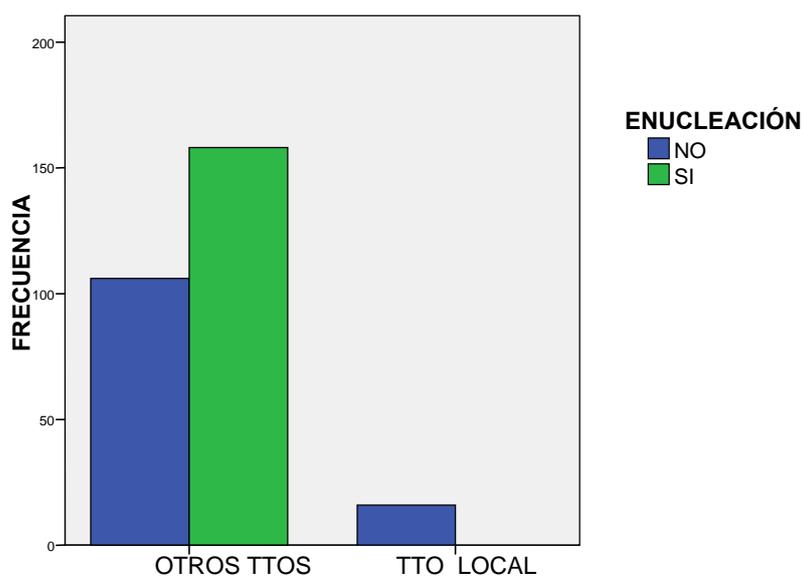


Gráfico 28. Tratamiento local aislado y enucleación.

Al excluir a los pacientes con peor pronóstico, considerando peor pronóstico los candidatos a enucleación primaria, la diferencia es igual de significativa (estadístico exacto de Fisher, $p < 0,001$), dado que ningún ojo se enuclea, de los que son tratados con tratamientos locales. La realidad es que los pacientes candidatos a tratamiento local que no responden favorablemente se tratan con quimioterapia sistémica o radioterapia externa antes de ser enucleados.

Tabla 45. Tratamiento local y Enucleación frente a otros tratamientos, excluyendo la enucleación primaria.

TTO LOCAL	ENUCLEACION		TOTAL
	NO	SI	
NO	105	87	192
SI	16	0	16
TOTAL	121	87	208

Estadístico exacto de Fisher $p < 0,001$.

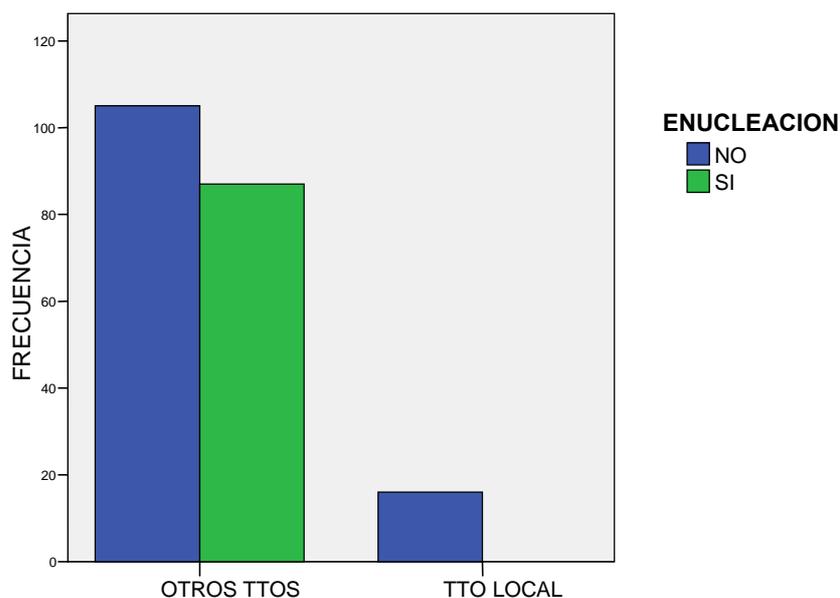


Gráfico 29. Tratamiento local y enucleación, excluyendo enucleación primaria.

4.8.2. Quimioterapia sistémica.

Los pacientes que reciben como tratamiento quimioterapia sistémica de forma aislada, es decir, sin tratamiento de consolidación añadido, tienen un alto riesgo de ser enucleados.

El 81,3% de los pacientes de nuestra serie que son tratados con quimioterapia sistémica aislada son enucleados. Éste resultado es poco probable que se obtenga por azar, aplicando una prueba Chi-cuadrado de Pearson obtenemos un valor $p < 0.001$, por lo que respecto al resto de las disciplinas, este tipo de tratamiento presenta un gran riesgo de terminar en enucleación posteriormente.

Con el empleo de la prueba de Mantel y Haenszel se obtiene un valor de OR de 4.055, con $p = 0.001$, (IC95% 1.236-9.263). Del total de los pacientes que son enucleados, presentan 4.055 más probabilidades de haber sido tratados con quimioterapia aislada que el resto de las posibilidades terapéuticas.

Tabla 46. Quimioterapia aislada y enucleación, frente al resto de terapias.

QTP SIST	ENUCLEACION		TOTAL
	NO	SI	no
NO	114	123	237
SI	8	35	43
TOTAL	122	158	280

Chi-cuadrado de Pearson $p < 0,00$

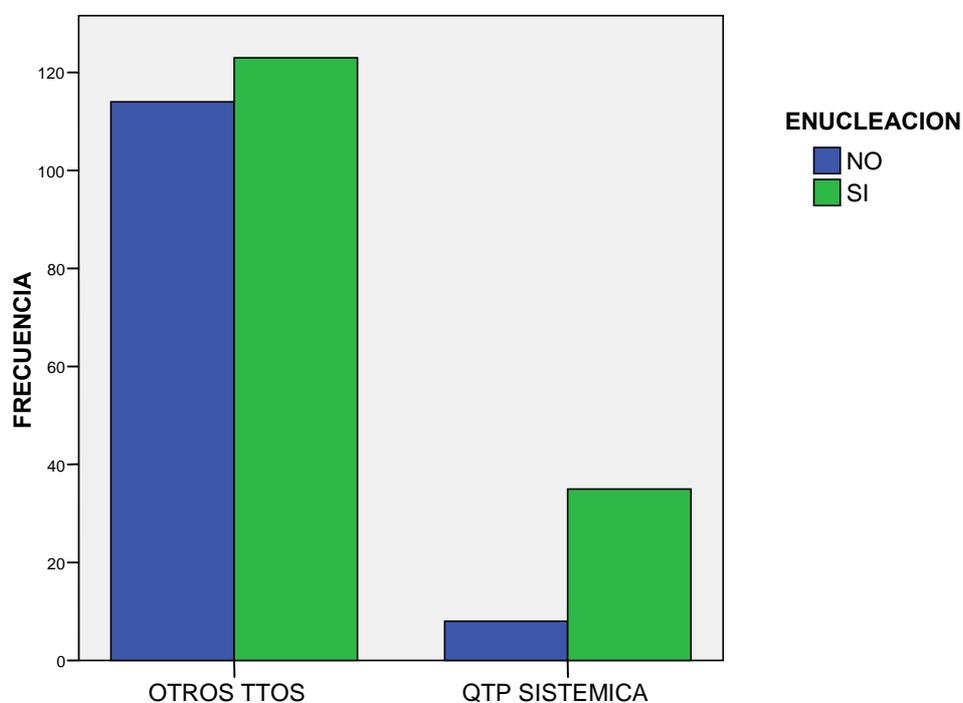


Gráfico 30. Quimioterapia aislada y proporción de enucleación, respecto al resto de tratamientos.

Si realizamos el análisis pero excluyendo a los pacientes a los que se les practica enucleación de forma primaria, observamos que los pacientes tratados con quimioterapia sistémica sin otros tratamientos asociados presentan una tasa de enucleación del 81,3%, comparado con el 31,51% del resto de las modalidades. Estos datos son estadísticamente significativos, aplicando la prueba Chi-cuadrado de Pearson presentan un valor de $p < 0.001$.

Empleando la razón de las ventajas común de Mantel-Haenszel se calcula una OR de 9,507.

Tabla 47. Quimioterapia y enucleación, frente a otros tratamientos, excluyendo la enucleación primaria.

QTP SIST	ENUCLEACION		TOTAL
	NO	SI	
NO	113	52	165
SI	8	35	43
TOTAL	121	87	208

Chi-cuadrado de Pearson $p < 0,001$.

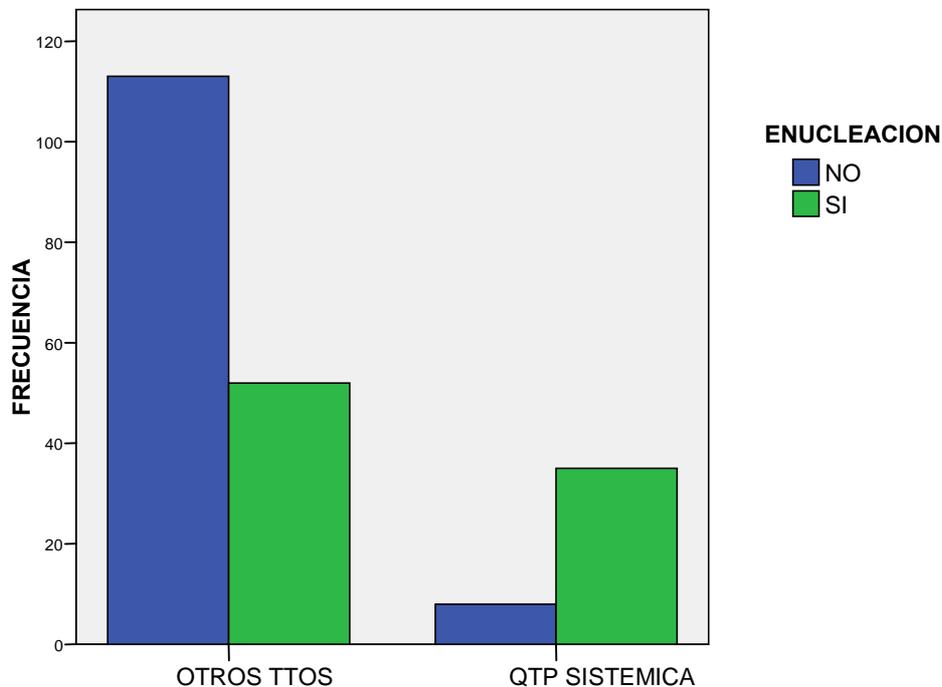


Gráfico 31. Quimioterapia aislada y proporción de enucleaciones frente al resto de tratamientos, excluyendo la enucleación primaria.

4.8.3. Radioterapia Externa.

Los pacientes de nuestra serie que reciben como tratamiento radioterapia externa de modo aislado se enuclean en un 50%. Aunque respecto al resto de las posibilidades terapéuticas no presenta diferencias estadísticamente significativas, (Chi-cuadrado de Pearson $p=0.619$) si aplicamos la estimación de ventajas de Mantel-Haenszel obtendríamos un valor para la OR de 0,762 ($p=0.639$; IC95% 0.264-2.267).

Tabla 48. Radioterapia externa y enucleación frente al resto de tratamientos.

RTP EXT	ENUCLEACION		TOTAL
	NO	SI	
NO	115	151	266
SI	7	7	14
TOTAL	122	158	280

Chi-cuadrado de Pearson $p=0.619$

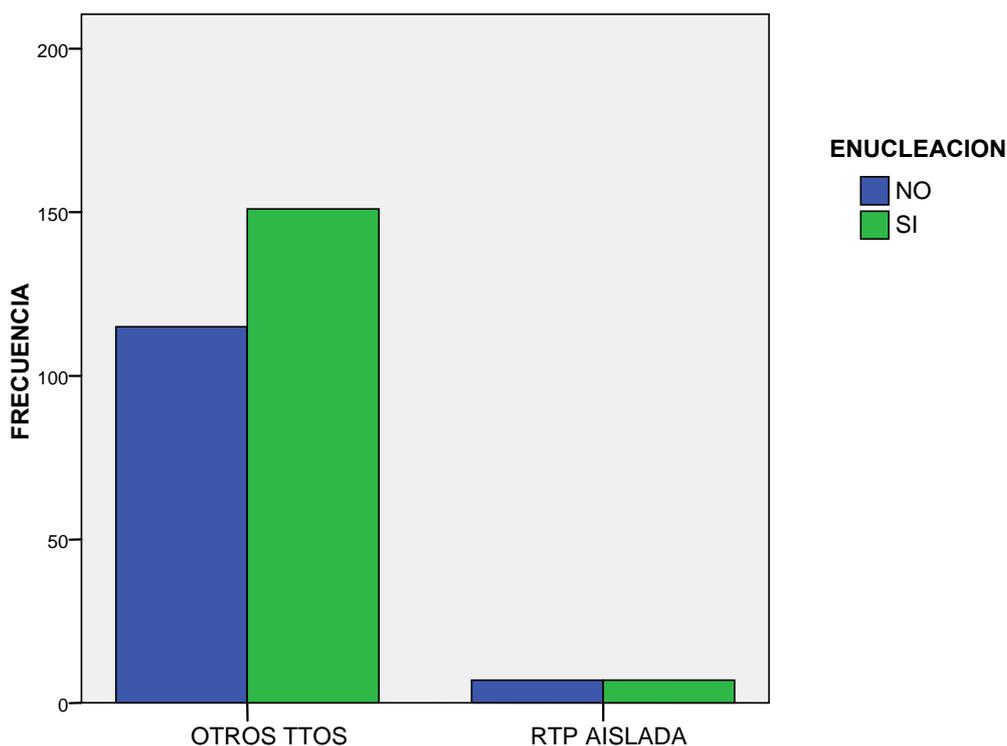


Gráfico 32. Radioterapia externa y enucleación frente al resto de tratamientos.

Si excluimos del análisis los pacientes con enucleación primaria la proporción de enucleaciones entre los dos grupos es de 50% para los que reciben radioterapia externa de forma aislada y 42,23% para el resto de los tratamientos aplicados, aunque las

diferencias de los resultados tampoco son estadísticamente significativas (Chi-cuadrado de Pearson $p=0.521$).

Tabla 49. Radioterapia externa y enucleación frente al resto de tratamientos, excluyendo la enucleación primaria.

RTP EXT	ENUCLEACION		TOTAL
	NO	SI	
NO	114	80	194
SI	7	7	14
TOTAL	121	87	208

Chi-cuadrado de Pearson $p=0,521$

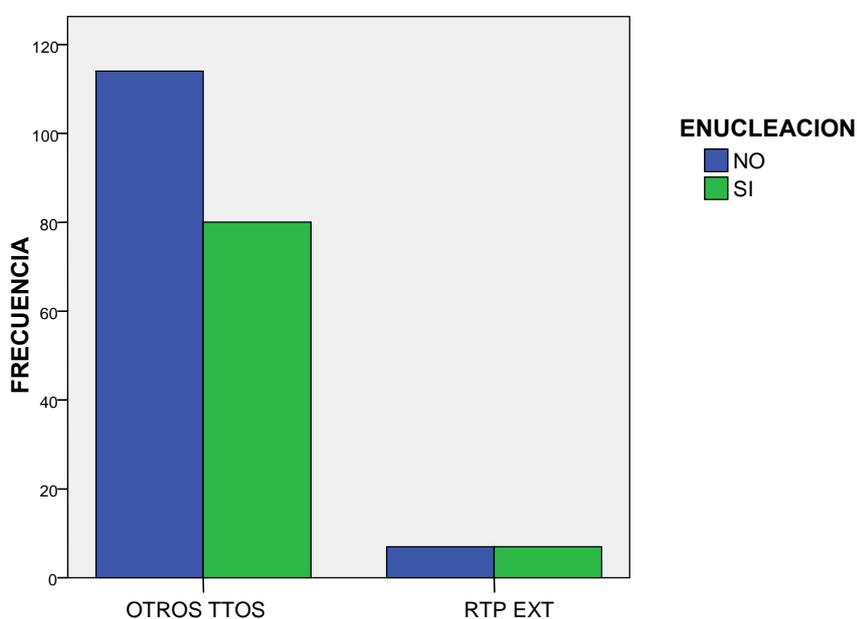


Gráfico 33. Radioterapia externa y enucleación frente al resto de tratamientos, excluyendo la enucleación primaria.

4.8.4. Quimioterapia sistémica y tratamiento de consolidación.

Cuando valoramos los pacientes que han recibido tratamiento con quimiorreducción y tratamiento de consolidación observamos unas diferencias muy significativas respecto al resto de las terapias. El valor de la OR es de 5,31 frente a la conservación del globo ocular ($p<0.001$; IC95% 9.345-3.021).

Tabla 50. Quimiorreducción y consolidación local y enucleación frente al resto de tratamientos.

QR+CL	ENUCLEACION		TOTAL
	NO	SI	
NO	65	134	199
SI	58	23	81
TOTAL	123	157	280

Chi-cuadrado de Pearson, $p < 0.001$

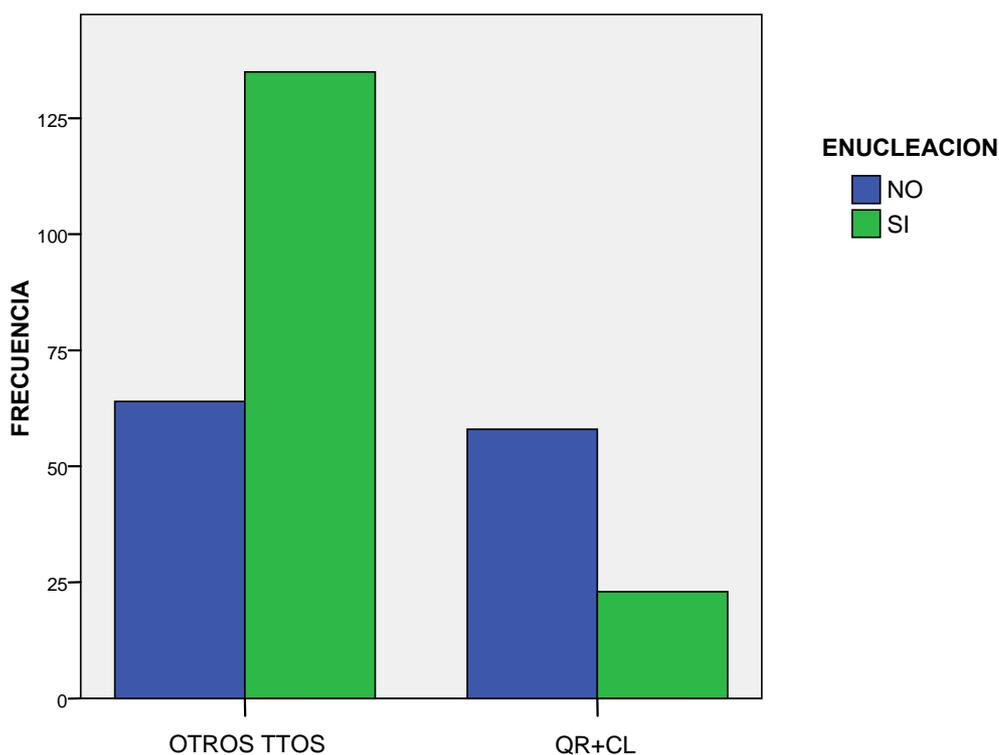


Gráfico 34. Quimiorreducción y consolidación local y enucleación frente al resto de alternativas terapéuticas.

Excluyendo del análisis los pacientes con enucleación primaria, las diferencias también son estadísticamente significativas ($p = 0,002$). El cálculo de la OR para estos pacientes es de 0,39 frente a la enucleación, o de 2,56 frente a la conservación del globo ocular ($p = 0.002$; IC95% 4.651-1.413).

Es decir, dentro del grupo de los pacientes enucleados es 2,56 veces más frecuente haber tenido cualquier tipo de tratamiento respecto de haber sido tratado con quimiorreducción y tratamiento de consolidación focal.

Tabla 51. Quimiorreducción y consolidación local y enucleación frente al resto de tratamientos, excluyendo la enucleación primaria.

QR+CL	ENUCLEACION		TOTAL
	NO	SI	
NO	63	64	127
SI	58	23	81
Total	121	87	208

Chi-cuadrado de Pearson $p=0,002$

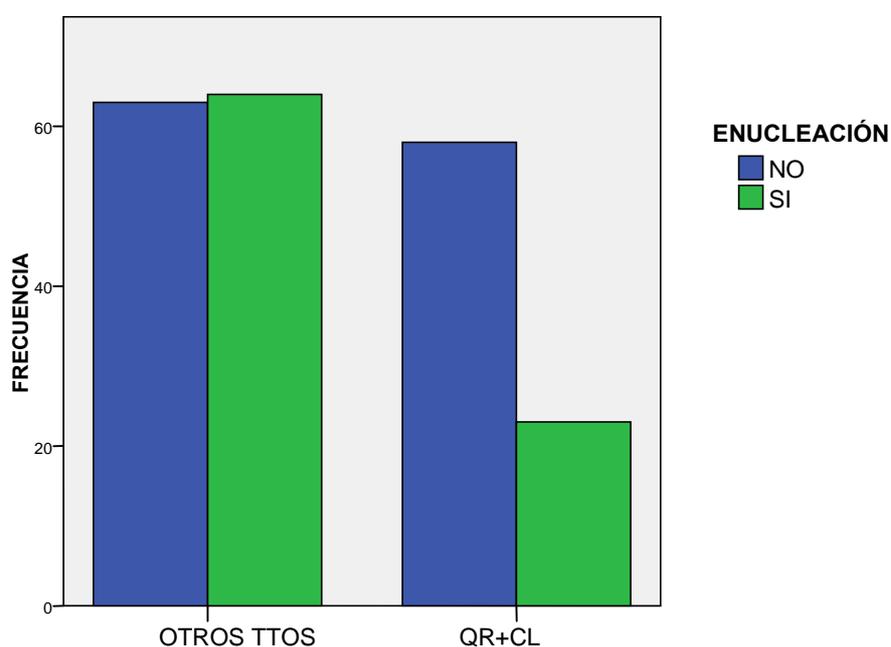


Gráfico 35. Quimiorreducción y consolidación local y enucleación frente al resto de tratamientos, excluyendo la enucleación primaria.

4.8.5. Quimioterapia Sistémica y Radioterapia Externa.

La terapia combinada con quimioterapia sistémica y radioterapia externa tiene una OR de 2,28 frente a la conservación del globo ocular ($p=0.061$; IC 95% 5.405-0.963). Es decir, un candidato a recibir este tipo de tratamiento tiene el doble de posibilidades que conservar el globo ocular respecto al resto de los grupos.

Tabla 52. Quimioterapia Sistémica y Radioterapia Externa y enucleación respecto al resto de tratamientos.

		ENUCLEACION		TOTAL
		NO	SI	
QTP+RTP	NO	108	148	256
	SI	15	9	24
TOTAL		123	157	280

Chi-cuadrado de Pearson $p=0,055$.

Sin embargo, si en el mismo análisis excluimos los ojos que por sus características son candidatos a enucleación primaria, el resultado deja de ser estadísticamente significativo, (Chi-cuadrado $p=0,648$) y el valor de la OR sería de 1,22 ($p=0.648$; IC 95% 2.950-0.512).

Tabla 53. Quimioterapia sistémica y Radioterapia externa y enucleación frente al resto de tratamientos, excluyendo la enucleación primaria.

		ENUCLEACION		TOTAL
		NO	SI	
QTP+RTP	NO	106	78	184
	SI	15	9	24
Total		121	87	208

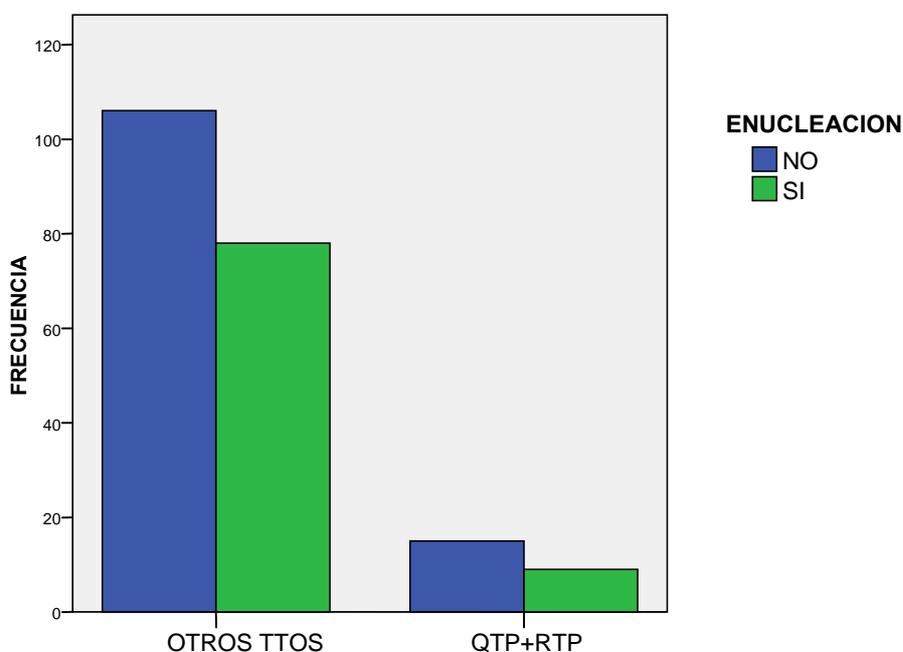


Gráfico 36. Quimioterapia sistémica y Radioterapia externa y enucleación frente al resto de tratamientos, excluyendo la enucleación primaria

4.8.6. Quimioterapia Sistémica, Radioterapia Externa y Tratamiento

Local.

El 45% de los pacientes que reciben este tratamiento son enucleados, lo cual no constituye una diferencia estadísticamente significativa respecto al resto de los pacientes considerados en conjunto (Chi-cuadrado de Pearson $p=0.429$).

El valor de la OR es de 1,456 ($p=0.431$; IC 95% 3.704-0.572).

Tabla 54. Las tres modalidades de tratamiento aplicadas de manera conjunta y enucleación frente al resto de posibilidades terapéuticas.

		ENUCLEACION		
		NO	SI	TOTAL
QTP+RTP+LOCAL	NO	113	148	261
	SI	10	9	19
Total		123	157	280

Chi-cuadrado de Pearson $p=,429$

Tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas si excluimos a los pacientes que son enucleados de forma primaria (Chi-cuadrado de Pearson $p=0.607$). Sin embargo se aprecia una cierta tendencia.

Tabla 55. Las tres modalidades de tratamiento aplicadas de manera conjunta y enucleación frente al resto de posibilidades terapéuticas, excluyendo la enucleación primaria.

		ENUCLEACION		
		NO	SI	TOTAL
QTP+RTP+LOCAL	NO	111	78	189
	SI	10	9	19
Total		121	87	208

Chi-cuadrado de Pearson $p= 0,607$

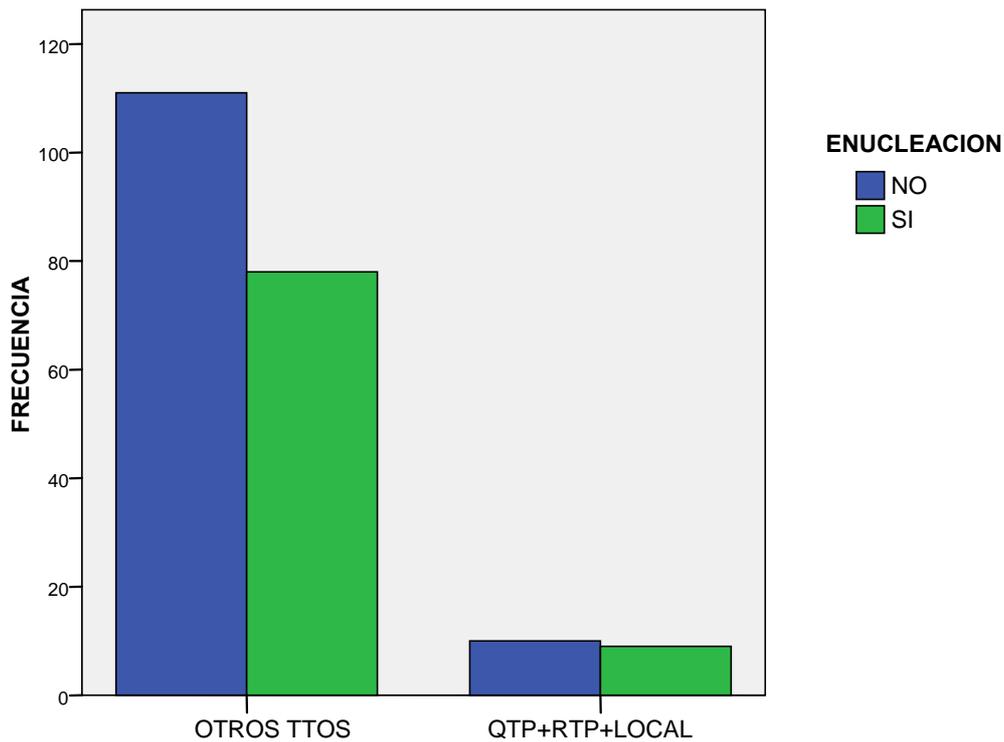


Gráfico 37. Las tres modalidades de tratamiento aplicadas de manera conjunta y enucleación frente al resto de posibilidades terapéuticas, excluyendo la enucleación primaria.

Como hemos dicho el 45% de los pacientes que reciben este tratamiento son enucleados, del resto de los pacientes, valorados en conjunto, excluyendo a los que reciben enucleación primaria, son enucleados el 41.2%.

El cálculo de la OR en este caso, excluyendo los globos oculares que se enuclean de forma primaria, es de 1.281 ($p=0.608$; IC 95% 2.012-0.303), pero no es estadísticamente significativo.

4.8.7. Radioterapia Externa y Tratamiento Local.

Es el grupo de pacientes más reducido. Son enucleados en un 30% de los casos, sin embargo, no es una diferencia estadísticamente significativa, (test exacto de Fisher $p=0,111$) frente al 57% de enucleaciones del resto de los pacientes. El valor de la OR es de 3.096 ($p=0.107$; IC 95% 12.195-0.784).

Tabla 56. Radioterapia externa y tratamiento local y enucleación frente al resto de tratamientos.

		ENUCLEACION		TOTAL
		NO	SI	
RTP+CL	NO	116	154	270
	SI	7	3	10
Total		123	157	280

Estadístico exacto de Fisher $p=0,111$

Cuando se excluye a los pacientes con peor pronóstico, la proporción de enucleaciones es de 30% para los pacientes con la triple terapia frente al 42,42% del resto de las disciplinas. Tampoco esta diferencia es estadísticamente significativa (test exacto de Fisher 0,437). El valor de la OR tampoco es significativo 1.718 ($p=0.442$; IC 95% 6.849-0.432).

Tabla 57. Radioterapia externa y tratamiento local y enucleación frente al resto de tratamientos, excluyendo la enucleación primaria.

		ENUCLEACION		Total
		NO	SI	
RTP+CL	NO	114	84	198
	SI	7	3	10
Total		121	87	208

Test exacto de Fisher $p=0,437$

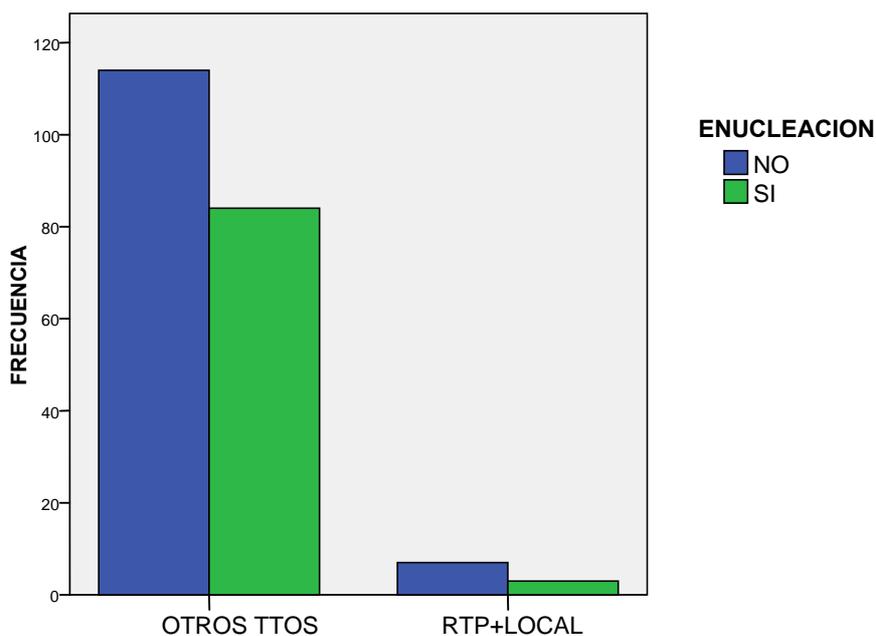


Gráfico 38. Radioterapia externa y tratamiento local y enucleación frente al resto de tratamientos, excluyendo la enucleación primaria.

4.9. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DEL PERIODO LIBRE DE ENUCLEACIÓN.

La distribución de las enucleaciones también sigue una distribución exponencial, no es un parámetro con características de una curva normal. La mayoría de los pacientes que se enuclean son intervenidos en un periodo de tiempo muy próximo a la fecha del diagnóstico; el 21,6% de los casos que resultan ser enucleados lo son en el primer mes tras el diagnóstico.

El total de los pacientes enucleados se representa en la siguiente gráfica:

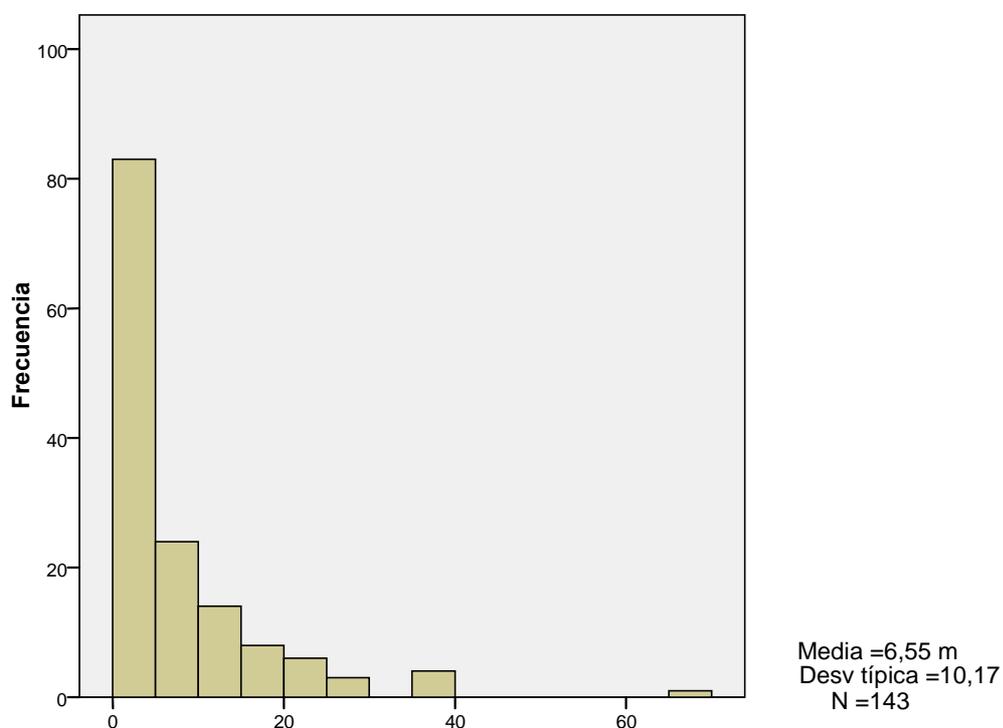


Gráfico 39. Distribución del momento de las enucleaciones, medido en meses desde el diagnóstico.

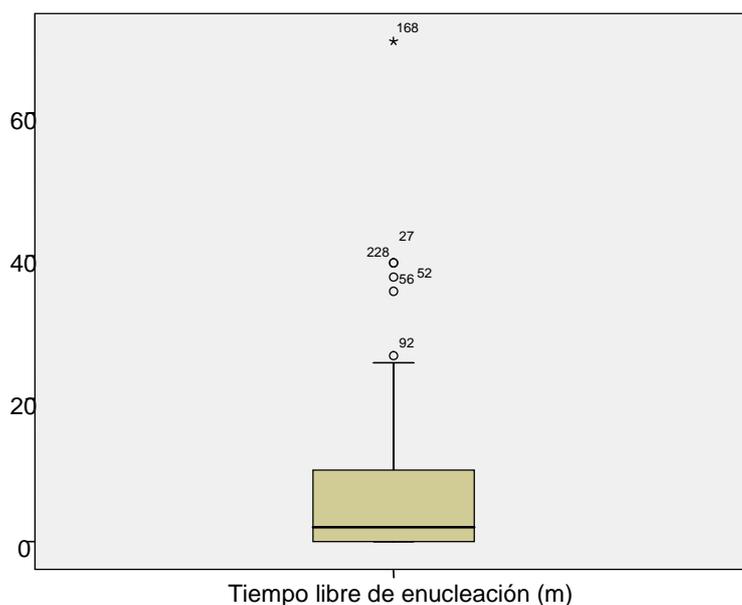


Gráfico 40. Diagrama de cajas del periodo transcurrido desde el diagnóstico hasta la enucleación, medido en meses.

143 casos de nuestra serie son enucleados, el tiempo medio de enucleación desde el diagnóstico es de 6,71 meses, con un mínimo de 2 días y un máximo de 70 meses. La mediana, que es un dato más representativo en este caso, dada la distribución de los casos, es de 2 meses. En el diagrama de cajas se representa la agrupación de los casos.

Para hacer más sencilla la interpretación de los datos obtenidos, se categoriza el periodo hasta la enucleación.

Los enucleados antes del primer mes son las consideradas como enucleaciones primarias, pacientes que, dado su estadio, no son candidatos a ningún tratamiento conservador.

Los del segundo y tercer rango son pacientes a los que se les aplica otra alternativa terapéutica previa a la enucleación, pero no existe respuesta o ésta es parcial; lo más frecuente es que el tumor continúe activo, no tenga signos de regresión, o que sigan apareciendo nuevos tumores en el mismo ojo.

En el último grupo se localizan los pacientes que reciben varios tratamientos, que tienen enfermedad bilateral, o los que se enuclean al cabo de mucho tiempo porque,

por ejemplo, desarrollan desprendimientos de retina, que no se reaplican, y terminan por perder la capacidad visual y entrar en ptisis bulbi.

Tabla 58. Distribución categorizada del periodo libre de enucleación de los pacientes enucleados.

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
Válidos	0 meses	61	21,6	42,7
	1-3 meses	17	6,0	11,9
	4-12 meses	37	13,1	25,9
	+12 meses	28	9,9	19,6
	Total	143	50,7	100,0
Perdidos	Sistema	139	49,3	
Total		282	100,0	

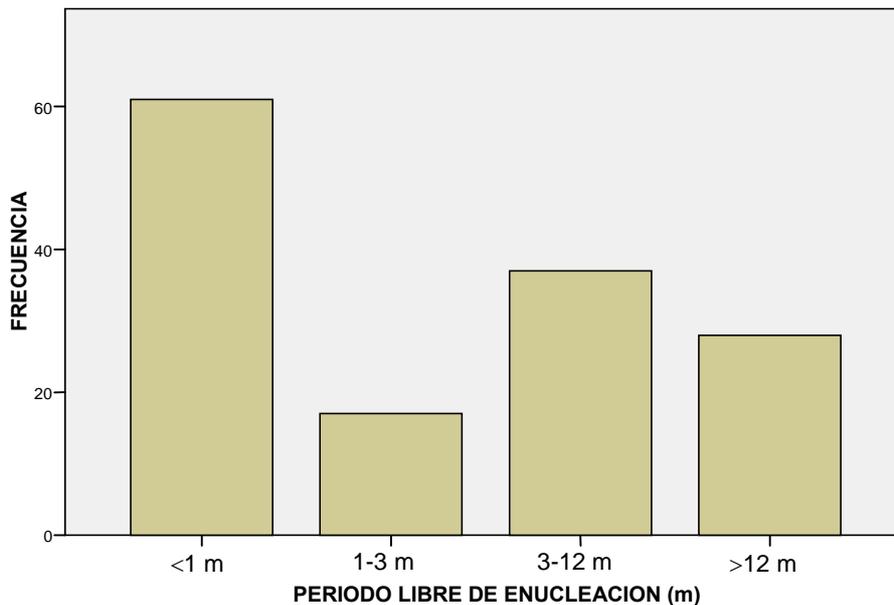


Gráfico 41. Distribución categorizada del periodo libre de enucleación de los pacientes enucleados.

Podemos analizar el periodo libre de enucleación según el tipo de tratamiento recibido, en el diagrama de cajas se diferencia con facilidad la esperanza de vida de los globos oculares según el tratamiento que han recibido.

Tabla 59. Periodo libre de enucleación de los globos oculares enucleados según la disciplina terapéutica de la que fueron candidatos.

TRATAMIENTO	TIEMPO MEDIO (MESES)	IC 95%	Nº CASOS
ENUCLEACION	0.25	(-.03, .52)	72
QTP	4.28	(2.55, 6.01)	35
RTP	10.86	(3.02, 18.69)	7
QTP+RTP	15.89	(9.53, 22.24)	9
QTP+LOCAL	14.36	(8.35, 20.35)	23
RTP+LOCAL	38.00	(25.29, 50.71)	3
QTP+RTP+LOCAL	19.22	(11.81, 26.63)	9

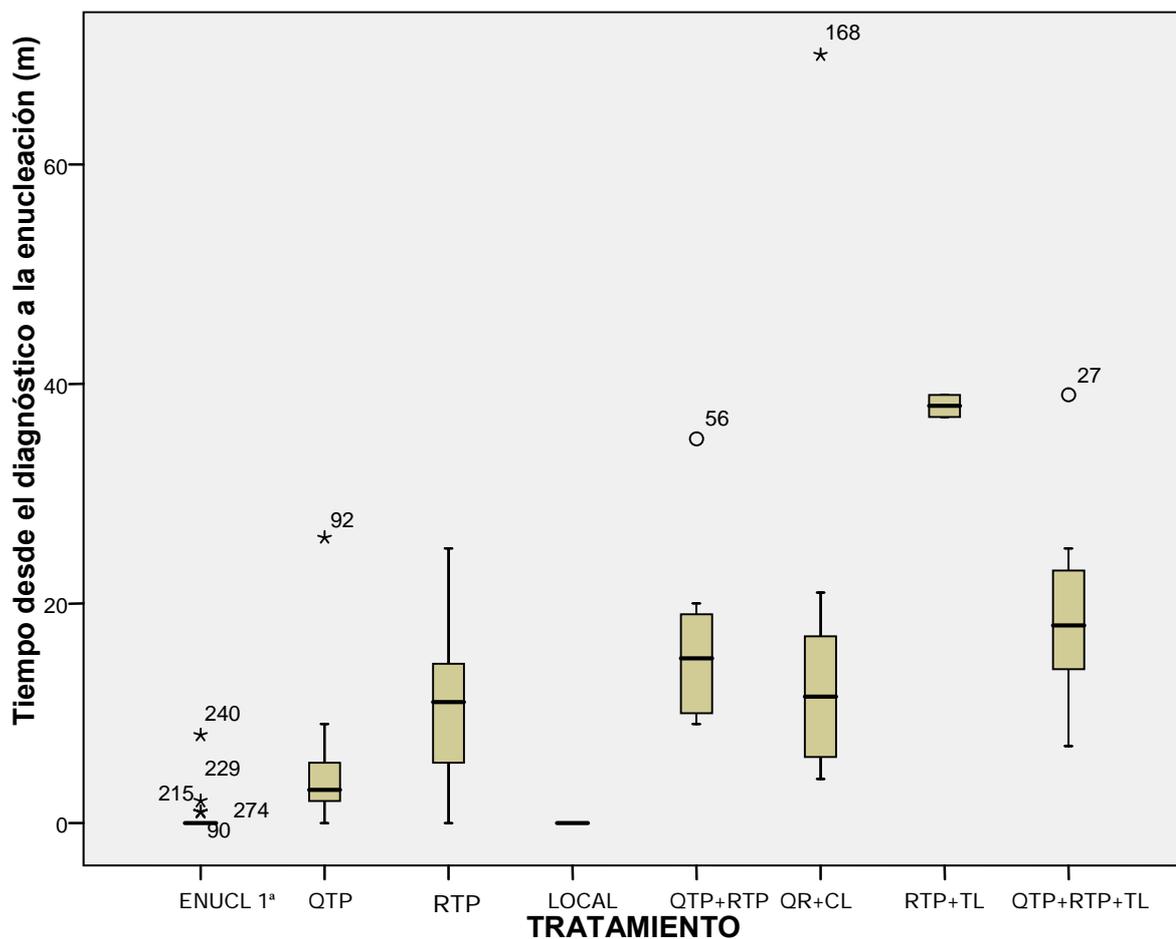


Gráfico 42. Diagrama de cajas del periodo libre de enucleación de los globos oculares que fueron enucleados según el tratamiento al que fueron sometidos.

4.10. ANÁLISIS DEL TIEMPO DE SEGUIMIENTO, LIBRE DE ENUCLEACIÓN, SEGÚN EL TRATAMIENTO RECIBIDO.

En la evaluación del periodo libre de enucleación de los pacientes según el tratamiento que reciben, dicho de otro modo, el tiempo que transcurre entre el diagnóstico de la enfermedad y la enucleación según el tratamiento que reciben los pacientes, está representado con la siguiente curva de supervivencia, donde se considera evento a la enucleación y censura la fecha de la última revisión. El análisis se lleva a cabo valorando los globos oculares, no los pacientes.

Tabla 60. Distribución de los casos según el tratamiento recibido.

TRATAMIENTO	Nº total	Nº de eventos	Censurado	
			Nº	Porcentaje
ENUCL 1ª	66	66	0	,0%
QYP	42	34	8	19,0%
RTP	13	7	6	46,2%
LOCAL	17	0	17	94,1%
QT+RT	24	9	15	62,5%
QT+LOCAL	80	23	57	71,3%
RT+LOCAL	9	2	7	77,8%
QT+RT+LOCAL	19	9	10	52,6%
Global	270	151	119	44,1%

Las pruebas de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de tratamiento mediante las pruebas de Breslow y log Rank (Mantel-Cox) demuestran una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la conservación del globo ocular de los distintos grupos ($p < 0,001$).

Un caso especial es un paciente que recibe enucleación primaria ocho meses tras el diagnóstico inicial, que había sido mantenido en observación en otro centro, porque se había hecho un diagnóstico de presunción que resultó erróneo.

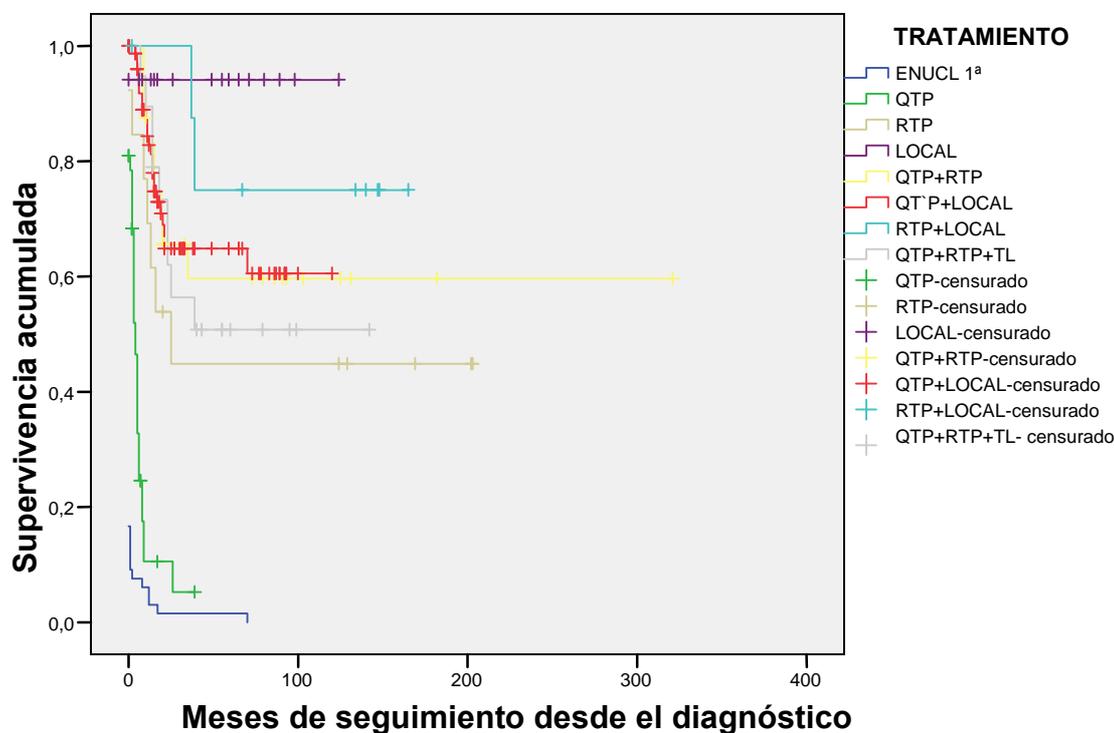


Gráfico 43. Curva de supervivencia en la que se considera evento la enucleación y censura el momento de la última revisión.

4.11. RELACION ENTRE EL DESPRENDIMIENTO DE RETINA Y LA ENUCLEACION.

Codificamos la variable desprendimiento de retina en tres categorías según el desprendimiento se presente en el momento del diagnóstico, de forma diferida, una vez iniciado el tratamiento, o no se presente.

La proporción de enucleaciones es de 79,56%, 53,33% y 31,25% respectivamente. La diferencia de estos datos es estadísticamente significativa. (Chi-cuadrado de Pearson, $p < 0.001$)

El riesgo relativo (RR) de enucleación de los pacientes que presentan DR en el momento del diagnóstico es de 2.52 respecto a los que nunca lo presentan.

El RR de enucleación de los pacientes que presentan el DR una vez iniciado el tratamiento respecto de los que nunca lo presentan es de 1.706.

Tabla 61. Distribución de los pacientes según la presencia de desprendimiento de retina y la enucleación.

		ENUCLEACION		TOTAL
		NO	SI	
DR	NO	88	40	128
	AL DCO	28	109	137
	POSTDCO	7	8	15
Total		123	157	280

Chi cuadrado de Pearson, $p < 0.001$

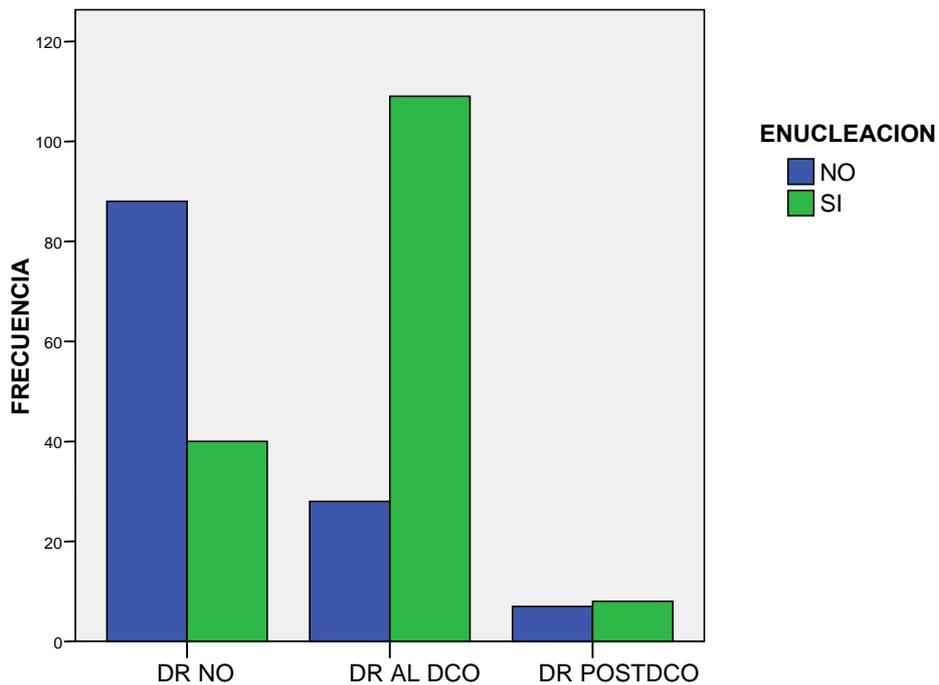


Gráfico 44. Distribución de los pacientes según la presencia de desprendimiento de retina y la enucleación.

4.12. PRONOSTICO VISUAL SEGÚN EL TRATAMIENTO RECIBIDO.

Analizamos el pronóstico de los pacientes según el grupo de tratamiento al que pertenecen, pero no valoramos la conservación del órgano visual, sino su funcionalidad. Como se ha señalado en el apartado del estudio descriptivo es difícil la cuantificación de la capacidad visual de estos pacientes, así como hacerlas comparables entre sí.

Se ha podido cuantificar la agudeza visual tras el tratamiento en un total de 82 pacientes (29,1% de nuestra serie). Categorizamos la agudeza visual en tres grupos, <0,1, 0.1-0.5 y 0.5-1. Un cuarto grupo corresponde a los pacientes que, conservando el órgano visual, no son colaboradores para medir la capacidad visual de forma objetiva. La distribución de los casos se representa en la siguiente tabla:

Tabla 62. Distribución de los casos según el tratamiento recibido y la agudeza visual final.

		AV FINAL			TOTAL
		>0,1	0,1-0,5	0,5-1	
TRATAMIENTO	QYP	0	0	3	3
	RTP	3	3	1	7
	LOCAL	1	0	10	11
	QT+RT	3	8	3	14
	QT+LOCAL	8	6	15	29
	RT+LOCAL	3	2	2	7
	QT+RT+LOCAL	7	3	1	11
Total		25	22	35	82

Prueba exacta de Fisher $p < 0.001$.

Las diferencias entre los distintos grupos son estadísticamente significativas (Prueba exacta de Fisher $p < 0.001$). Destaca el hecho de que la mayor proporción de pacientes con buena AV se encuentran en el grupo que ha recibido tratamiento local con o sin QTP asociada, así como que los pacientes que en su plan terapéutico han recibido radioterapia externa y conservan el globo ocular son los que peor pronóstico funcional presentan.

4.13. RELACION ENTRE LA EDAD DE DIAGNOSTICO Y LA BILATERALIZACION TARDIA.

Los pacientes que presentan afectación bilateral en algunos casos son bilaterales ya en el momento del diagnostico y en otros casos la bilateralización se produce una vez conocida la enfermedad del primer ojo, a éstos últimos los denominamos pacientes con bilateralización tardía.

Del total de nuestra serie, 59 pacientes tienen una afectación bilateral, de los que 40 son bilaterales en el momento del diagnostico y 19 se bilateralizan de forma tardía.

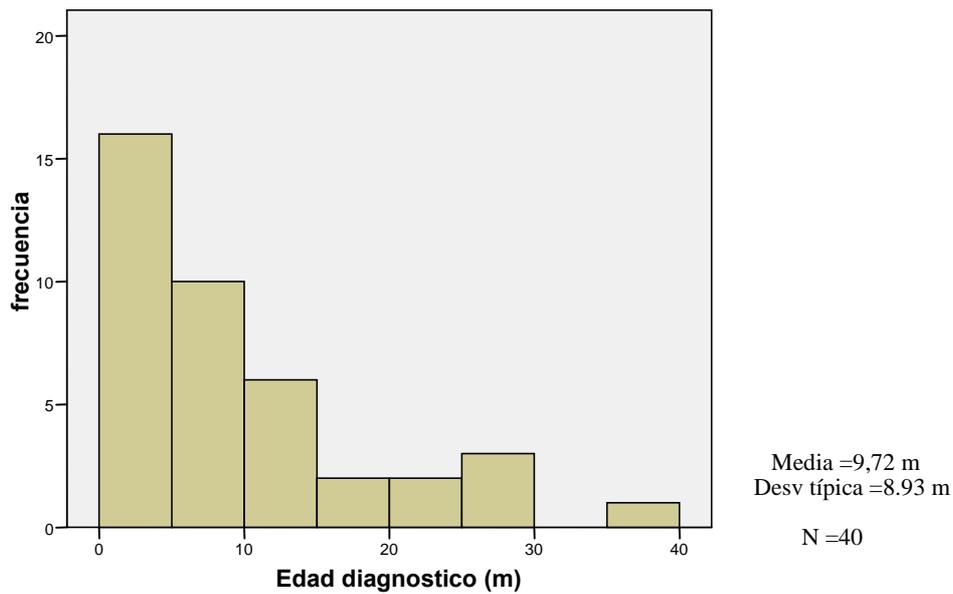


Gráfico 45. Edad de diagnóstico de retinoblastoma de los pacientes con enfermedad bilateral en el momento del diagnóstico.

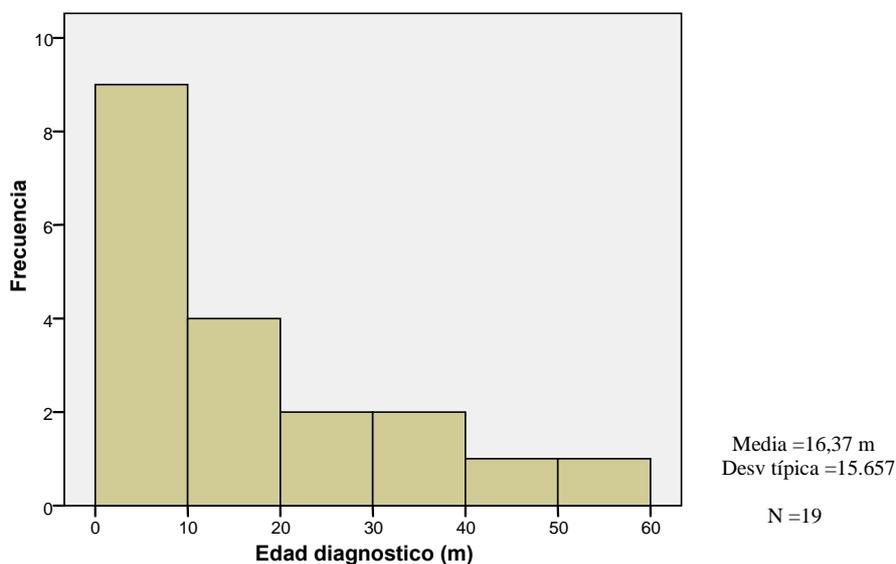


Gráfico 46. Edad de diagnóstico de retinoblastoma de los pacientes que desarrollan bilateralización tardía.

Al comparar los datos descriptivos de la edad al diagnóstico entre los pacientes que bilateralizan precozmente y los que lo hacen de forma tardía encontramos que las medias son muy dispares, 9.72 meses (desv. Standard 8.93) en el primer grupo y 16.37 meses (desv. Standard 15.65) en el segundo grupo, sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas. (Prueba U-Mann Whitney, $p=0.169$)

El valor de la mediana es de 6,5 meses para los casos bilaterales en el diagnóstico y de 11 meses para los que presentan bilateralización tardía. Dada la distribución de los casos, que no tiene las características de una curva normal, éste parámetro es más representativo de lo que queremos medir que el valor de la media de edad en ambos grupos.

En el diagrama de cajas, que se representa a continuación, se hace mas evidente la diferencia de dispersión de los datos así como del valor de la mediana.

Los pacientes que bilateralizan de forma tardía son más frecuentemente diagnosticados a edades más avanzadas. Aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.

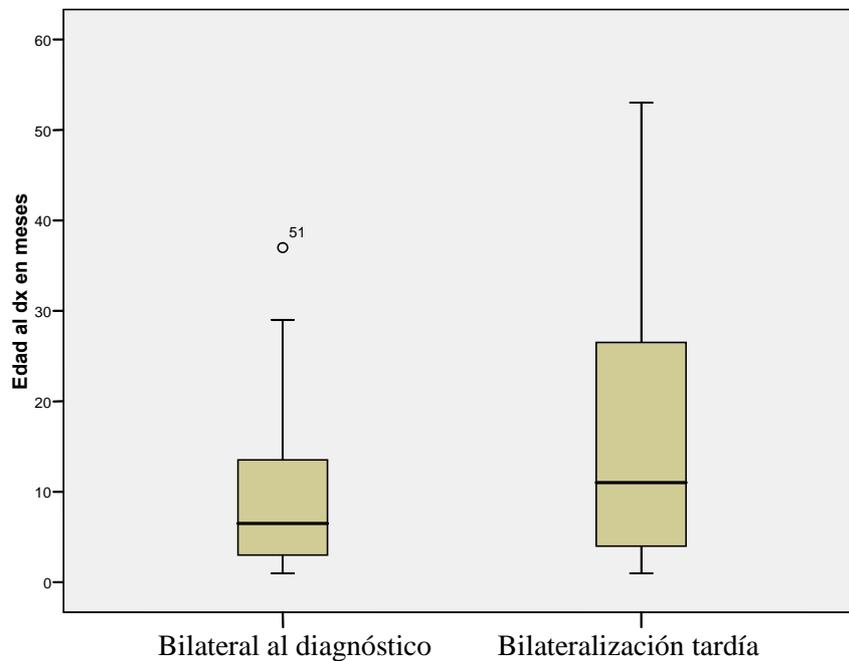


Gráfico 47. Diagrama de barras de la edad de diagnóstico de retinoblastoma según la bilateralización esté presente en el diagnóstico o sea tardía.

Podemos analizar el comportamiento de la variable edad de diagnóstico al categorizarla, ya que de éste modo se disminuye el efecto de la dispersión de los datos sobre la posibilidad de encontrar resultados significativos.

En este caso las diferencias encontradas tampoco son estadísticamente significativas (Prueba exacta de Fisher $p=0.32$), sin embargo, parece haber una tendencia, que cuando el diagnóstico es tardío, mayores de dos años, también es más frecuente la bilateralización tardía. Así como que cuando el diagnóstico se hace antes de los 6 meses de edad lo más probable es que la enfermedad que vaya a tener un curso bilateral ya se manifieste de esa forma.

Tabla 63. Distribución de los pacientes según la edad de diagnóstico y la bilateralización, al diagnóstico o tardía.

Edad diagnóstico	BL al dco	BL tardía	Total
<6meses	20	7	27
6 m-12 m	9	4	13
12-24 m	7	2	9
>24 m	4	6	10
Total	40	19	59

Prueba exacta de Fisher p=0.32.

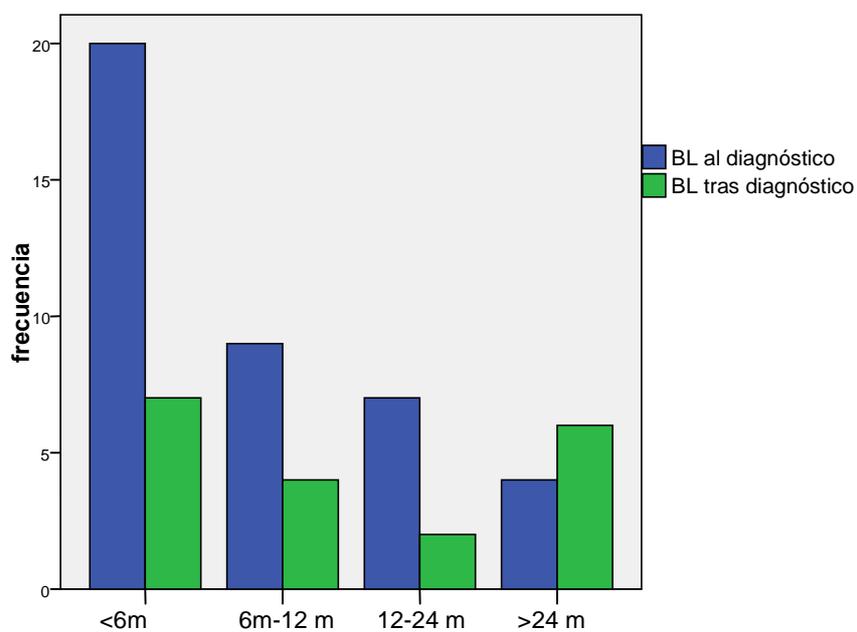


Gráfico 48. Distribución de los pacientes según la edad de diagnóstico y el tipo de bilateralización.

4.14. ESTUDIO DESCRIPTIVO Y ANALITICO DE LOS PACIENTES CON ESTUDIO GENÉTICO. SENSIBILIDAD DEL ANÁLISIS GENÉTICO.

4.14.1. Lateralidad del proceso.

Del total de los pacientes a los que se les ha realizado el estudio genético, 115 pacientes, en 57 casos se ha identificado la mutación en la línea germinal, lo que constituye el 49,56% de los pacientes a los que se les ha aplicado.

Tabla 64. Identificación de la mutación genética y lateralidad de la enfermedad.

		MUTACION GENETICA IDENTIFICADA		Total
		NO	SI	
Lateralidad	Unilateral	40	15	55
	Bilateral	18	42	60
Total		58	57	115

En el caso de los pacientes con enfermedad bilateral, la sensibilidad del test es del 70%, y asumimos que el 30% restante son falsos negativos. En los casos unilaterales la mutación es identificada en un 27,27% de los casos. Todos ellos son casos que pueden transmitir potencialmente la mutación a su descendencia.

Si estratificamos según si los pacientes presentan antecedentes familiares de enfermedad o no, obtenemos la siguiente tabla:

Tabla 65. Identificación de la mutación genética y lateralidad según la presencia o no de antecedentes familiares de enfermedad.

AAFF			MUTACION GENETICA IDENTIFICADA		Total
			NO	SI	
no	lateralidad	unilateral	38	12	50
		bilateral	16	32	48
	Total		54	44	98
si	lateralidad	unilateral	2	3	5
		bilateral	2	10	12
	Total		4	13	17

Si suponemos que todos los pacientes con afectación bilateral son portadores de la mutación germinal, lo que es biológicamente plausible, la sensibilidad del análisis genético en nuestra serie es de un 70%.

De los pacientes con antecedentes familiares de enfermedad la mutación se identifica (se confirma) en un 76,47%, dato que es equivalente a la sensibilidad de la prueba en casos con antecedentes familiares conocidos.

En los pacientes sin antecedentes familiares de enfermedad la alteración genética de la línea germinal se identifica en un 44,89% de los casos.

Del mismo modo, los pacientes con enfermedad unilateral y sin antecedentes familiares conocidos, que sería clínicamente los que más características clínicas cumplen para ser considerados esporádicos, la mutación se identifica en un 24% de los casos. Son pacientes que presentan la mutación de novo, pero su descendencia es susceptible de heredar la alteración genética predisponerte para retinoblastoma.

4.14.2. Tipo de mutación. Análisis Descriptivo.

La mutación en la línea germinal se ha determinado en un total de 57 pacientes, la frecuencia de cada tipo de alteración se describe en la siguiente tabla:

Tabla 66. Frecuencia de cada una de las alteraciones genéticas identificadas.

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	No identificado	58	50,4
	NONSENSE	12	10,4
	MISSENSE	4	3,5
	FRAMESHIFT	17	14,8
	SPLICE	12	10,4
	DELECCION	12	10,4
	Total	115	100,0

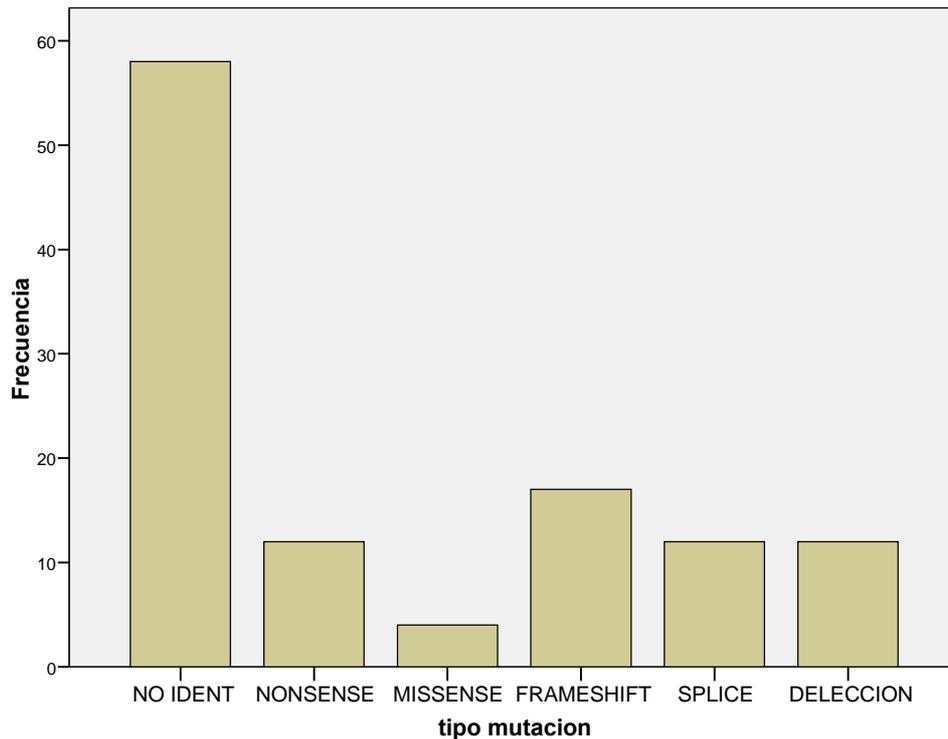


Gráfico 49. Frecuencia de cada una de las alteraciones genéticas identificadas.

4.14.3. Correlación entre el Tipo de Mutación y Enucleación.

Analizamos las diferencias en el riesgo de enucleación según el tipo de alteración genética identificada, y para aumentar la potencia del estudio categorizamos las mutaciones en tres grupos, aun así no hay diferencias estadísticamente significativas (Chi-cuadrado de Pearson $p=0,074$).

Tabla 67. Distribución de los casos según el tipo de mutación categorizada y enucleación.

		ENUCLEACIÓN		Total
		NO	SI	
Tipo Mutación	Missense+splice	11	16	27
	nonsense-frameshift	34	19	53
	delección	8	11	19
Total		53	46	99

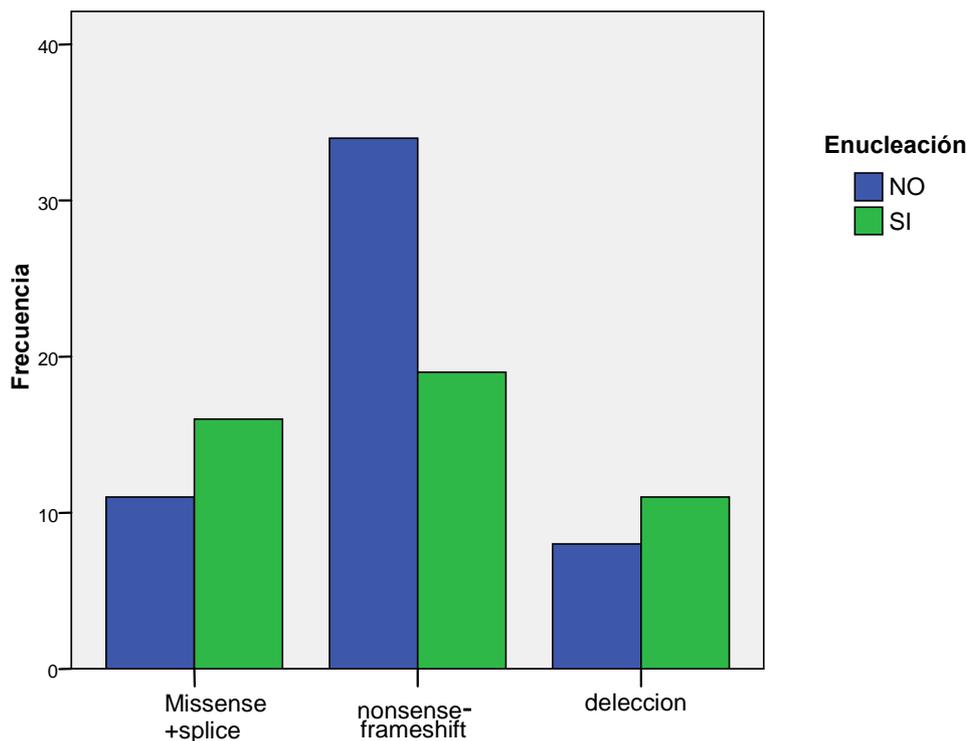


Gráfico 50. Distribución de los casos según el tipo de mutación categorizada y enucleación.

En 5 pacientes de la serie se ha realizado una enucleación bilateral, todos ellos tienen estudio genético con una alteración identificada. Ninguno de ellos presentaba antecedentes familiares de enfermedad. En la siguiente tabla se expone el tipo de mutación que presentaban así como si habían recibido pauta de quimioterapia previamente a la enucleación:

Tabla 68. Distribución de los pacientes con enucleación bilateral según el tipo de mutación identificada y si recibieron quimioterapia sistémica.

MUT	QTP SI	QTPNO
Delección	2	
Missense	1	
Splice		1
No identificada		1

4.14.4. Correlación entre el tipo de Alteración Genética Identificada y la presencia de Antecedentes Familiares conocidos.

En cuanto al análisis según los antecedentes familiares, si se encuentran diferencias, dado que ninguno de los pacientes en los que se ha detectado delección en nuestra serie, presentaba antecedentes familiares conocidos (estadístico exacto de Fisher $p=0,039$). Además de que la mayor parte de los que tienen antecedentes familiares conocidos presentan alteraciones del tipo nonsense-frameshift.

Tabla 69. Distribución de los pacientes según el tipo de mutación categorizado y la presencia de antecedentes familiares.

		AAFF		Total
		NO	SI	
Tipo mutación	Missense+splice	13	3	16
	nonsense-frameshift	19	10	29
	delección	12	0	12
Total		44	13	57

Estadístico exacto de Fisher $p=0,039$.

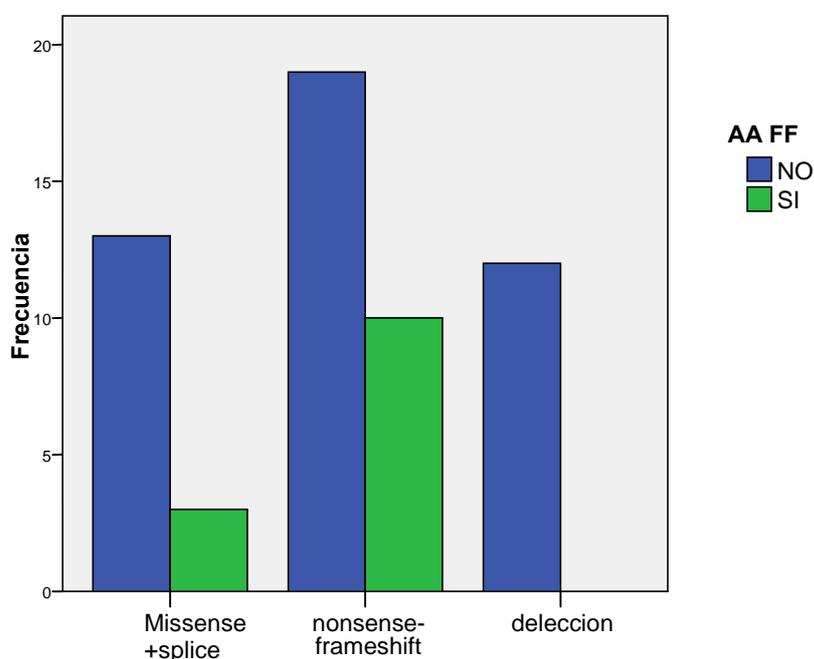


Gráfico 51. Distribución de los pacientes según el tipo de mutación categorizado y la presencia de antecedentes familiares.

4.14.5. Relación entre el Tipo de Mutación Identificada y Lateralidad.

No se encuentra diferencias entre el tipo de mutación y la lateralidad, aunque aparentemente la mutación tipo nonsense-frameshift es más frecuente entre los casos bilaterales y las deleciones en los unilaterales (Chi-cuadrado de Pearson $p=0.236$).

Tabla 70. Tipo de mutación identificada y lateralidad del proceso.

		Lateralidad		
		Unilateral	Bilateral	Total
Tipo alteración identificada	Missense+splice	5	11	16
	Nonsense-Frameshift	5	24	29
	Delección	5	7	12
Total		15	42	57

Chi-cuadrado Pearson $p=0,236$.

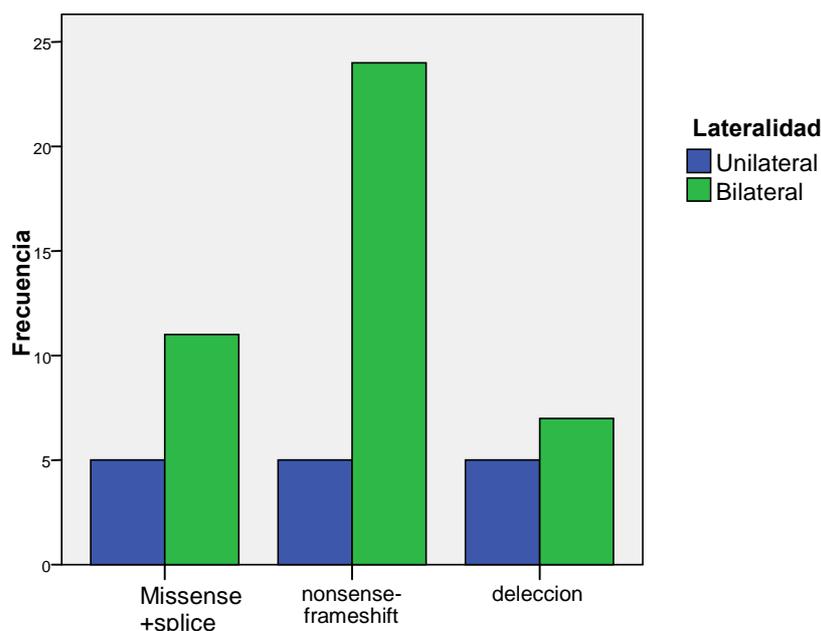


Gráfico 52. Tipo de mutación identificada y lateralidad del proceso.

Al valorar de forma independiente los casos de afectación bilateral, analizamos los pacientes según presenten la bilateralización en el momento del diagnóstico o lo hagan de forma tardía, en función de que se halla identificado la alteración genética o no, y resulta haber diferencias estadísticamente significativas (Chi-cuadrado $p=0.049$), la cálculo de la OR es de 3.257 (IC 95% 10.868-0.977), por lo tanto, cuando se

identifica la mutación en sangre periférica de un caso bilateral es 3.257 más probable que el caso sea bilateral ya lo sea desde el momento del diagnóstico.

Tabla 71. Relación entre el momento de la bilateralización y mutación identificada en sangre periférica.

		BILATERALIZACION		Total
		Bilateral al diagnóstico	Bilateralización tardía	
MUTACION GENETICA IDENTIFICADA	NO	9	8	17
	SI	33	9	42
Total		42	17	59

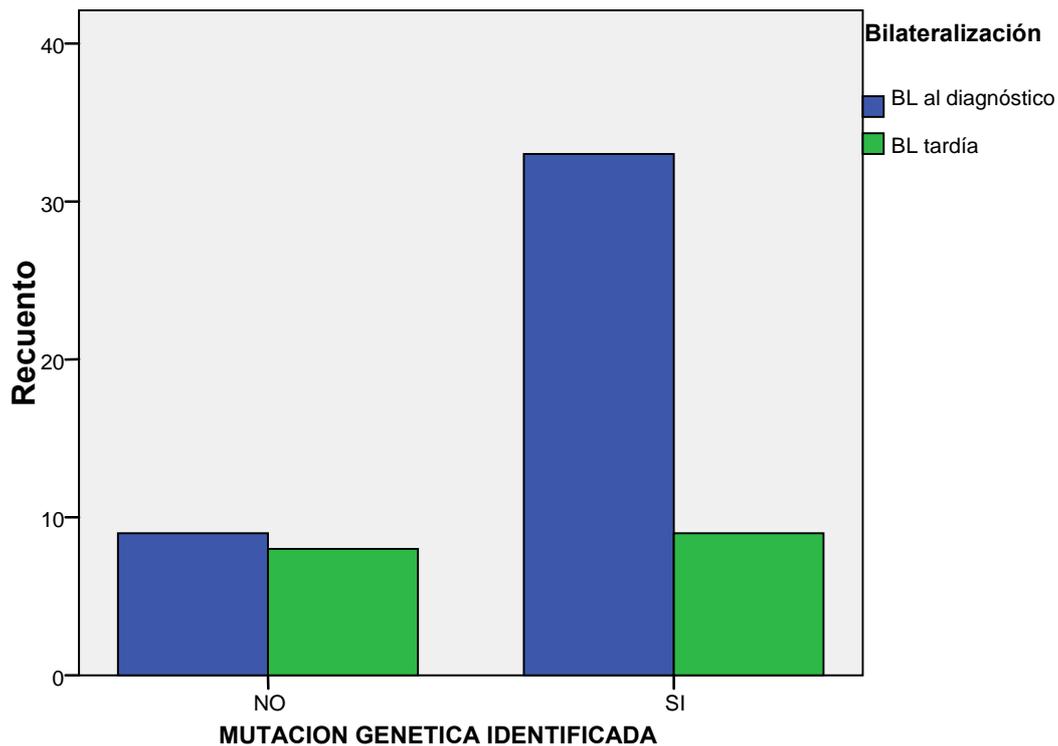


Gráfico 53. Representación de la relación entre el momento de la bilateralización y mutación identificada en sangre periférica.

Sin embargo, en el análisis pormenorizado del tipo de alteración genética identificada en sangre periférica, y a pesar de que los datos groseros son muy

llamativos, la diferencia apreciada no resulta ser estadísticamente significativa (Chi-cuadrado de Pearson $p=0.617$).

Tabla 72. Relación entre el momento de la bilateralización y la alteración genética identificada en sangre periférica.

		Bilateralización		Total
		Bilateralización al diagnóstico	Bilateralización tardía	
Alteración genética identificada	Missense-splice	7	4	11
	Nonsense-frameshift	19	5	24
	Delección	5	2	7
Total		31	11	42

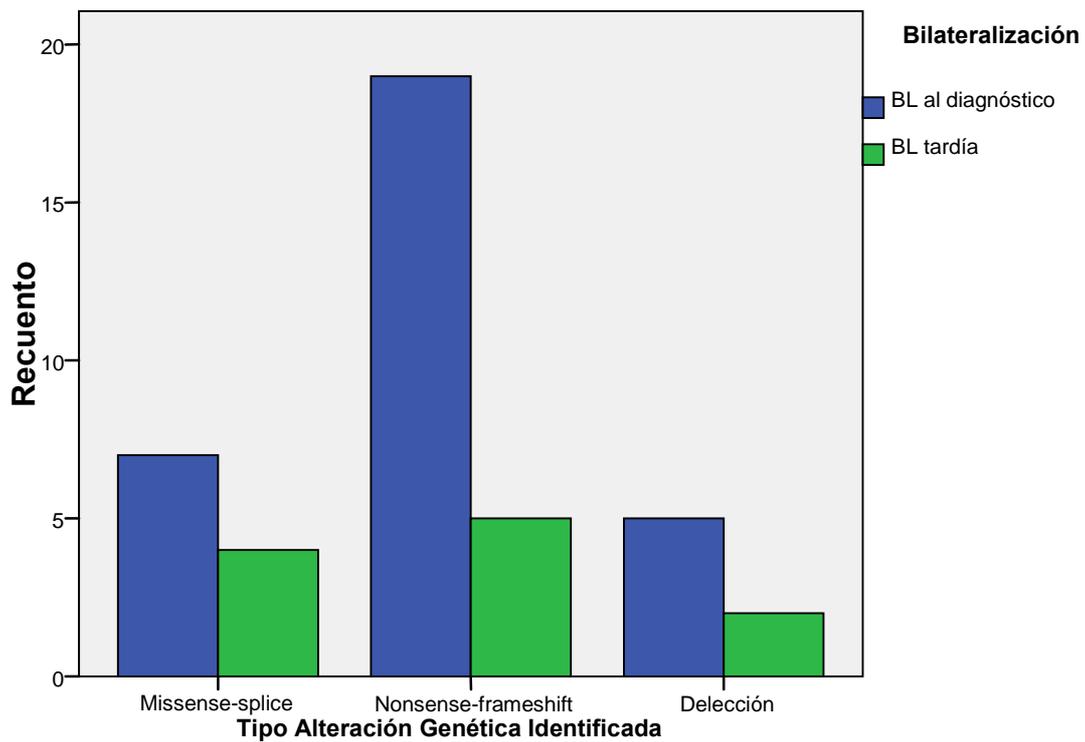


Gráfico 54. Relación entre el momento de la bilateralización y la alteración genética identificada en sangre periférica.

4.14.6. Relación entre el Tipo de Mutación Identificada y la Supervivencia del globo ocular.

Teniendo en cuenta los distintos periodos de seguimiento que ha tenido cada uno de los pacientes, y considerando como evento la enucleación, construimos una tabla estratificada según el tipo de mutación identificada. Desde dichos datos podemos construir las correspondientes curvas de supervivencia de acuerdo al método descrito por Kaplan- Meier. El análisis de la distribución de dichas curvas de supervivencia mediante la prueba de Log Rank (Mantel-Cox) muestra una distribución significativamente diferente para un valor de $p=0.056$.

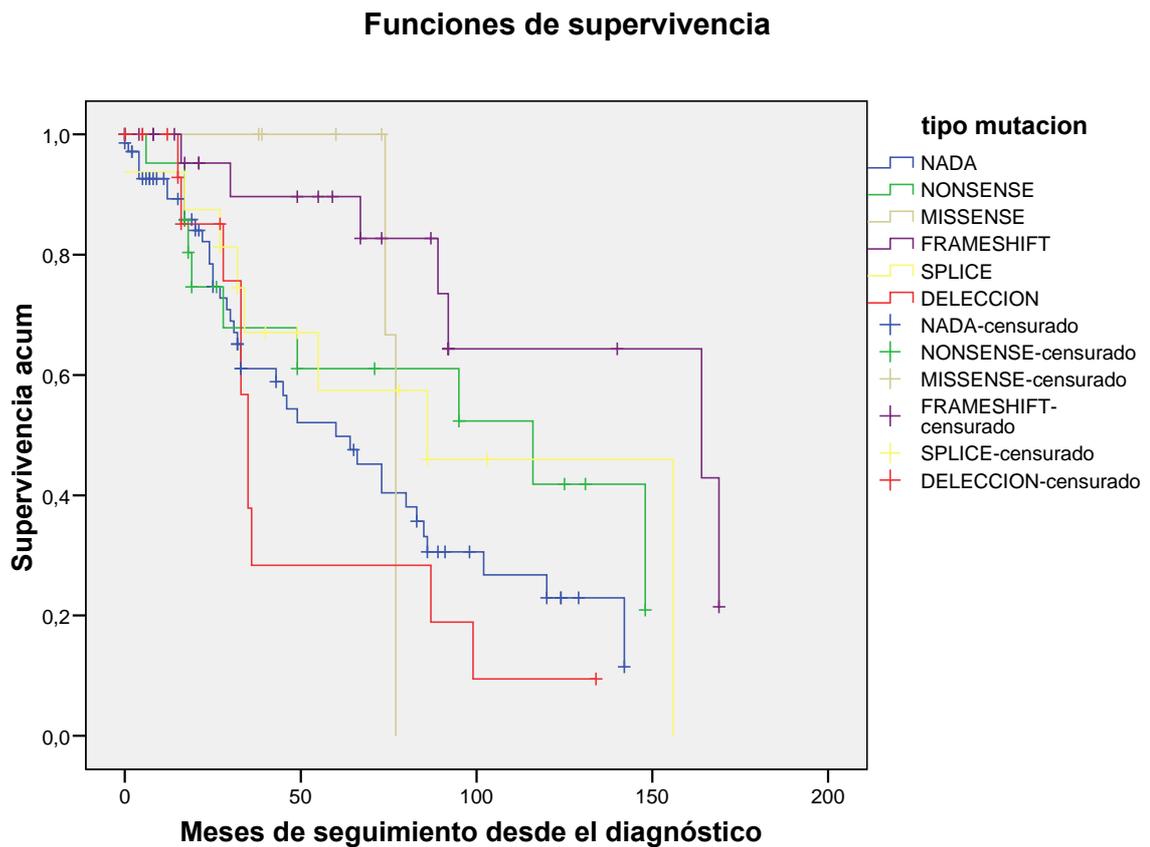


Gráfico 55. Distribución y seguimiento de los pacientes según la mutación genética identificada. Valoración de la conservación del globo ocular.

Tabla 73. Datos de la curva de supervivencia.

TIPO ALTERACION GENETICA	Nº total	Nº de eventos	Censurado	
	Nº	Porcentaje	Nº	Porcentaje
NO IDENTIF	70	38	32	45,7%
NONSENSE	22	10	12	54,5%
MISSENSE	7	3	4	57,1%
FRAMESHIFT	28	7	21	75,0%
SPLICE	16	9	7	43,8%
DELECCION	18	10	8	44,4%
Global	161	77	84	52,2%

Para homogeneizar el análisis con los realizados previamente, calculamos también la curva de supervivencia reagrupando los distintos tipos de alteraciones genéticas identificadas:

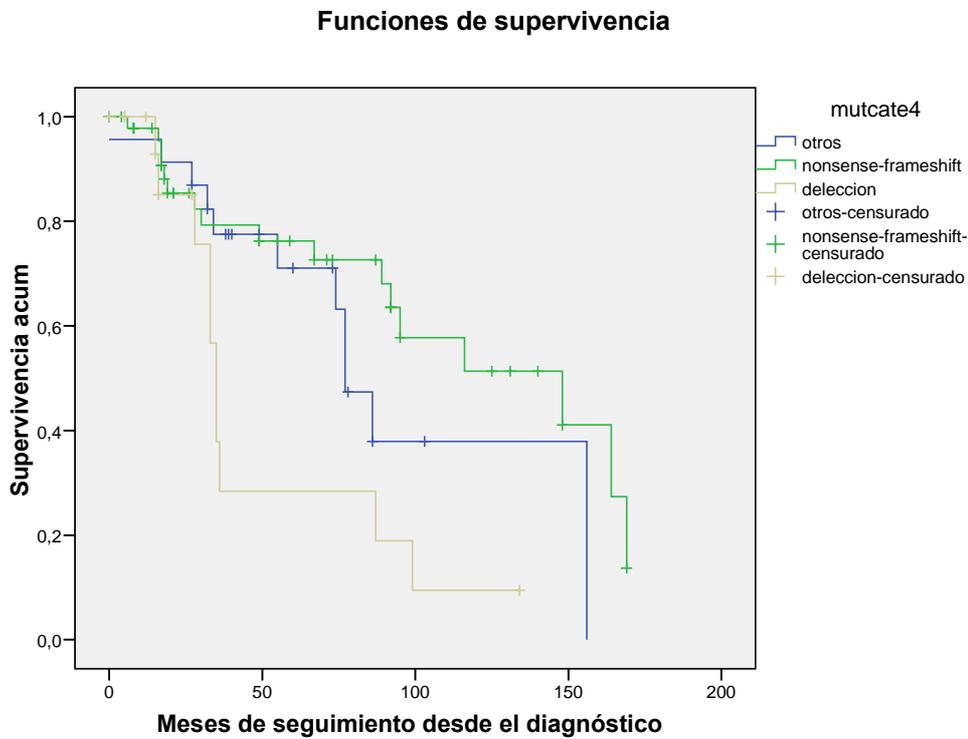
Tabla 74. Datos de la Curva de Supervivencia, considerando las alteraciones genéticas identificadas categorizadas.

TIPO ALTERACION GENETICA	Nº total	Nº de eventos	Censurado	
			Nº	Porcentaje
MISSENSE-SPLICE	23	12	11	47,8%
NONSENSE-FRAMESHIFT	50	17	33	66,0%
DELECCION	18	10	8	44,4%
Global	91	39	52	57,1%

Tabla 75. Estudio descriptivo del periodo de seguimiento de los globos oculares según la alteración genética identificada categorizada.

	Media(a)				Mediana			
	Estim	Error típico	IC 95%		Estim	Error típico	IC 95%	
			Lím. inf.	Lím sup.			Lím inf.	Lím sup.
MISSENSE-SPLICE	93,866	13,767	66,884	120,849	77,000	6,213	64,822	89,178
NONSENSE-FRAMESHIFT	113,087	10,948	91,628	134,546	148,000	39,736	70,117	225,883
DELECCION	51,489	11,142	29,652	73,327	35,000	1,559	31,944	38,056
Global	96,217	7,787	80,955	111,479	92,000	6,609	79,046	104,954

Gráfico 56. Curva de Supervivencia del globo ocular según el tipo de alteración genética identificada (categorizada).



El valor de log rank (Mantel y Cox) para esta distribución es de 9.147 (p=0.010).

4.14.7. Localización de la Alteración Genética Identificada.

Realizamos un análisis descriptivo de la localización dentro del gen RB de las alteraciones genéticas, diferenciando entre intrones y exones, primero de forma grosera y a continuación detallada:

Tabla 76. Localización de la alteración genética identificada.

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	0	64	55,7
	intrón	11	9,6
	exon	40	34,8
	Total	115	100,0

Tabla 77. Identificación del exón o intrón afectado en cada una de las alteraciones identificadas.

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	No identif	64	55,7
	Ex 01	7	6,1
	Ex 02	1	,9
	Ex 05/Ex 7	1	,9
	Ex 06	1	,9
	Ex 08	4	3,5
	Ex 08/In 8	1	,9
	Ex 09	1	,9
	Ex 10	3	2,6
	Ex 11	3	2,6
	Ex 12	1	,9
	Ex 14	2	1,7
	Ex 15	3	2,6
	Ex 16	2	1,7
	Ex 17	1	,9
	Ex 18	2	1,7
	Ex 19	2	1,7
	Ex 21	1	,9
	Ex 22	1	,9
	Ex 23	2	1,7
	Ex 25	1	,9
	In 02	1	,9
	In 06	2	1,7
	In 07	1	,9
	In 12	1	,9
	In 14	2	1,7
	In 16	1	,9
	In 18	1	,9
In 24	2	1,7	
Total	115	100,0	

A continuación observamos la distribución de la localización de la mutación separando los pacientes según tengan antecedentes familiares o no, estos últimos serían los pacientes que presentan la mutación en la línea germinal “de novo”. En la distribución observamos diferencias que son estadísticamente significativas (test exacto de Fisher $p=0,001$).

Tabla 78. Identificación del exón o intrón afectado en cada una de las alteraciones identificadas, según la presencia de antecedentes familiares conocidos.

		ANTECEDENTES FAMILIARES		Total
		NO	SI	
LOCALIZACION	NO IDENT	60	4	64
	Ex 01	4	3	7
	Ex 02	1	0	1
	Ex 05/Ex 7	1	0	1
	Ex 06	1	0	1
	Ex 08	4	0	4
	Ex 08/In 8	1	0	1
	Ex 09	0	1	1
	Ex 10	3	0	3
	Ex 11	2	1	3
	Ex 12	1	0	1
	Ex 14	2	0	2
	Ex 15	3	0	3
	Ex 16	0	2	2
	Ex 17	1	0	1
	Ex 18	2	0	2
	Ex 19	1	1	2
	Ex 21	0	1	1
	Ex 22	1	0	1
	Ex 23	0	2	2
	Ex 25	1	0	1
	In 02	1	0	1
	In 06	1	1	2
	In 07	1	0	1
	In 12	1	0	1
	In 14	1	1	2
	In 16	1	0	1
In 18	1	0	1	
In 24	2	0	2	
Total		98	17	115

Estadístico exacto de Fisher $p=0,001$.

Para evitar el sesgo que se produce al analizar con tantos subgrupos, hacemos el análisis de los pacientes según sus antecedentes familiares, valorando si la alteración se localiza en un exón o en un intrón de manera global, y observamos que las diferencias también son estadísticamente significativas (estadístico exacto de Fisher $p=0,009$).

Tabla 79. Localización de la alteración y presencia de antecedentes familiares conocidos.

		AAFF		Total
		NO	SI	
Localización	No identif	60	4	64
	Intrón	9	2	11
	Exon	29	11	40
Total		98	17	115

Estadístico exacto de Fisher $p=0,009$.

En el diagrama de barras agrupadas se refleja la existencia de antecedentes familiares según la localización de la alteración, y a continuación la distribución de la localización de la alteración según la existencia de antecedentes familiares.

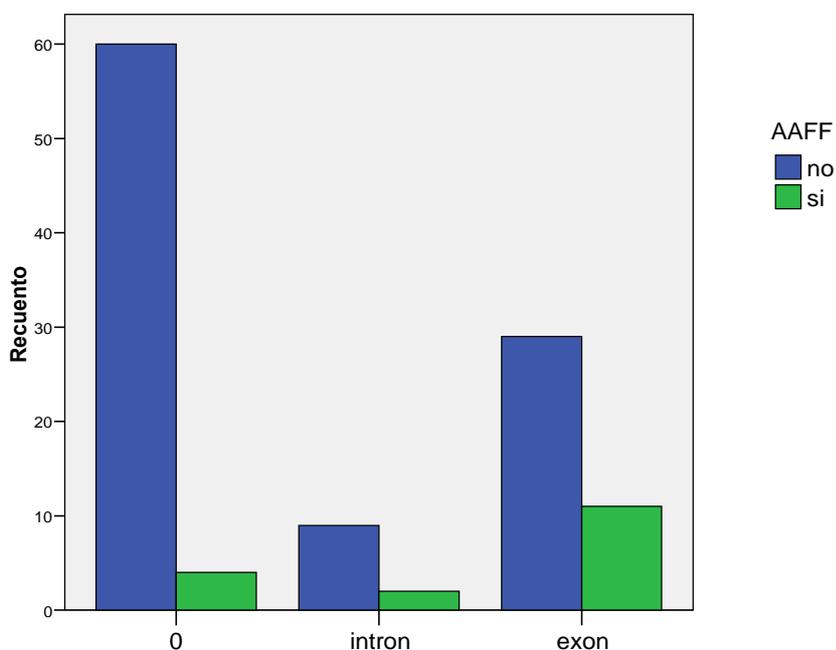


Gráfico 57. Relación entre el tipo de segmento de ADN alterado y la presencia de antecedentes familiares conocidos.

Las alteraciones localizadas en los intrones son más frecuentes en los pacientes con mutaciones germinales de novo, es decir, sin antecedentes familiares conocidos. (test exacto de Fisher, $p=0,009$). Estas alteraciones genéticas corresponden a las del tipo splicing.

4.14.8. Relación entre el Tipo de Alteración Genética Identificada y su localización en el gen RB.

La mayoría de las mutaciones que tienen lugar en los exones son del tipo nonsense-frameshift, mientras que las de los intrones son, en todos los casos, del tipo splice. Las diferencias observadas son estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

Los 5 casos en los que no aparece mutación conocida y sin embargo se localiza la lesión equivalen a los 5 casos en los que se localizó la mutación en el análisis intratumoral y no se pudo demostrar en la sangre periférica, por lo que no se trata de una alteración en la línea germinal sino una alteración genética somática.

Las deleciones son fragmentos de DNA que desaparecen, en ocasiones no se localizan en exones o intrones determinados, por eso se contabilizan en el apartado de no identificados, son fragmentos genéticos de gran tamaño, que no se corresponden con un único exón o intrón, estos casos se corresponden con “pérdida de heterocigosidad”.

A continuación se representa los resultados obtenidos en una grafica de barras agrupadas.

Tabla 80. Localización de la alteración genética dentro del gen RB.

TIPO ALTERACION GENETICA	LOCALIZACION			Total
	NO	INTRON	EXON	
NO IDENTIF	53		5	58
Total	53		5	58
MISSENSE	0	0	4	4
NONSENSE-FRAMESHIFT	0	0	29	29
SPLICE	0	11	1	12
DELECCION	11	0	1	12
Total	11	11	35	57

Estadístico exacto de Fisher $p < 0,001$.

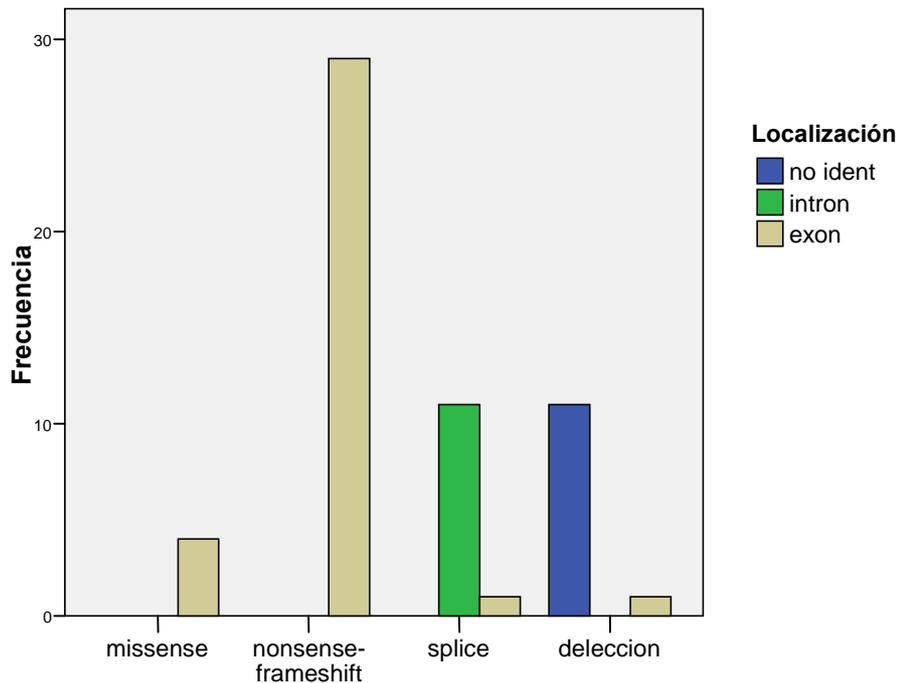


Grafico 58. Localización de la alteración genética dentro del gen RB.

4.14.9. Edad de Diagnóstico y presencia de Mutación en la Línea Germinal.

Previamente habíamos analizado el comportamiento de la edad de diagnóstico respecto al hecho de tener antecedentes familiares de retinoblastoma, encontrando diferencias significativas. Presentando unos valores de edad media en los pacientes sin y con antecedentes familiares de 19.05 y 11.53 meses y de medianas de 13.y 5 meses respectivamente.

De forma análoga podemos estudiar la relación que existe entre la edad de diagnóstico (por paciente) respecto de la identificación o no de alteraciones genéticas en la línea germinal.

Tabla 81. Estudio descriptivo de la edad de diagnóstico (por paciente) según la identificación de alteraciones genéticas en sangre periférica.

MUTACION GENETICA IDENTIFICADA	Media	N	Desv. típ.	Mediana	Mínimo	Máximo
NO	16,96	56	12,404	13,00	2	47
SI	13,40	57	15,454	9,00	1	89
Total	15,17	113	14,077	11,00	1	89

La mediana de edad para el grupo con mutación de la línea germinal es de 9 meses y la del grupo sin mutación identificada es de 13 meses. Aplicando la prueba de contraste de medias (U-Mann Whitney) se corrobora que la diferencia, estadísticamente significativa entre la media de edad de ambos grupos ($p=0.034$).

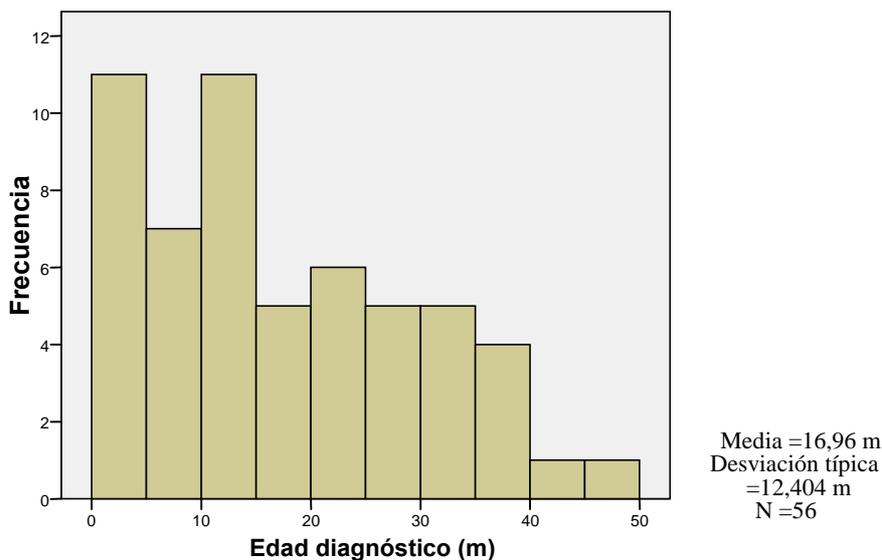


Gráfico 59. Distribución de los pacientes sin mutación genética identificada en sangre periférica según la edad de diagnóstico del retinoblastoma.

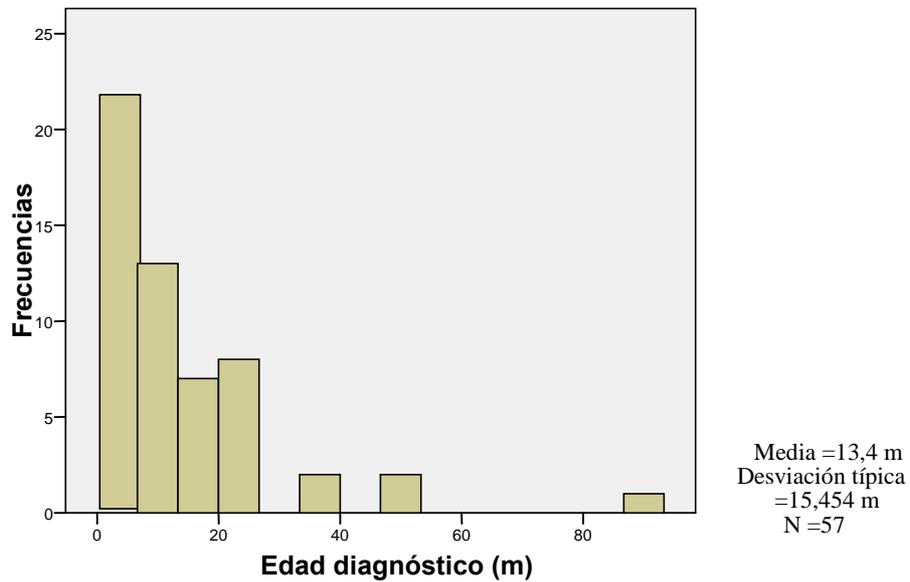


Gráfico 60. Distribución de los pacientes con mutación genética identificada en sangre periférica según la edad de diagnóstico del retinoblastoma.

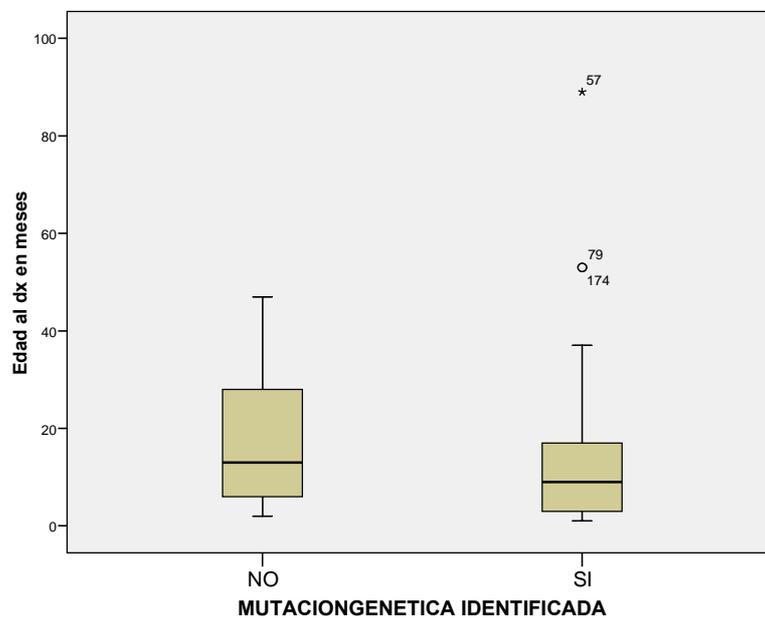


Gráfico 61. Diagrama de barras donde se puede comparar la diferencia de edad de diagnóstico de retinoblastoma según se localice o no alteración genética en la línea germinal, este es, en sangre periférica.

En cuanto a la relación entre la edad de diagnóstico y el tipo de alteración genética identificada en sangre periférica, en los casos en los que ésta ha sido identificada, no encontramos diferencias estadísticamente significativas (test exacto de Fisher $p=0.981$), su distribución sería la siguiente:

Tabla 82. Relación entre la edad de diagnóstico y tipo de alteración genética identificada en sangre periférica.

		TIPO ALTERACION IDENTIFICADA			Total
		MISSENSE-SPLICE	NONSENSE-FRAMESHIFT	DELECCION	
EDAD DE DIAGNOSTICO	<6 m	6	11	6	23
	6-12 m	3	7	3	13
	12-24 m	4	6	2	12
	>24 m	3	5	1	9
Total		16	29	12	57

Test exacto de Fisher $p=0.981$.

4.15 ESTUDIO GENÉTICO DE LOS PACIENTES QUIMIORRESISTENTES.

Consideramos pacientes no respondedores a la quimioterapia a los que habiendo recibido ese tratamiento, asociado o no a terapias de consolidación posteriormente han sido enucleados.

Para que el estudio sea más riguroso solo consideramos la presencia de mutación en la línea germinal cuando ésta ha sido identificada, no contabilizando los pacientes con afectación bilateral o con antecedentes familiares en los que no se ha identificado, aunque se biológicamente es plausible pensar que son portadores.

La valoración de este apartado se hace por ojo, no por paciente.

Las diferencias encontradas entre los dos grupos no son estadísticamente significativas (Chi-cuadrado de Pearson, $p=0,170$).

Tabla 83. Relación entre la identificación de alteración genética en la línea germinal y la enucleación.

		MUTACION IDENTIFICADA		Total
		NO	SI	NO
ENUCLEACION	NO	21	42	63
	SI	23	27	50
Total		44	69	113

Chi-cuadrado de Pearson $p=0,170$

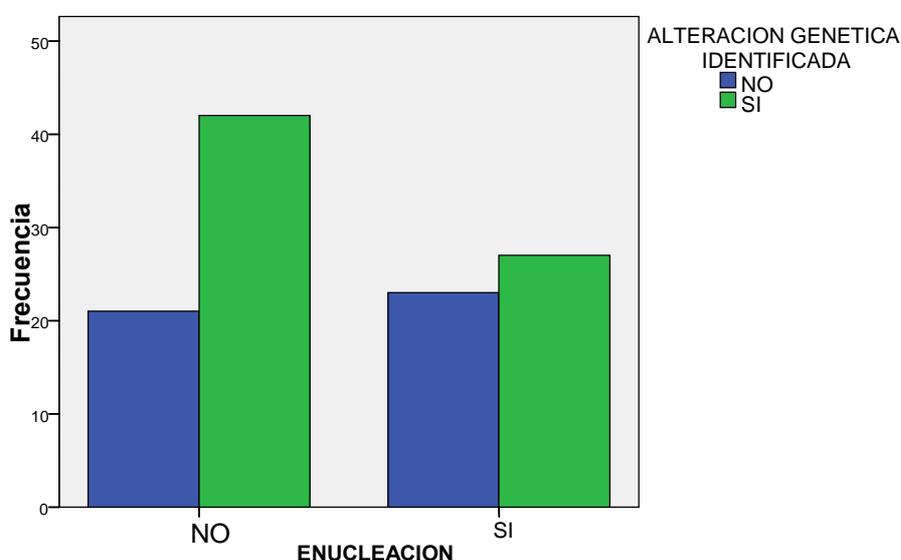


Gráfico 62. Distribución de los pacientes según presenten alteración genética en sangre periférica y hallan sido o no enucleados.

Tabla 84. Tipo y frecuencia de cada una de las alteraciones genéticas identificadas en los pacientes respondedores a la quimioterapia o quimiorresistentes, considerándose como estos últimos los que son enucleados.

		ENUCLEACION		Total
		NO	SI	no
ALTERACION GENETICA	NADA	21	23	44
	NONSENSE	10	5	15
	MISSENSE	4	4	8
	FRAMESHIFT	16	4	20
	SPLICE	6	5	11
	DELECCION	6	9	15
Total		63	50	113

Estadístico exacto de Fisher $p=0,132$ (n.s.)

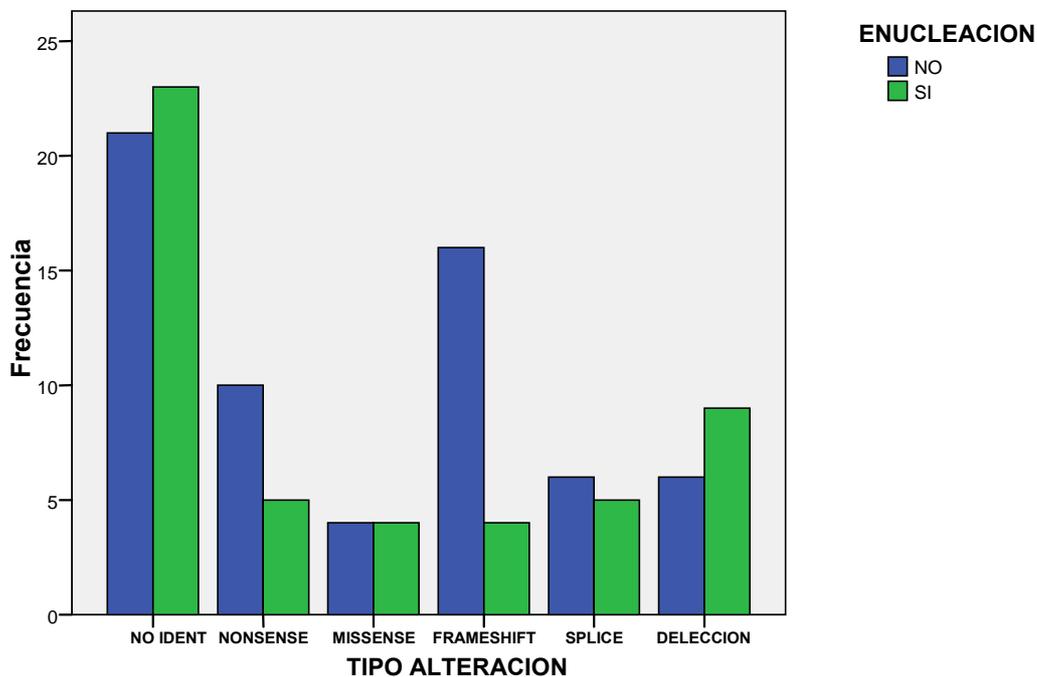


Gráfico 63. Distribución de los globos oculares según la alteración genética identificada en sangre periférica y si han sido finalmente enucleados o no.

Al estudiar el tipo de alteración genética identificada en el grupo de los enucleados y los no enucleados nos encontramos que no hay diferencias significativas (estadístico exacto de Fisher, $p=0,132$), sin embargo es llamativa la frecuencia de mutaciones del tipo nonsense y frameshift en los ojos que no precisan enucleación, así como que los pacientes en los que no se identifica la alteración o se identifica una delección, presentan mayor tasa de enucleaciones.

Si valoramos el tipo de mutación (categorizada) respecto de la enucleación resulta que, con un total de 69 ojos, es estadísticamente significativo (Chi-cuadrado de Pearson, $p=0,055$) que los pacientes con delecciones tienen un peor pronóstico en cuanto a conservación del globo ocular que los que presentan mutaciones del tipo nonsense-frameshift.

En la gráfica de barras agrupadas se comparan los distintos tipos de mutación en cada grupo de pacientes:

Tabla 85. Relación entre enucleación y tipo de alteración genética identificada recodificada.

		TIPO ALT GENETICA			Total
		OTROS	NONSENSE-FRAMESHIFT	DELECCION	
ENUCLEACION	NO	10	26	6	42
	SI	9	9	9	27
Total		19	35	15	69

Chi-cuadrado de Pearson P=0,055

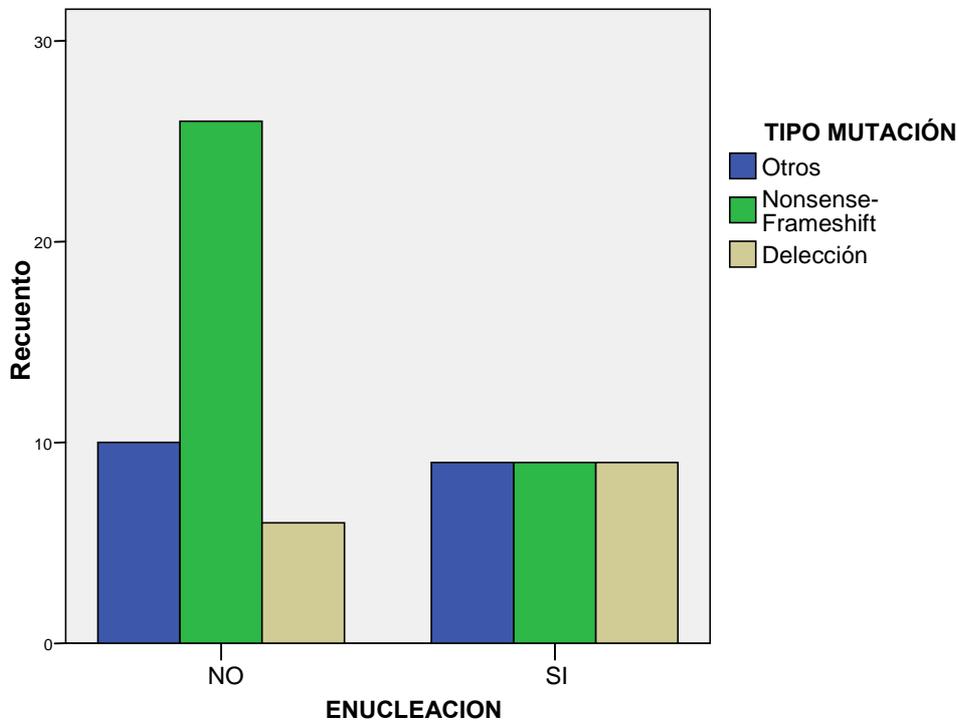


Gráfico 64. Relación entre enucleación y tipo de alteración genética identificada recodificada.

Para evitar un probable factor de confusión justificado por la presencia de casos bilaterales, identificamos cuales son las mutaciones de los pacientes con afectación bilateral, 29 pacientes (58 ojos).

Aplicamos una tabla de contingencia analizando por capas, donde la primera capa es el tratamiento con quimioterapia. Consideramos los pacientes que han recibido

quimioterapia (40 pacientes) y vemos la mutación identificada según la lateralidad de su enfermedad. La distribución de los casos se representa a continuación:

Tabla 86. Tipo de alteración genética identificada, por paciente tratado con quimioterapia sistémica, no por ojo, según la lateralidad del proceso.

		Tipo Alteración Identificada				Total
		Missense +splice	Nonsense-Frameshift	Delección		
QTP	Lateralidad	Unilateral	2	4	5	11
		Bilateral	9	15	5	29
	Total		11	19	10	40

Estadístico exacto de Fisher $p=0.161$

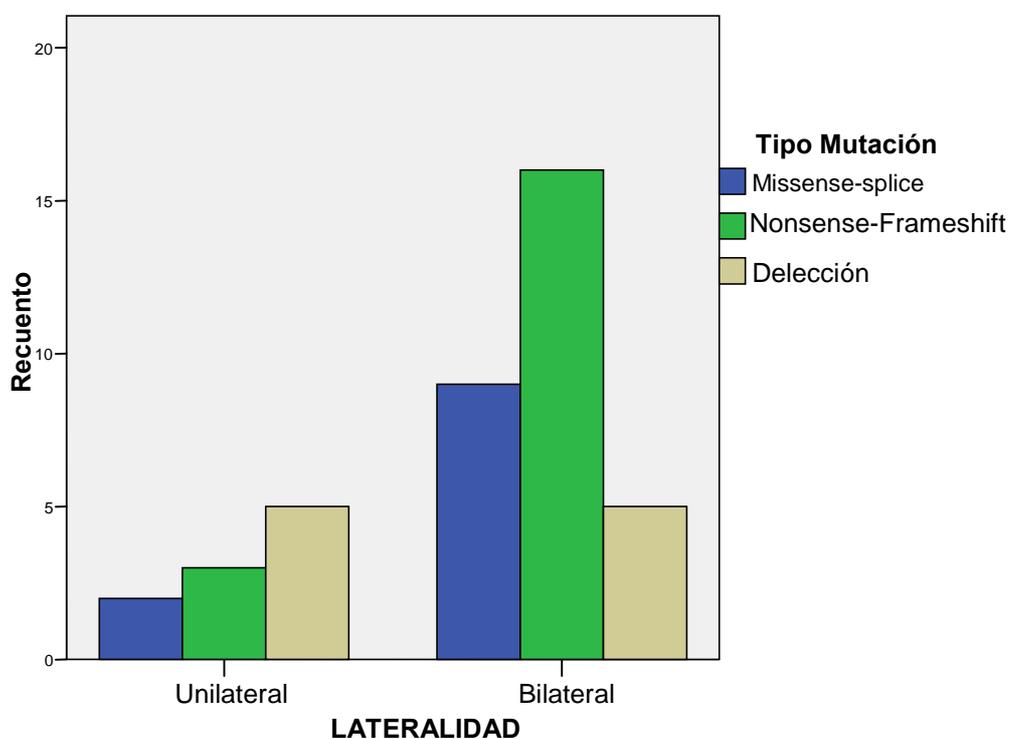


Gráfico 65. Pacientes tratados con quimioterapia sistémica, distribuidos según el tipo de alteración genética identificada y la lateralidad de su proceso. Los pacientes en los que no se ha identificado la alteración han sido excluidos.

Los resultados no tienen significación estadística (Estadístico exacto de Fisher $p=0.161$), sin embargo es muy llamativa la mayor asociación de la delección con los

casos de manifestación unilateral, que a su vez es la alteración identificada con menos frecuencia en los casos bilaterales.

Tabla 87. Datos para la descripción de la curva de supervivencia acumulada, según el tipo de mutación identificada en sangre periférica, donde se considera evento a la enucleación.

Alteración Categorizada	Nº total	Nº de eventos	Censurado	
			Nº	Porcentaje
Missense-splice	16	6	10	62,5%
Nonsense-Frameshift	34	9	25	73,5%
Delección	15	9	6	40,0%
Global	65	24	41	63,1%

Tabla 88. Estudio descriptivo de los valores de la media y la mediana de supervivencia del globo ocular según la alteración genética identificada en sangre periférica.

Alteración genética identificada	Media(a)				Mediana			
	Estim	Error típico	IC 95%		Estim	Error típico	IC 95%	
			Lím inf.	Lím sup.			Lím inf.	Lím sup.
Missense-splice	80,458	6,577	67,567	93,349	77,000	4,941	67,316	86,684
Nonsense-Frameshift	91,850	9,931	72,385	111,315	95,000	3,286	88,560	101,440
Delección	44,910	9,799	25,703	64,116	35,000	1,372	32,311	37,689
Global	79,457	6,665	66,393	92,520	87,000	8,638	70,070	103,930

Tres pacientes han sufrido enucleación bilateral, dos de ellos presentaban delecciones y uno alteración del tipo missense. Los pacientes que reciben quimioterapia y tienen mutación del tipo nonsense-frameshift son los que mejor pronóstico tienen en cuanto a conservación del globo ocular.

El análisis de supervivencia del globo ocular se representa con una curva de Kaplan-Meier, donde se considera evento a la enucleación. Las diferencias se analizan

empleando el Log Rank (Mantel-Cox) que presenta un nivel de significación de $p=0,053$.

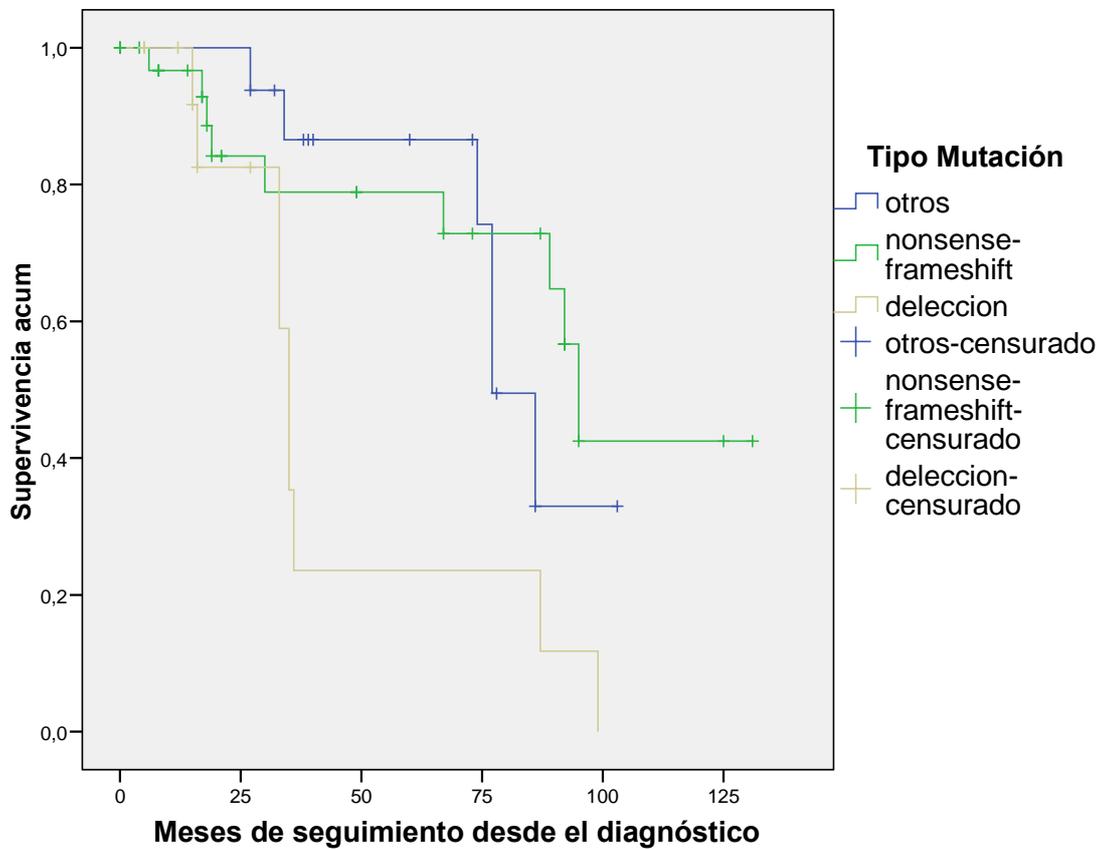


Gráfico 66. Curva de supervivencia acumulada de los globos oculares según el tipo de mutación identificada en sangre periférica. Se considera evento la enucleación.

4.16. RELACION ENTRE LA PRESENCIA DE SIEMBRAS VÍTREAS Y ALTERACION GENETICA EN LA LINEA GERMINAL.

Al igual que en el apartado anterior, consideramos portadores de mutación germinal sólo a los pacientes en los que ésta se ha identificado, excluyendo los casos bilaterales en los que no se ha identificado, a pesar de que se presupone. Metodológicamente, el análisis resulta más riguroso. La distribución de los casos valorando los globos oculares de forma independiente se describe a continuación:

Tabla 89. Distribución según la identificación de alteraciones genéticas en sangre periférica y la presencia de siembras vítreas, valorando los globos oculares de manera individualizada.

		MUTACION GENETICA IDENTIFICADA		Total
		NO	SI	NO
SIEMBRAS VITREAS	NO	48	78	126
	SI	25	19	44
Total		73	97	170

Chi-cuadrado de Pearson $p=0,031$.

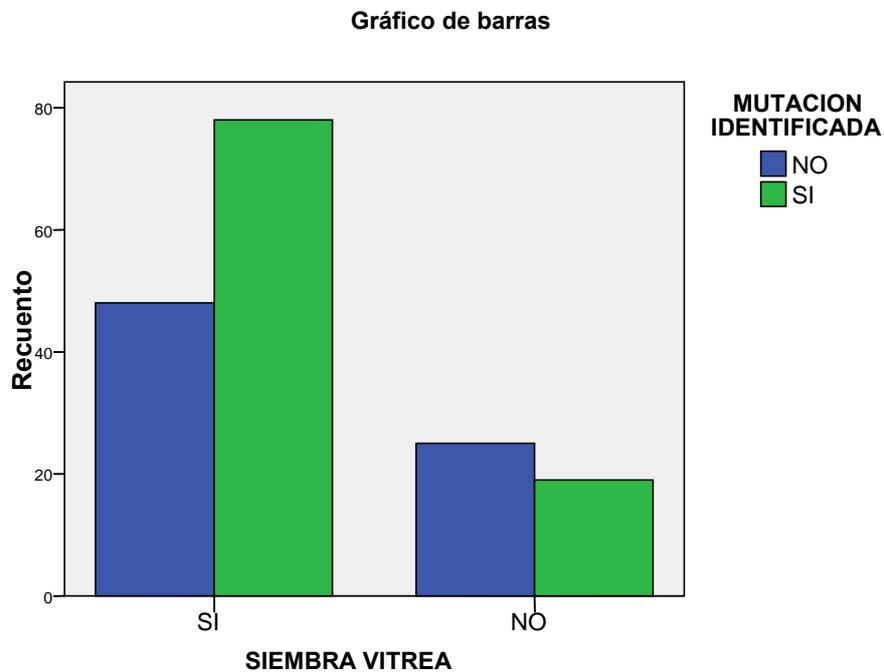


Gráfico 67. Distribución según la identificación de alteraciones genéticas en sangre periférica y la presencia de siembras vítreas, valorando los globos oculares de manera individualizada.

Resulta más frecuente la identificación de la mutación en los casos en los que no hay siembra vítrea en el momento del diagnóstico, y la diferencia es estadísticamente significativa (Chi-cuadrado de Pearson $p=0,031$).

A continuación valoramos si existen diferencias entre el tipo de mutación encontrado en cada uno de los grupos, para lo que aplicamos un análisis mediante una

nueva tabla de contingencia, y el resultado del estadístico exacto de Fisher cuantifica un valor de $p=0,249$ (n.s.).

Tabla 90. Clasificación según el tipo de alteración genética identificada y la presencia de siembras vítreas en el momento del diagnóstico de retinoblastoma.

		TIPO ALTERACION IDENTIFICADA					Total
		No ident	Missense	Nonsense-Frameshift	Splice	Delección	
SIEMBRAS VITREAS	SI	48	6	42	14	16	126
	NO	25	2	9	5	3	44
Total		73	8	51	19	19	170

Estadístico exacto de Fisher $p=0,249$ (n.s.)

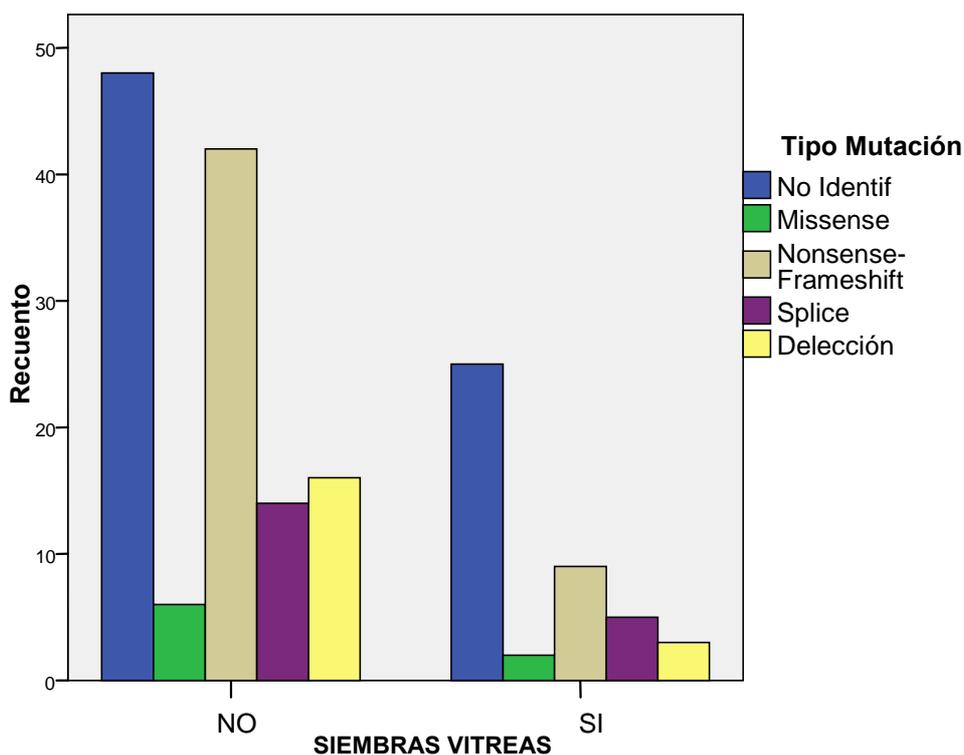


Gráfico 68. Clasificación según el tipo de alteración genética identificada y la presencia de siembras vítreas en el momento del diagnóstico de retinoblastoma.

Al hacer categorías para reducir el número de subgrupos y aumentar el tamaño de cada uno de los grupos de la muestra tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas (Estadístico exacto de Fisher $p=0,66$).

Tabla 91. Clasificación según el tipo de alteración genética identificada y la presencia de siembras vítreas en el momento del diagnóstico de retinoblastoma.

		TIPO ALTERACION IDENTIFICADA			Total
		Missense -splice	Nonsense- Frameshift	Delección	
SIEMBRAS VITREAS	NO	20	42	16	78
	SI	7	9	3	19
Total		27	51	19	97

Estadístico exacto de Fisher $p=0,66$.

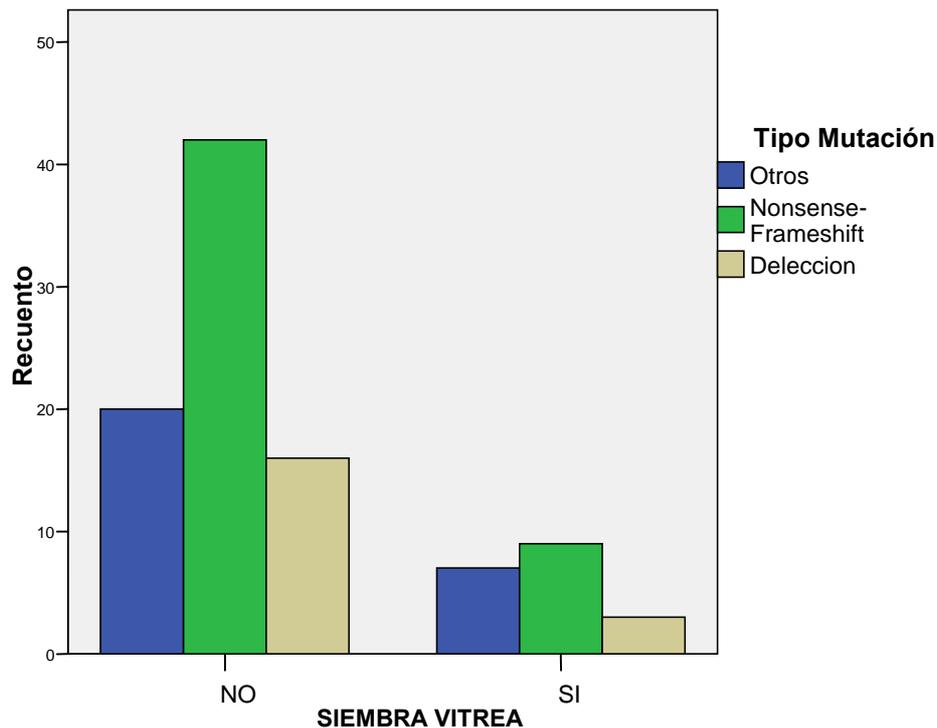


Gráfico 69. Clasificación según el tipo de alteración genética identificada (reagrupadas) y la presencia de siembras vítreas.

4.17. ANÁLISIS GENÉTICO INTRATUMORAL.

Para llevar a cabo éste análisis se toma muestra del tejido tumoral en fresco, en el momento de la enucleación, y se remite inmediatamente al departamento de genética para su posterior procesamiento.

El análisis ha sido realizado en 17 globos oculares, todos los pacientes presentaban enfermedad unilateral y ninguno de ellos tenía antecedentes familiares conocidos de retinoblastoma. En el tumor, por definición, deben coexistir las dos mutaciones de sendos alelos del gen RB.

En 5 casos (29.4%) no se ha podido identificar ninguna de las alteraciones genéticas, en 4 casos se ha identificado una de ellas, y en 8 casos (47.1%) se han identificado los dos eventos (“two hits”).

Tabla 92. Identificación de las alteraciones genéticas intratumorales.

	Frecuencia	Porcentaje
Hecho-No identificado	5	29,4
Identificada 1 hit	4	23,5
Identificada 2 hits	8	47,1
Total	17	100,0

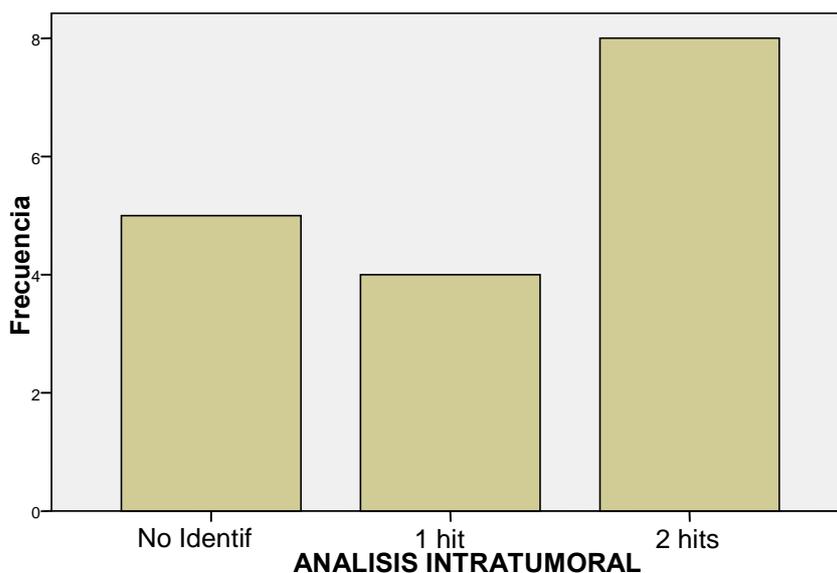


Gráfico 70. Identificación de las alteraciones genéticas intratumorales.

Tabla 93. Frecuencia de cada una de las combinaciones de alteraciones genéticas.

		Frecuencia	Porcentaje
	mut-mut	2	11,8
	mut-LOH	6	35,3
	1 hit	4	23,5
	no identif	5	29,4
	Total	17	100,0

Mut: mutación; LOH: pérdida de heterocigosidad.

A continuación se detalla el tipo de alteraciones que han sido identificadas:

* Primer hit identificado:

7 son frameshift/nonsense

2 son splice

* Segundo hit:

1 splice

2 nonsense

8 LOH (delección)

En tres de los casos se ha confirmado una de las alteraciones intratumorales en sangre periférica, en los tres se ha identificado una mutación y una pérdida de heterocigosidad intratumoral. Estos pacientes, que de otro modo hubieran sido considerados esporádicos sabemos ahora que son susceptibles de padecer bilateralización, segundas neoplasias malignas e incluso retinoblastoma trilateral. Al ser identificada la mutación en la línea germinal, la actitud ante el mismo paciente es muy diferente.

De los pacientes en los que se ha encontrado dos mutaciones puntuales, ninguno de ellos tenía ninguna de las alteraciones en sangre periférica, luego eran esporádicos reales o mosaicos.

De los otros 9 pacientes en los que se ha identificado una o ninguna de las alteraciones de los alelos nos aportan poca información.

Los que presentan la mutación junto con la pérdida de heterocigosidad en sangre periférica lo que se identifica en la línea germinal es la mutación puntual. La pérdida de heterocigosidad habría tenido lugar solo en el retinoblasto.

Aplicando estas técnicas en nuestra serie se consigue identificar las dos mutaciones en 8 de los 17 pacientes, lo que equivale al 47% de los casos, y una de las

mutaciones en el 23,5% de los casos. Dicho de otro modo, a 47% de los pacientes con tumores unilaterales esporádicos les podemos informar absoluta certeza si son portadores de la mutación de la línea germinal, con lo que ello supone.

Tabla 94. Correspondencia entre las alteraciones genéticas identificadas en tejido tumoral y en sangre periférica.

		Identif en tejido tumoral				Total
		mut-mut	mut-LOH	1 hit	no identif	
Identif. en s. perif.	NO	2	3	4	5	14
	SI	0	3	0	0	3
Total		2	6	4	5	17

Estadístico de Fisher $p=0,115$.

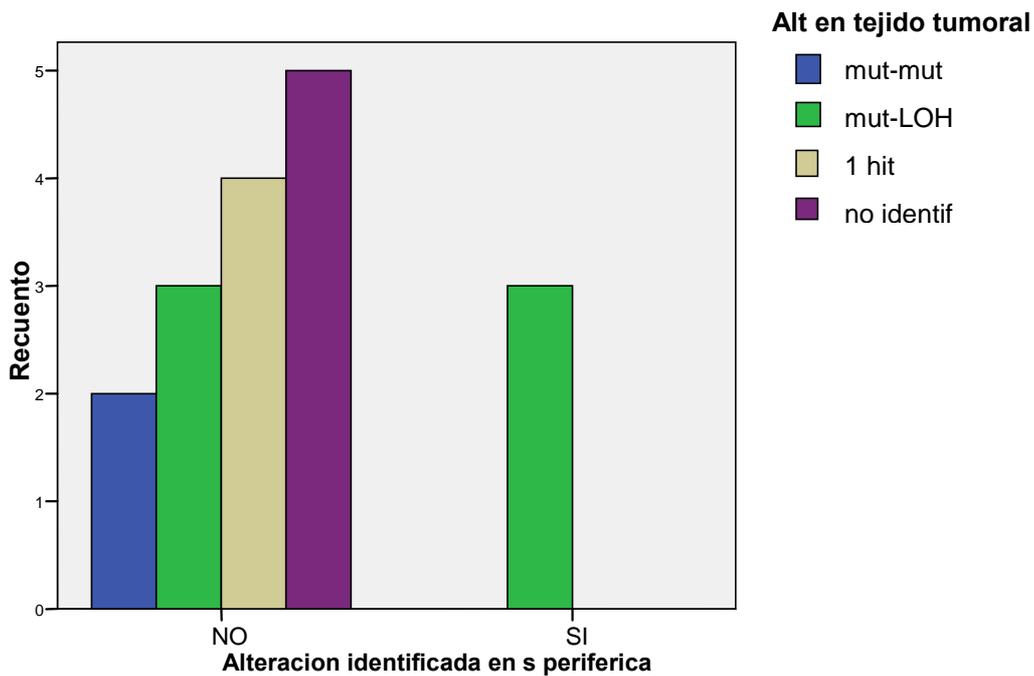


Gráfico 71. Representación de la correspondencia entre la identificación de alteraciones genéticas en tejido tumoral y en sangre periférica.

Hay 6 casos en los que se identifica mutación en el tejido intratumoral y no se identifica en sangre periférica, en éstos casos la alteración genética se localiza en 3 casos en el exon 15, 1 en el exon 14, 1 en el exon 8 y 1 en el exon 5.

4.18. ESTUDIO GENÉTICO DEL RETINOBLASTOMA TRILATERAL.

En nuestra serie no hay ningún caso de retinoblastoma trilateral considerado estrictamente. A pesar de que la incidencia de pinealoblastomas o tumores de la línea media en pacientes con retinoblastoma bilateral esta documentado entre 4-8%, no hemos encontrado ninguno.

En cambio, si se han descrito 17 casos con quistes pineales. Para algunos autores estos quistes corresponden a formas benignas de pinealoblastomas.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con quistes pineales y los que no los presentan, ni en cuanto a la lateralidad (Chi-cuadrado de Pearson $p=0.191$), ni en cuanto los antecedentes familiares (Estadístico exacto de Fisher $p=0.114$), ni a la edad de presentación (Estadístico exacto de Fisher 0.114), aunque en todos los parámetros se observa cierta tendencia.

Tabla 95. Relación entre la presencia de quiste pineal y la lateralidad del proceso.

		Lateralidad		Total
		Unilateral	Bilateral	unilateral
QUISTE PINEAL	NO	122	67	189
	SI	8	9	17
Total		130	76	206

Chi-cuadrado de Pearson $p=0,191$.

Tabla 96. Relación entre la presencia de quiste pineal y la existencia de antecedentes familiares de enfermedad.

	AAFF	Total

		NO	SI	no
QUISTE PINEAL	NO	177	12	189
	SI	14	3	17
Total		191	15	206

Estadístico exacto de Fisher $p=0.114$.

Tabla 97. Relación entre la presencia de quistes pineales y la edad de diagnóstico.

		Edad Diagnostico				Total
		<6 m	6-12 m	12-24 m	> 24 m	menos 6 meses
QUISTE PINEAL	NO	52	37	41	59	189
	SI	5	2	6	4	17
Total		57	39	47	63	206

Estadístico exacto de Fisher $p= 0,114$

De los 11 pacientes con estudio genético, en 8 casos se identificó la mutación, lo que equivale al 100% de los casos bilaterales, y el 25% de los unilaterales:

Tabla 98. Identificación de la mutación en sangre periférica, según la lateralidad del retinoblastoma, en los casos con quistes pineales.

		Lateralidad		Total
		Unilateral	Bilateral	
MUT GENETICA IDENTIFICADA	NO	3	0	3
	SI	1	7	8
Total		4	7	11

Estadístico exacto de Fisher 0,024

La distribución del tipo de mutación identificada en cada uno de los dos grupos es la descrita en la siguiente tabla:

Tabla 99. Tipo de alteración genética identificada según la lateralidad del proceso.

	Lateralidad		Total
	Unilateral	Bilateral	

TIPO ALTERACION GENETICA	No identif	3	0	3
	Missense	0	1	1
	Nonsense-Frameshift	1	3	4
	Splice	0	2	2
	Delección	0	1	1
Total		4	7	11

Estadístico exacto de Fisher $p=0,115(b)$

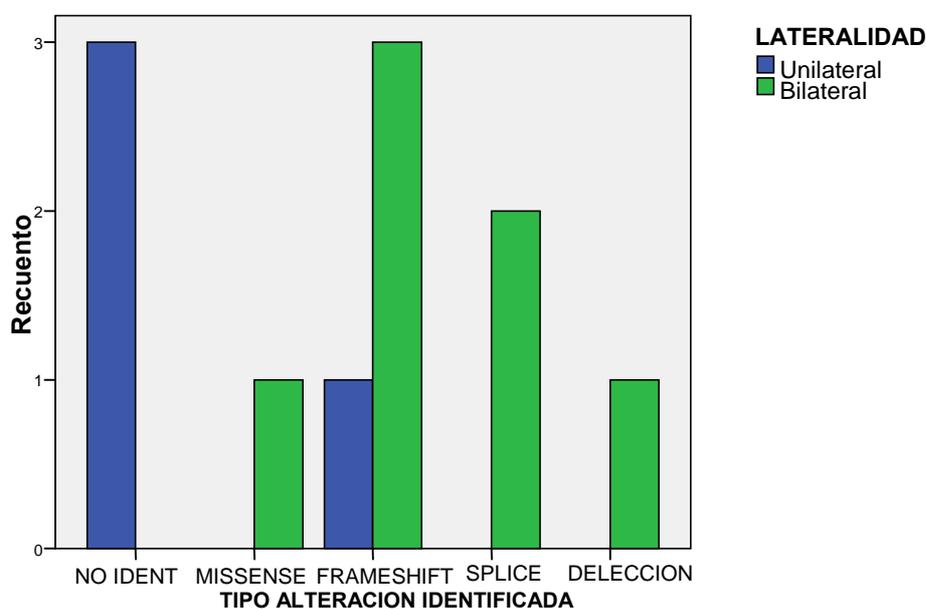


Gráfico 72. Distribución según la lateralidad y el tipo de alteración genética.

No hay hallazgos estadísticamente significativos, sin embargo, el tipo de mutación nonsense-frameshift es el más frecuente en los casos con afectación bilateral en general, además de ser el grupo con mejor pronóstico, en nuestra serie, en cuanto a conservación del globo ocular.

Por otra parte, al medir si en los pacientes con quistes pineales es más frecuente identificar la mutación asociada al RB, aparentemente sí, y aunque estadísticamente no se puede demostrar (estadístico exacto de Fisher $p=0.490$), se aprecia cierta tendencia:

Tabla 100. Asociación entre la presencia de quistes pineales y la identificación de alteración genética en sangre periférica.

		pineal		Total
		no	si	
MUTACION GENETICA IDENTIFICADA	NO	55	3	58
	SI	52	5	57
Total		107	8	115

Estadístico exacto de Fisher $p=0,490$.

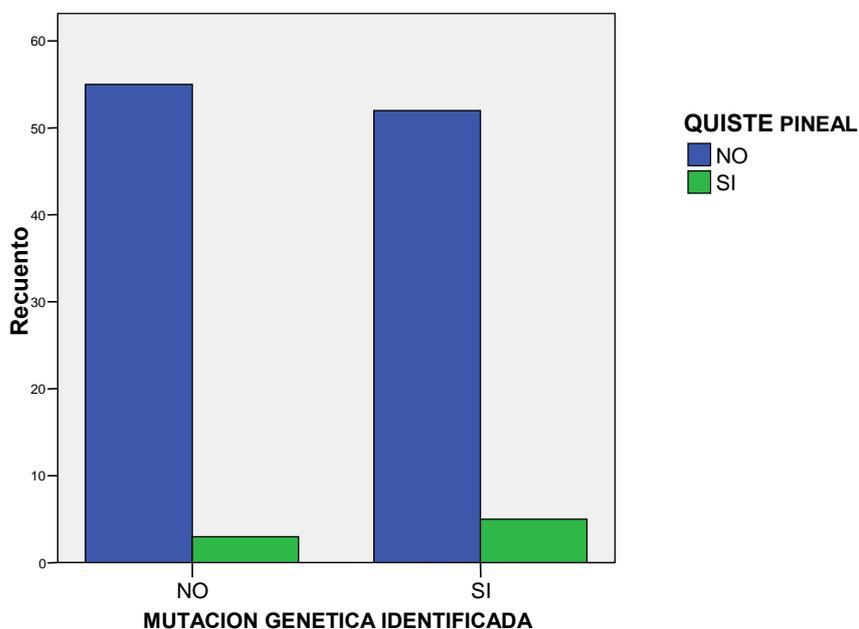


Gráfico 73. Relación entre los quistes pineales y la presencia de mutación genética identificada.

La distribución de los pacientes según el tipo de mutación presente, en los que se ha identificado, se representa en la siguiente tabla:

Tabla 101. Relación entre la existencia de quistes pineales y el tipo de mutación identificado.

		Tipo Alteración			Total
		Missense-splice	nonsense-frameshift	delección	
QUISTE PINEAL	NO	15	26	11	52
	SI	1	3	1	5
Total		16	29	12	57

Las diferencias observadas no tienen significación estadística. Podemos categorizar el tipo de mutación en tres grupos, y ver la distribución según la lateralidad, pero tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas.

Los tres casos que aparecen como perdidos son los que no se ha identificado la mutación en sangre periférica.

Tabla 102. Relación entre el tipo de alteración genética y la lateralidad, en los casos que presentan quistes pineales.

		Lateralidad		Total
		Unilateral	Bilateral	unilateral
Tipo Alteración	Missense-splice	0	3	3
	Nonsense-Frameshift	1	3	4
	Delección	0	1	1
Total		1	7	8

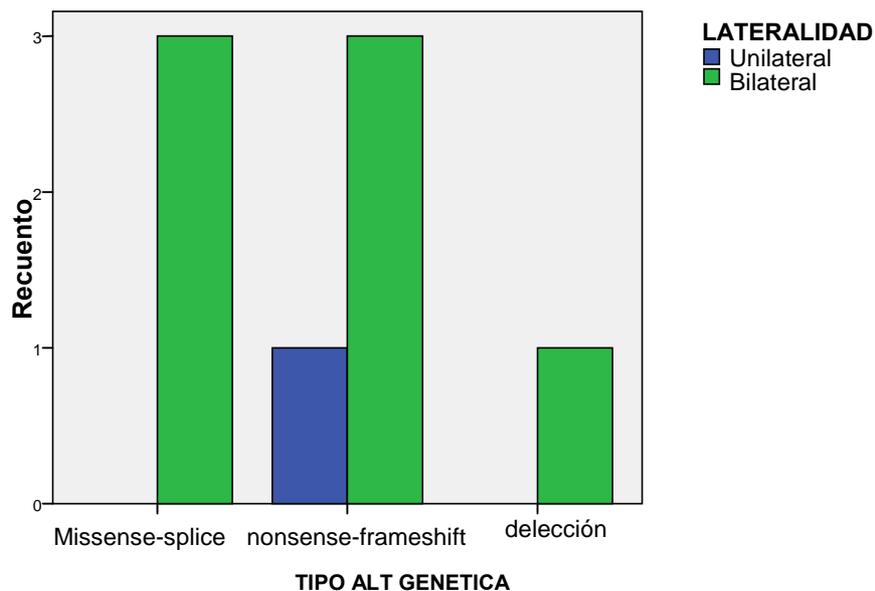


Gráfico 74. Tipo de alteración genética y lateralidad.

Probablemente el desarrollo de las técnicas para identificación de mutaciones genéticas nos permita conocer en mayor profundidad la historia natural de los distintos retinoblastomas, e incluso verificar si los quistes pineales son en realidad formas benignas de retinoblastomas trilaterales. A continuación se describe el tratamiento que recibió cada uno de los pacientes en los que se diagnosticó quiste pineal. (Tabla 97)

Un total de 9 de los 17 pacientes han sido tratados con quimioterapia sistémica. Algunos autores han señalado la importancia que podría tener el uso de quimioterapia en el desarrollo de retinoblastoma trilateral.

Tabla 103. Tratamiento recibido por los pacientes con quiste pineal.

	Frecuencia	Porcentaje
ENUCL 1ª	4	23,5
QYP	4	23,5
RTP	1	5,9
LOCAL	2	11,8
QT+RT	1	5,9
QT+LOCAL	4	23,5
RT+LOCAL	1	5,9
Total	17	100,0

V. DISCUSIÓN

5.1. Relación entre edad al diagnóstico y los antecedentes familiares.

La edad media de presentación de la enfermedad de nuestro pacientes, de manera global, es de 18,49 meses (IC 95%; mín.0 y máx. 89), siguiendo una distribución exponencial, ambos datos son comparables a los descritos en distintas revisiones.

Cuando se analiza por separado los pacientes que presentan antecedentes familiares y los que no, encontramos que hay una diferencia estadísticamente significativa, el grupo que no tiene antecedentes familiares de enfermedad tiene una edad media de presentación de 19.05 meses (curva exponencial) mientras que el grupo con antecedentes familiares conocidos tiene una edad media de presentación de 11.53 meses (curva bimodal). En ambos casos el diagnóstico es algo más tardío que en las revisiones internacionales. LH 37y 38.

Es llamativo que en nuestra serie la edad media del diagnóstico en los casos con antecedentes familiares sea de 11.53 meses, comparado con los 4,5 meses de otras series LH37, esto se debe a que tres de esos tumores familiares son pacientes de una misma familia, que presentan una mutación que desarrolla un tumor de baja penetrancia y expresividad, que, característicamente tiene una edad tardía de aparición, por eso, en nuestro caso es más representativo el valor de la mediana, que es de 5 meses.

5.2. Relación entre edad y forma de presentación al diagnóstico.

El signo más prevalente en el momento del diagnóstico, en todos los grupos de edad es la leucocoria, sin embargo observamos ciertas diferencias respecto a las proporciones del resto de los signos, o cual hace a nuestra serie comparable con otras series internacionales, el estrabismo es más prevalente en edades más avanzadas, así como el hallazgo de signos inflamatorios, como son la uveítis o a celulitis, más prevalentes es edades avanzadas.

En el caso del debut como disminución de la agudeza visual, lo cual no se trata de un signo sino un síntoma, hace necesaria la colaboración del niño, por lo que aparece también a edades más avanzadas.

El modo de manifestarse clínicamente está muy ligado con la localización y tamaño tumoral. Los tumores que se manifiestan con estrabismo tienen alterada la fijación foveal, y son tumores localizados en el polo posterior.

5.3. Correlación entre morfología y edad al diagnóstico.

El estudio de la morfología tumoral describe una menor frecuencia de tumores exofíticos en mayores de 2 años, sin embargo no es un dato estadísticamente significativo (Prueba exacta de Fisher, $p=0.388$). No encontramos ninguna asociación entre la morfología tumoral y la forma clínica de presentación.

5.4. Correlación entre morfología y signo de presentación.

Los datos estadísticos señalan que, con un valor de $p=0.001$, los pacientes con tumores exofíticos se manifiestan clínicamente con leucocoria con mayor proporción de la esperada por azar, o que los signos clínicos especiales, categorizados como “otros” aparecen en los tumores del tipo endofítico.

La explicación biológica congruente de estos datos es que los tumores de naturaleza exofítica con frecuencia aparecen asociados a desprendimientos de retina, lo que explicaría la leucocoria. En el caso del segundo dato aportado en el análisis, es decir, que los que se manifiestan con signos poco frecuentes sean predominantemente endofíticos, considero, que aunque estadísticamente sea válido, no tiene mucho valor clínico, además de que pudiera ser engañoso, dado que la mayoría de los ojos presentan tumores endofíticos.

5.5. Relación entre el estadio al diagnóstico y el riesgo de enucleación.

Es aceptado de manera unánime que actualmente la clasificación de Reese-Elsworth, desde que se ha introducido el uso de la quimioterapia en el manejo del retinoblastoma, no es una clasificación adecuada, ya que ha dejado de tener valor

pronóstico, así como que sus estadíos no son orientativos en cuanto al tratamiento que debe recibir cada paciente de forma concreta. No es una clasificación útil para protocolizar el tratamiento.

Hasta hace poco tiempo, en la práctica diaria del servicio del Hospital La Paz, el tratamiento no se planteaba según su estadio según la clasificación de Reese-Elsworth, sino que se basaba en las características morfológicas de cada caso concreto; tamaño tumoral (clasificación Hospital La Paz), así como la existencia de siembras vítreas y/o subretinianas. Hoy en día, la nueva clasificación internacional si tiene utilidad en cuanto a la orientación terapéutica.

Sin embargo en nuestra serie el estadio de Reese-Elsworth parece tener valor pronóstico; esto se debe, posiblemente, a la existencia de dos sesgos, por un lado el hecho de que dada la extensión del periodo de inclusión de los pacientes muchos son del periodo previo a la utilización de quimioterapia sistémica, y que una gran proporción de los pacientes de nuestra serie, comparada con otras series, son masivos, o presentan siembras vítreas.

5.6. Relación entre la presencia de siembras vítreas al diagnóstico y la enucleación.

La presencia de siembras vítreas, por si sola tiene un carácter predictivo en cuanto al riesgo de enucleación, independientemente de la morfología del tumor, esto es, su tamaño, numero de lesiones o localización.

La presencia de siembras vítreas tiene una OR de 3,415 respecto a la enucleación, esto quiere decir, que un paciente que en el momento del diagnóstico del retinoblastoma presenta siembras vítreas tiene 3,4 veces más probabilidades de ser enucleado en un futuro que el mismo paciente si no presentara las siembras vítreas. (Este dato se calcula utilizando el estadístico de Mantel-Haenszel).

5.7. Correlación entre tratamiento recibido y la necesidad de enucleación posterior.

7.1. Tratamiento Local.

Los ojos que sólo reciben tratamiento local tienen menos probabilidades de ser enucleados, respecto al resto de las categorías (test exacto de Fisher $p < 0,001$).

Los globos oculares a los que solo se les aplica tratamiento local, y que se controlan, son los que tienen un estadio más precoz en el momento del diagnóstico, no precisando el empleo de tratamientos más agresivo.

Ninguno de los pacientes con esta disciplina terapéutica fue enucleado.

7.2. Quimioterapia Sistémica.

Los pacientes que como tratamiento solo reciben quimioterapia sistémica tienen una alta probabilidad de ser enucleados (81,3%). La OR de enucleación de estos pacientes es de 4.055 respecto al resto de las disciplinas terapéuticas.

La mayoría de estos pacientes tiene una enfermedad bilateral, muchas veces con tumores que se presentan como masivos. La quimioterapia se administra para disminuir el volumen, al menos parcialmente y permitir la conservación de alguno de los globos oculares con funcionalidad visual, o cuando se sospecha una posible invasión del nervio óptico.

Excluyendo del análisis los pacientes que reciben enucleación de forma primaria obtenemos un valor de OR de 9,507 respecto al riesgo de enucleación del resto de los pacientes considerados en un mismo grupo.

La quimioterapia aislada no es un tratamiento eficaz, presenta una probabilidad de enucleación muy alta.

7.3. Radioterapia Externa.

Los pacientes de nuestra serie que como tratamiento solo reciben radioterapia externa son enucleados en un 50% de los casos, sin embargo esta diferencia respecto al resto de los pacientes no es estadísticamente significativa.

Los pacientes que han recibido este tipo de tratamiento han sido tratados antes de la introducción de la quimioterapia en el arsenal terapéutico. Hoy en día la radioterapia se utiliza como “tratamiento de rescate” en los pacientes que no han respondido a quimioterapia, ya no se utiliza como tratamiento de elección en ningún caso, dada su alta incidencia de desarrollo de complicaciones.

Si excluimos del análisis los pacientes con enucleación primaria la proporción de enucleaciones entre los dos grupos es de 50% y 42,23% respectivamente, aunque las diferencias de los resultados tampoco son estadísticamente significativas.

A pesar de lo llamativo de las diferencias no hay significación estadística porque el tamaño de la muestra, esto es, los pacientes que solo reciben radioterapia externa es muy pequeño.

7.4. Quimioterapia sistémica y tratamiento de consolidación.

Esta alternativa terapéutica es la que mejor pronóstico tiene para los pacientes, con una OR de 5,31 respecto a la conservación del globo ocular.

Es la actitud terapéutica utilizada en la mayor parte de los casos. Se denomina quimiorreducción y tratamiento de consolidación, y ha constituido no solo un gran avance para el tratamiento de los retinoblastomas no solo en cuanto a la valoración de la conservación del globo ocular sino también en cuanto a la funcionalidad del órgano visual, permitiendo la conservación de agudezas útiles.

Cuando se compara este grupo de pacientes con el resto, excluyendo los susceptibles de enucleación primaria el valor de la OR es de 2,56, es decir, los pacientes con susceptibles de recibir este tratamiento tienen 2,56 menos posibilidades de ser enucleados que el resto.

7.5. Quimioterapia Sistémica y Radioterapia Externa.

Los pacientes que reciben como tratamiento quimioterapia sistémica asociada a radioterapia externa tienen un buen pronóstico en cuanto a conservación del globo ocular respecto al resto de las posibilidades terapéuticas. Con un valor de OR de 2,28 si excluimos los pacientes que se enuclean de forma primaria aparentemente esta alternativa terapéutica tiene mejores resultados que el resto, aunque no es un dato estadísticamente significativo.

Los pacientes que reciben esta pauta son pacientes quimiorresistentes, a los que se les aplica la radioterapia externa como “tratamiento de rescate”, el 40% de los pacientes de nuestra serie quimiorresistentes se libra de una enucleación gracias a la radioterapia externa.

7.6. Quimioterapia Sistémica, Radioterapia Externa y Tratamiento Local.

Esta triple terapia se aplica a pacientes con un mal pronóstico, no son respondedores a quimioterapia, en la mayoría el tratamiento local que se emplea es la crioterapia en los tumores próximos a la ora serrata, difícilmente tratables con la radioterapia externa. Comparados con el resto de los pacientes tienen una mayor

proporción de conservación del globo ocular, 55% frente al 44,4%. Al excluir de la comparación a los pacientes que son enucleados de forma primaria, la proporción de conservación del globo ocular pasa a ser del 55% frente al 58.8% respectivamente. Ninguna de las diferencias son estadísticamente significativas, aunque si se observa una cierta tendencia; al excluir los ojos con peor pronóstico en cuanto a conservación, esto es, los enucleados de forma primaria, resulta, como es lógico, que los pacientes que son candidatos a recibir todos los tipos de tratamiento de los que disponemos tienen un peor pronóstico que el resto valorados en su conjunto. Aun así el 55% de esos ojos se conservan.

7.7. Radioterapia Externa y Tratamiento Local.

Es el grupo de pacientes más reducido, son enucleados un 30% de los casos, sin embargo, no es una diferencia estadísticamente significativa, frente al 57% del resto de los pacientes, ya que hay una gran diferencia entre los tamaños muestrales, y es posible encontrar esa diferencia solo debido al azar.

Estos son pacientes que han sido incluidos en nuestra serie hace muchos años, hoy en día estos pacientes que antes se trataban con radioterapia externa son candidatos a la quimioterapia sistémica.

Al hacer la comparación excluyendo los pacientes con peor pronóstico, con enucleación primaria, la proporción de enucleados es del 30% frente al 42,42% que son enucleados con el resto de las opciones.

Independientemente del estadio con el que se diagnostique el retinoblastoma, y excluyendo a los tumores que se estabilizan con tratamiento local, la mayor tasa de control tumoral se consigue con la quimiorreducción con consolidación focal.

5.8. Análisis Descriptivo del Periodo libre de Enucleación.

Un alto porcentaje de los pacientes de nuestra serie, el 21%, son tratados con enucleación de forma primaria, la mayor parte de ellos en el primer mes tras el diagnóstico.

En el resto se aplica distintos tratamientos para conseguir la regresión tumoral, y cuando estos fracasan se enuclea. Según el tratamiento que se aplica hay una diferencia estadísticamente significativa del periodo de tiempo que hay hasta la enucleación,

independientemente del número de casos que precisan ser enucleados en cada grupo. Para hacer más sencilla la interpretación se categoriza el periodo hasta la enucleación. Los enucleados antes del primer mes son las enucleaciones primarias, pacientes que, dado su estadio, no son candidatos a otro tratamiento. Los del segundo y tercer rango son pacientes a los que se les aplica otra alternativa terapéutica previa a la enucleación, pero no existe respuesta o esta es parcial, lo más frecuente es que el tumor continúe activo, no tenga signos de regresión, o que sigan apareciendo nuevos tumores en el mismo ojo. En el último estadio se localizan los pacientes que reciben varios tratamientos, que tienen enfermedad bilateral, o los que se enuclean al cabo de mucho tiempo porque desarrollan desprendimientos de retina, que no se reaplican, y terminan por perder la capacidad visual y entrando en ptosis.

Excluyendo los pacientes con enucleación primaria, y observando la clasificación según el tratamiento se evidencia que los pacientes con quimioterapia aislada son los que antes se enuclean, y que los que se enuclean más tarde son los que reciben radioterapia externa y tratamiento local, son los que presentan las recidivas más tardías.

5.9. Periodo de Seguimiento

Los pacientes diagnosticados de retinoblastoma, una vez iniciado el tratamiento siguen revisiones periódicas cuya frecuencia depende de cómo vaya respondiendo a la terapia que se le aplica. Una vez que el paciente está en regresión o ha sido enucleado, las revisiones pueden ser más espaciadas, pero nunca ser suspendidas.

También los individuos libres de enfermedad, que presentan la mutación en la línea germinal deben ser revisados periódicamente.

De los pacientes con estudio genético de nuestra serie en un caso se identificó la mutación al mes de vida, se hizo el estudio porque había antecedentes familiares, y el tumor apareció 8 meses después, debutando de modo bilateral, con lo que el tratamiento pudo ser iniciado de una manera precoz. Otro de los pacientes con antecedentes familiares se exploró a los 9 meses de vida, por insistencia de la madre y se evidenció afectación bilateral, posteriormente en el estudio genético se identificó la mutación en la línea germinal. Otro de los casos con mutación germinal y libre de enfermedad era revisado con una frecuencia trimestral, estando sano, sin embargo, en el momento del

debut, la enfermedad era bilateral y presentaba un estadio de Reese-Ellsworth Ib en el ojo derecho y IIB en el izquierdo.

Como la edad media de diagnóstico de la enfermedad en los casos con antecedentes familiares es de 11 meses consideramos adecuado hacer estudio genético a todos los recién nacidos con antecedentes familiares y mutación genética identificada, a los que no presentaran la mutación no se les sometería a exploraciones oftalmológicas dado que el riesgo de padecer retinoblastoma es el mismo que para la población general, mientras que los que si la presentaran las exploraciones deberían hacerse cada dos meses como método de screening.

5.10. Relación entre el Desprendimiento de Retina y la enucleación.

El pronóstico de los pacientes que presentan desprendimiento de retina a lo largo de la evolución de su enfermedad es peor que el de los que la retina permanece aplicada. El pronóstico empeora tanto para los que presentan el desprendimiento en el momento del diagnóstico como los que lo padecen una vez iniciado el tratamiento ($p < 0.001$), aunque en los que lo presentan de modo diferido el pronóstico, valorado según las enucleaciones, es mejor que en el primer grupo.

El riesgo relativo (RR) de enucleación de los pacientes que presentan DR en el momento del diagnóstico es de 2.52 respecto a los que nunca lo presentan.

El RR de enucleación de los pacientes que presentan el DR una vez iniciado el tratamiento respecto de los que nunca lo presentan es de 1.706.

5.11. Pronóstico visual según el tratamiento recibido.

Otra manera de valorar el pronóstico es valorar como desenlace no la enucleación o conservación del globo ocular, sino la funcionalidad del órgano visual que ha sido conservado, esto es, la agudeza visual. Como se ha señalado en el apartado del estudio descriptivo es difícil la cuantificación de la capacidad visual de estos pacientes, así como hacerlas comparables entre sí.

Se ha podido cuantificar la agudeza visual tras el tratamiento en un total de 82 pacientes (29,1% de nuestra serie). Categorizamos la agudeza visual en cuatro grupos, $<0,1$, 0.1-0.5 y 0.5-1. Un cuarto grupo corresponde a los pacientes que, conservando el órgano visual no son colaboradores para medir la capacidad visual de forma objetiva.

Destaca el hecho de que la mayor proporción de pacientes con buena AV se encuentran en el grupo que ha recibido tratamiento local con o sin QT asociada, así como que los pacientes que en su plan terapéutico han recibido radioterapia externa y conservan el globo ocular es difícil que la agudeza visual alcance el tercer grupo, es decir mejor de 0,5, probablemente esto sea debido a los efectos secundarios de la radioterapia, que además de ser muy variados, pudiendo afectar a todas las estructuras del ojo, son bastante frecuentes.

La introducción de la quimioterapia en el tratamiento del retinoblastoma no solo ha ayudado a mejorar el pronóstico visual en cuanto a conservación del órgano visual sino, dando un paso más, mejorando su capacidad funcional.

5.12. Relación entre edad al diagnóstico y periodo de bilateralización.

Los pacientes que presentan afectación bilateral en algunos casos son bilaterales ya en el momento del diagnóstico y en otros casos la bilateralización se produce una vez conocida la enfermedad del primer ojo, a estos los denominamos pacientes con bilateralización tardía.

Al comparar los datos descriptivos de la edad al diagnóstico entre los pacientes que bilateralizan precozmente y los que lo hacen de forma tardía encontramos que las medias son muy dispares, 9.72 meses (desv. Standard 8.93) en el primer grupo y 16.37 meses (desv. Standard 15.65) en el segundo grupo. Los valores de la mediana son 6,5 y 11 meses respectivamente. Sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas; Prueba U-Mann Whitney ($p=0.169$).

Los pacientes que bilateralizan de forma tardía son más frecuentemente diagnosticados a edades más avanzadas. Aunque solo es un dato fruto de la observación, no tiene potencia estadística.

Al categorizar la edad al diagnóstico esa tendencia se hace más evidente, pero tampoco es estadísticamente significativa, cuando el diagnóstico se hace a edades más tardías, sobretodo mayores de dos años, también es más frecuente la bilateralización tardía y con mayor decalaje respecto del primer ojo. Así como que cuando el diagnóstico se hace antes de los 6 meses de edad lo más probable es que la enfermedad que va a ser bilateral ya se manifieste de esa forma.

5.13. Estudio descriptivo y analítico de los pacientes con estudio genético. Sensibilidad del Análisis Genético.

Esta documentado que entre el 5 y el 10% de los pacientes con retinoblastoma tienen antecedentes familiares conocidos. Sin embargo más del 60% de los retinoblastomas analizados tienen mutación en la línea germinal. El hecho de que la incidencia no aumente paulatinamente es porque se trata de un antioncogen que precisa de la mutación de los dos alelos para manifestarse y de la baja penetrancia de la expresión de la enfermedad. Algo similar ocurre con la lateralidad, no todos los que tienen mutación en la línea germinal son bilaterales, sin embargo, es lógico pensar que todos los pacientes que tienen afectación bilateral presentaran esa alteración, aunque no pueda ser identificada, al menos por el momento.

El análisis genético que se practica actualmente ha progresado exponencialmente en los últimos años, hace menos de 15 años la posibilidad que se le ofrecía a los pacientes con retinoblastoma era la realización de un cariotipo, cuya aportación al conocimiento de la enfermedad de cada paciente en concreto era muy limitada. Hoy en día se utilizan varias técnicas para la identificación de las distintas alteraciones que puede presentar el gen RB. En el laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, con el que trabajamos en estrecha relación desde 1997, se realizan distintas técnicas para el diagnóstico molecular del retinoblastoma entre las que se incluyen: PCR-secuenciación de los 27 exones del gen del retinoblastoma y los estudios de análisis de microsatélites para la detección de grandes deleciones, LOH en tumores y estudios de segregación alélica para los casos familiares

De los 206 pacientes incluidos en nuestro trabajo 15 (7,3%) presentaban antecedentes familiares conocidos, el resto 191(92%) no. A 115 pacientes (55.82%) de nuestra serie se le ha realizado el análisis genético, tanto al paciente como a sus padres y hermanos, y otros parientes de segundo grado cuando el estudio ha sido preciso. Así, cuando la mutación ha sido identificada se ha podido elaborar un árbol genealógico señalando quienes son las personas sujetas a riesgo de padecer retinoblastoma, que deben ser revisadas periódicamente, y quienes son los portadores de la mutación germinal, transmisores potenciales de la enfermedad, esto nos permite hacer un consejo genético adecuado y bien orientado.

La sensibilidad del estudio genético del que disponemos es del 76,47%, considerando portadores de la mutación a todos los casos con antecedentes familiares conocidos, lo cual es biológicamente lógico. Si tenemos en cuenta los pacientes con afectación bilateral, lo que les hace ser considerados portadores de la mutación germinal, la sensibilidad es del 70%.

Valores de sensibilidad en torno al 70-80%, en pacientes que conocemos enfermos, es una cifra que en un futuro esperamos sea mejorable.

Sin embargo resulta que, con ese mismo análisis estamos identificando la mutación germinal en pacientes que a priori no sospecharíamos que la presentarán, esto es en el 44,89% que presentan la enfermedad sin tener antecedentes familiares, y lo que es más importante, en el 24% de los pacientes sin antecedentes familiares y con enfermedad unilateral, que son los que clásicamente se han considerado esporádicos. Este último grupo de pacientes es en el que el análisis resulta más relevante, porque hay que hacer el estudio familiar, para poder hacer un adecuado consejo genético, y porque en estos casos hay que sospechar una posible bilateralización posterior de la enfermedad.

Por lo tanto, para hacer un adecuado consejo genético así como para hacer una práctica clínica rentable, sin exceso de gasto en consultas, anestesia, ingresos, y proporcionar un estrés gratuito a pacientes que probablemente no se beneficien de exploraciones oftalmológicas, es necesario el análisis genético.

Los pacientes susceptibles de realizar análisis genético son todos.

Como no hay una técnica diagnóstica considerada como Gold Standard para la identificación de los pacientes con mutación en la línea germinal, no podemos determinar la sensibilidad del análisis genético del que disponemos actualmente. Los casos que resultan negativos podrían ser identificados dentro de un tiempo, cuando las técnicas de las que disponemos sean mejores y más sensibles.

La alteración se identifica en un 49,6% de los casos, y entre ellos lo más frecuente es la alteración del tipo frameshift, considerando cada tipo de manera independiente. La mutación de tipo frameshift es equiparable a la hora de hacer el análisis con la de tipo nonsense.

En cuanto a la relación entre el tipo de mutación y las características epidemiológicas del tumor, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la lateralidad, ni a los antecedentes familiares ni al riesgo de enucleación.

En cambio si se aprecian diferencias en la curva de supervivencia; todos los casos que presentan alteraciones del tipo missense y splice son enucleados. En todos los grupos son más frecuentes las enucleaciones en los primeros meses. El grupo frameshift presenta una tasa de supervivencia sensiblemente mejor, aunque no hay diferencias estadísticas.

Localización de la alteración genética.

La mayoría de las alteraciones se localizan en las regiones denominadas exones (o regiones codificantes). En un principio se sospechaba que en los intrones, o regiones no codificantes, la presencia de alteraciones no era clínicamente significativo, posteriormente se ha demostrado que esto no es así.

Las alteraciones localizadas en los intrones son más frecuentes en los pacientes con mutaciones germinales de novo, con una $p=0,009$, es decir, sin antecedentes familiares conocidos. Así como la mayoría de las mutaciones de los pacientes sin antecedentes familiares (81,81%) están localizadas en los intrones.

Tipo de Mutación según su Localización en el Gen RB.

Las mutaciones que tienen lugar en los intrones o regiones no codificantes son las del tipo splice, y lo que producen son un corrimiento en el marco de lectura, dependiendo si el exon eliminado está o no en fase. El sitio splice se denomina al punto en el que el DNA pasa de codificar un intrón a codificar un exon.

Las deleciones son ausencias de varios pares de bases que pueden ser identificadas con un exón o un intrón concretos o varios.

Edad de Diagnostico y Mutación Germinal. Poner medianas no medias!

Al clasificar los pacientes según tengan o no mutación en la línea germinal identificada se evidencia que la edad de diagnóstico de los que tienen mutación en la línea germinal es menor que la del otro grupo. 13,4 frente a 16,9 respectivamente. Esta diferencia es estadísticamente significativa, con un valor de $p=0,034$. . Todo ello concuerda por tanto con la hipótesis de los two hits para el retinoblastoma. Comentar y referencias.

Debemos tener en cuenta que en el grupo en el que no hemos identificado la mutación germinal no significa que no la tengan, sino que con los métodos de los que

disponemos hoy en día no hemos podido identificarla. Aún así las diferencias son significativas. Un mayor conocimiento de las características genéticas de estos pacientes probablemente nos desvelara diferencias más significativas.

Los resultados analíticos en este caso son solo orientativos, solo si conociéramos con absoluta certeza que pacientes tienen la mutación germinal y quienes no podríamos calcular los datos reales.

5.14. Estudio Genético de los pacientes Quimiorresistentes.

El tratamiento que mejor pronóstico aporta al manejo del retinoblastoma, considerando tanto la conservación del globo ocular como su funcionalidad es la quimiorreducción asociada a tratamiento de consolidación. Sin embargo hay tumores que no son sensibles a la quimioterapia.

Si consideramos los pacientes cuya mutación ha sido identificada y valoramos su respuesta a la quimioterapia, considerando no respondedores a los pacientes que son enucleados, resulta que el tipo de mutación que presenta un peor pronóstico es la delección, mientras que los pacientes que presentan una alteración del tipo nonsense-frameshift tienen más posibilidades de conservar el globo ocular. ($p=0,055$)

En cuanto a la lateralidad, los casos que presentan delecciones son más frecuentes en los casos unilaterales ($p=161$). De lo que se deduce que los pacientes tratados con enfermedad unilateral y delecciones genéticas tienen una peor respuesta a la quimioterapia.

De los tres pacientes que han sufrido enucleación bilateral, dos de ellos presentaban delecciones y uno alteración del tipo missense.

Todos los ojos que presentaban delecciones han sido enucleados.

En el análisis de supervivencia del globo ocular que se representa con una curva de Kaplan-Meier, se observa también que los pacientes que reciben quimioterapia y tienen mutación del tipo nonsense-frameshift son los que mejor pronóstico tienen en cuanto a conservación del globo ocular. Así como que los ojos con delección son los que se enuclean antes, son más agresivos.

Las diferencias, que se han analizado empleando el Log Rank (Mantel-Cox) presenta un nivel de significación de $p=0,053$.

5.15. Relación entre la presencia de Siembras Vítreas y Mutación en la Línea Germinal.

No encontramos diferencias entre el tipo de mutación identificado en los pacientes según tengan o no siembras vítreas ($p=0,66$).

Sin embargo es más frecuente identificar mutación en la línea germinal en los casos que no presentan siembras vítreas. ($p=0,031$).

Dadas las limitaciones actuales del estudio genético, no podemos equiparar la ausencia de identificación de la mutación germinal con caso esporádico. Pero podemos intuir que los casos que se presentan con siembras vítreas son con más probabilidad casos esporádicos. Esto podría explicarse por el hecho de que esos pacientes son diagnosticados más tardíamente.

5.16. Análisis Genético Intratumoral.

En los últimos cuatro años se ha añadido a la práctica diaria un nuevo procedimiento protocolizado en el diagnóstico de los pacientes con retinoblastoma esporádico unilateral. Cuando estos pacientes son enucleados se toma una muestra de tejido tumoral en fresco para ser procesado y poder realizar posteriormente un estudio genético.

En el tejido tumoral, por definición, hay alteraciones en los dos alelos del gen RB, una vez estas dos mutaciones sean identificadas, se buscan ambas en sangre periférica, así se identifican pacientes con mutación en la línea germinal, por ejemplo, que presenten una enfermedad con baja penetrancia.

En tres casos se ha confirmado la alteración en sangre periférica, en los tres tumores se ha identificado una mutación y una pérdida de heterocigosidad. Estos pacientes, que de otro modo hubieran sido considerados esporádicos, es sabido que son susceptibles de padecer bilateralización, segundas neoplasias malignas y retinoblastoma trilateral. Al ser identificada la mutación en la línea germinal, la actitud ante el mismo paciente es muy diferente.

De los pacientes en los que se ha encontrado dos mutaciones puntuales, ninguna tenía la alteración en sangre periférica, luego eran esporádicos reales. De los pacientes en los que se ha identificado la lesión de uno de los alelos, no se ha identificado en sangre periférica, el análisis aporta poca información.

Los que presentan una mutación junto con la pérdida de heterocigosidad, en sangre periférica lo que se identifica es la mutación puntual. La pérdida de heterocigosidad habría tenido lugar solo en el retinoblasto.

Haciendo el análisis intratumoral conseguimos identificar las mutaciones en 8 de los 17 pacientes, lo que equivale al 47% de los casos, y una de las mutaciones en el 23,5% de los casos. Dicho de otro modo, al 47% de los pacientes con tumores unilaterales esporádicos les podemos informar con absoluta certeza de si son portadores de la mutación en la línea germinal, con lo que ello supone.

5.17. Estudio Genético del Retinoblastoma Trilateral.

Como han señalado otros autores, la supervivencia del paciente con retinoblastoma viene determinada fundamentalmente por la existencia de tres factores; el desarrollo de metástasis, la aparición de segundas neoplasias malignas en pacientes genéticamente predispuestos, y el desarrollo de retinoblastomas trilaterales. En nuestra serie no contamos con ningún paciente que haya desarrollado metástasis, solo uno con una segunda neoplasia maligna, una leucemia, y ninguno que haya desarrollado un pinealoblastoma. A pesar de que la incidencia de pinealoblastomas o tumores de la línea media en pacientes con retinoblastoma bilateral está documentado entre 4-8%.

Recientemente han aparecido publicaciones científicas en las que se considera a los quistes de la pineal como formas benignas de pinealoblastomas.

En nuestra serie se han descrito 17 casos con quistes pineales. Es una incidencia relativamente alta para un signo que podría considerarse un hallazgo accidental. La identificación de los quistes se hace con el estudio de resonancia magnética, que se efectúa en todos los pacientes de manera protocolizada.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas de los pacientes con quistes pineales respecto al resto de nuestra serie ni en cuanto a la bilateralidad, ni la existencia de antecedentes familiares conocidos ni la edad de presentación. Aunque en todos los parámetros citados se observa cierta tendencia. Tienen una mayor incidencia en casos de enfermedad bilateral (Chi cuadrado de Pearson $p=0,191$), en los casos con

antecedentes familiares conocidos (Estadístico exacto de Fisher $p=0.114$) y algo más frecuente en los pacientes que debutan entre los 12 y los 24 meses de edad (Estadístico exacto de Fisher $p=0,114$).

De los 17 pacientes con quistes pineales se ha hecho estudio genético en 11 casos. De los pacientes con estudio genético, en 8 casos se identificó la alteración en sangre periférica, lo que equivale al 100% de los casos bilaterales, y el 25% de los unilaterales. Todos esos pacientes presentaban alteración en la línea germinal. Como es lógico pensar, es más frecuente encontrar mutación germinal en los pacientes con enfermedad bilateral ($p=0,024$).

No encontramos diferencias en cuanto al tipo de mutación identificada en cada grupo. A pesar de que el tipo de mutación nonsense-frameshift es el más frecuente en los casos con afectación bilateral en general, además de ser los que presentan un mejor pronóstico, en nuestra serie, en cuanto a conservación del globo ocular ($p=0,115$).

Por otra parte, al comparar si en los pacientes con quistes pineales es más frecuente identificar la mutación asociada al RB, aparentemente parece que sí, pero estadísticamente no se puede demostrar ($p=0,490$).

Esto, probablemente sea porque no podemos excluir los unilaterales sin mutación en los casos en que no se ha identificado la mutación en sangre periférica. Si asumimos la naturaleza del quiste pineal como una forma pre-maligna del pinealoblastoma, lo lógico es pensar que todos estos pacientes tengan la mutación de la línea germinal, aun cuando con los métodos de los que se dispone en la actualidad, no podamos identificarla.

La distribución de los pacientes según el tipo de mutación presente, en los que se ha identificado tampoco aprecia diferencias significativas.

Probablemente el desarrollo de las técnicas para identificación de mutaciones genéticas nos permita conocer en mayor profundidad la historia natural de los distintos tipos de retinoblastomas, e incluso verificar si los quistes pineales son en realidad formas benignas de retinoblastomas trilaterales.

Recientemente se ha señalado que la incidencia de retinoblastomas trilaterales podría estar disminuyendo debido a la introducción del uso de la quimioterapia, que

podría interferir en su desarrollo. 9 de los 17 pacientes con quistes pineales han sido tratados con quimioterapia sistémica (52,29% de los casos). Podría inferirse que esas lesiones correspondieran a una forma abortiva de pinealoblastoma.

6. CONCLUSIONES

1. Es preciso hacer un diagnóstico precoz del retinoblastoma. Una gran proporción de nuestros pacientes son diagnosticados en un estadio avanzado y con siembras vítreas. Los pediatras y médicos de atención primaria deben ser instruidos correctamente para poder hacer una primera aproximación diagnóstica lo antes posible.
2. La presencia de siembras vítreas tiene un valor pronóstico comprobado en cuanto a la conservación del globo ocular.
3. La quimiorreducción junto con los tratamientos de consolidación focal es la pauta terapéutica que presenta un mejor pronóstico, tanto considerando la conservación del globo ocular como la funcionalidad visual.
4. La quimioterapia administrada de forma aislada no solo tiene un alto índice de fracasos, valorado como enucleaciones, sino que estas se realizan en un corto periodo de tiempo desde el inicio del tratamiento.
5. Dadas las limitaciones del conocimiento de la genética del retinoblastoma, no todas las alteraciones son conocidas actualmente. Consideramos que debe hacerse estudio genético a todos los pacientes diagnosticados, y ser sujeto de exploraciones periódicas todos los pacientes y familiares que presenten la mutación identificada en la línea germinal, así como todos los pacientes y todos sus descendientes en los casos en los que la mutación en la línea germinal no haya podido ser identificada. También en los casos en los que la enfermedad se haya manifestado de forma unilateral.

6. Debemos tener en cuenta la posible condición de mosaico de los progenitores de los pacientes con afectación de la línea germinal en los que esta no se ha identificado en sus padres. En este caso, el estudio debe incluir a una segunda línea de parentesco.

7. Actualmente el análisis genético permite identificar la alteración de la línea germinal en al menos el 76,47% de los pacientes con antecedentes familiares, el 44,89,5 de los pacientes sin antecedentes familiares y el 24% de los pacientes sin antecedentes y enfermedad unilateral.

El análisis genético de los pacientes con retinoblastoma, así como el de sus familiares, cuando sea preciso, debe ser una herramienta que se incorpore de forma habitual a la práctica clínica diaria. Dado el balance coste beneficio, sobretodo teniendo en cuenta la relación que hay entre la unilateralidad o bilateralidad con la presencia de alteración genética de la línea germinal, así como las diferencias de expresividad y penetrancia de la enfermedad, el análisis genético se debe llevar a cabo en todos los casos.

8. Los pacientes tratados con quimioterapia en los que se ha identificado la mutación de la línea germinal y que presentan mayor tasa de enucleación son los que presentan alteraciones del tipo delección. Todos los pacientes con delección han sido resistentes a la quimioterapia y han precisado enucleación.

Los pacientes con un genotipo que presente mayor resistencia a la quimioterapia deben ser evaluados más estrechamente y tratados con varias armas terapéuticas de forma precoz.

9. El análisis genético intratumoral permite identificar la alteración de los dos alelos en el 47% de los casos, y solo de uno de ellos en el 23,5%. Demostrando la necesidad del estudio genético en los casos con manifestación unilateral.

Si se identifica la mutación en la línea germinal en los casos en los que la enfermedad se presenta de forma unilateral el protocolo terapéutico es más conservador, dado el riesgo cuantificable de bilateralización tardía. El objetivo es conservar, en la medida de lo posible, ambos globos oculares.

El análisis intratumoral de los casos unilaterales permite identificar de forma sencilla el patrón genético y si se afecta la línea germinal, advirtiendonos de los riesgos que conlleva.

10. Considerando los quistes pineales como una forma pre-maligna del pinealoblastoma. Es más frecuente encontrar asociación con mutación de la línea germinal, tanto en casos unilaterales como bilaterales que en el resto de los pacientes.

11. El consejo genético es, sobretodo, una herramienta informativa, tanto para los pacientes como para sus familiares; la identificación de las alteraciones genéticas que son el origen de la enfermedad en cada individuo nos permiten informar del riesgo real de que la enfermedad se transmita a la descendencia. Un caso especial son los casos en los que se han podido describir variantes de la enfermedad de baja penetrancia.

12. No todas las mutaciones están identificadas, nuevos estudios y nuevos modelos de análisis deben investigarse para tener un mayor conocimiento de la enfermedad, tanto en los aspectos clínicos y epidemiológicos como en los pronósticos.

13. Las mutaciones de la línea germinal en los pacientes sin antecedentes familiares (mutaciones de novo) la mayoría se localizan en regiones no codificantes, o intrones. Dada la poca experiencia del análisis genético aun no conocemos la penetrancia y expresividad de este tipo de alteraciones.

14. Identificar a los pacientes portadores de la mutación permite no solo poder hacer un diagnóstico más temprano, proporcionando un tratamiento precoz y unos mejores resultados pronósticos sino también, poder excluir a los pacientes sanos y sin alteraciones genéticas de exploraciones oftalmológicas que serian innecesarias. Esto constituye un importante ahorro para el sistema sanitario, tanto en el tiempo en consultas periódicas, como en las exploraciones bajo anestesia, así como la ansiedad y el estrés transmitido al sujeto en estudio, así como a sus padres, en los casos en los que no es preciso.

15. El estudio genético es una herramienta con valor no solo diagnóstico sino también pronóstico. En cuanto que nos ayuda a determinar la agresividad de la enfermedad así como la susceptibilidad a responder a los distintos tratamientos.
16. En un tiempo futuro la ingeniería genética podría servir como arma terapéutica, al corregir las alteraciones que llevan a la pérdida de heterocigosidad del rb, o al menos a la síntesis de una proteína truncada o disfuncional.
17. Nuestro grupo de estudio ha participado en la construcción de la nueva clasificación internacional a partir de la base de datos localizada en la dirección <https://www.uhnres.utoronto.ca/rbabc/rbclass/site/patient/home.php> aportando la experiencia con nuestros pacientes.
18. Del mismo modo hemos colaborado en la construcción de Registro Genético Internacional, donde se identifica y clasifica todas las mutaciones identificadas en el gen RB de los pacientes con retinoblastoma.
19. El estudio de esta serie de pacientes ha servido como base fundamental para el desarrollo de múltiples publicaciones y comunicaciones a congresos, muchos de ellos de carácter internacional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abramson DH. Retinoblastoma 1990: diagnosis, treatment and implications. *Pediatr Ann* 1990; 19:387-95.
2. Suckling RD, Fitzgerald PH, Stewart J, Wells E. The incidence and epidemiology of retinoblastoma in New Zealand: A 30-year survey. *Br J Cancer*. 1982 Nov; 46(5):729-36.
3. O'Day J, Billson FA, Hoyt CS. Retinoblastoma in Victoria. *Med J Aust*. 1977 Sep 24;2(13):428-32.
4. Kock E, Naeser P. Retinoblastoma in Sweden 1958--1971. A clinical and histopathological study. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1979 Jun;57(3):344-50.
5. Devesa SS. The incidence of retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 1975; 80:263-5.
6. Mahoney MC, Burnett WS, Majerovics A, Tanenbaum H. The epidemiology of ophthalmic malignancies in New York State. *Ophthalmology* 1990; 97:1143-7.
7. Sanders BM, Draper GJ, Kingston JE. Retinoblastoma in Great Britain 1969-1980: incidence, treatment, and survival. *Br J Ophthalmol* 1988; 72:576-83.
8. Gombos DS, Diba R. Estimating the incidence of retinoblastoma in Texas. *Tex Med*. 2005 Jul;101(7):70-2.

9. Broaddus E, Topham A, Singh AD. Incidence of Retinoblastoma in the United States: 1975-2004. *Br J Ophthalmol*. 2008 Jul 11.
10. Fajardo-Gutiérrez A, Juárez-Ocaña S, González-Miranda G, Palma-Padilla V, Carreón-Cruz R, Mejía-Aranguré JM. [General and specific incidence of cancer among children affiliated to the Mexican Institute of Social Security] *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2007 Nov-Dec;45(6):579-92.
11. Azar D, Donaldson C, Kalapesi F, Cumming R. Retinoblastoma in New South Wales 1975 to 2001. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2006 Oct;28(10):642-6.
12. Seregard S, Lundell G, Svedberg H, Kivelä T. Incidence of retinoblastoma from 1958 to 1998 in Northern Europe: advantages of birth cohort analysis. *Ophthalmology*. 2004 Jun;111(6):1228-32.
13. Abiose A, Adido J, Agarwal SC. Childhood malignancies of the eye and orbit in northern Nigeria. *Cancer*. 1985 Jun 15;55(12):2889-93.
14. Chakrabarti AK, Biswas G, Das S. Malignant orbital tumours: observation in north Bengal. *J Indian Med Assoc*. 1993 Jun;91(6):154-5.
15. Makata AM, Toriyama K, Kamidigo NO, Eto H, Itakura H. . The pattern of pediatric solid malignant tumors in western Kenya, east Africa, 1979-1994: an analysis based on histopathologic study. *Am J Trop Med Hyg*. 1996 Apr;54(4):343-7
16. Ka AS, Imbert P, Moreira C, Niang A, Baujat G, Seye MN, Guyon P. [Epidemiology and prognosis of childhood cancers in Dakar, Senegal] *Med Trop (Mars)*. 2003;63(4-5):521-6..
17. Koulibaly M, Kabba IS, Cissé A, Diallo SB, Diallo MB, Keita N, Camara ND, Diallo MS, Sylla BS, Parkin DM. Cancer incidence in Conakry, Guinea: first results from the Cancer Registry 1992-1995. *Int J Cancer*. 1997 Jan 6;70(1):39-45.
18. Nandakumar A, Anantha N, Appaji L, Swamy K, Mukherjee G, Venugopal T, Reddy S, Dhar M. Descriptive epidemiology of childhood cancers in Bangalore, India. *Cancer Causes Control*. 1996 Jul;7(4):405-10.
19. Nguyen MQ, Nguyen CH, Kramárová E, Parkin DM. Incidence of childhood cancer in Ho Chi Minh City, Vietnam, 1995-97. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2000 Jul;14(3):240-7.
20. Patil PS, Elem B, Gwavava NJ, Urban MI. The pattern of paediatric malignancy in Zambia (1980-1989): a hospital-based histopathological study. *J Trop Med Hyg*. 1992 Apr;95(2):124-7. Erratum in: *J Trop Med Hyg* 1992 Dec;95(6):434.
21. Poso MY, Mwanza JC, Kayembe DLJ . [Malignant tumors of the eye and adnexa in Congo-Kinshasa] *Fr Ophtalmol*. 2000 Apr;23(4):327-32
22. Tefuarani N, Vince JD, Murthy DP, Sengupta SK, White JC. Childhood malignant tumours in Papua New Guinea. *Ann Trop Paediatr*. 1988 Dec;8(4):201-6.
23. Thakur SK, Sah SP, Lakhey M, Badhu BP. Primary malignant tumours of eye and adnexa in Eastern Nepal. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2003 Oct;31(5):415-7.
24. Tijani SO, Elesha SO, Banjo AA. Morphological patterns of paediatric solid cancer in Lagos, Nigeria. *West Afr J Med*. 1995 Jul-Sep;14(3):174-80.

25. Traboulsi EI, Jurdi-Nuwayhid F, Frangieh GT, Der Kaloustian VM. Retinoblastoma in Lebanon. *Ophthalmic Paediatr Genet.* 1986 Mar;7(1):29-34.
26. Welbeck JE, Hesse AA. Pattern of childhood malignancy in Korle Bu Teaching Hospital, Ghana. *West Afr J Med.* 1998 Apr-Jun;17(2):81-4.
27. Wessels G, Hesselink PB. Incidence and frequency rates of childhood cancer in Namibia. *S Afr Med J.* 1997 Jul;87(7):885-9.
28. Matsunaga E. [Genetics and epidemiology of retinoblastoma] *Gan No Rinsho.* 1987 Apr;33(5 Suppl):507-13.
29. Buckley JD. The aetiology of cancer in the very young. *Br J Cancer Suppl.* 1992 Aug;18:S8-12.
30. Knudson AG Jr. Genetics and the etiology of childhood cancer. *Pediatr Res.* 1976 May;10(5):513-7.
31. Friend SH, Horowitz JM, Gerber MR, Wang XF, Bogenmann E, Li FP, Weinberg RA. Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Dec;84(24):9059-63. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 Apr;85(7):2234.
32. Orjuela MA, Titievsky L, Liu X, Ramirez-Ortiz M, Ponce-Castaneda V, Lecona E, Molina E, Beaverson K, Abramson DH, Mueller NE. Fruit and vegetable intake during pregnancy and risk for development of sporadic retinoblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Jun;14(6):1433-40.
33. Vogel F. Genetics of retinoblastoma. *Hum Genet* 1979; 52:1-54.
34. Sorahan T, Stewart AM. Retinoblastoma and fetal irradiation. *BMJ* 1993; 307:870.
35. Tamboli A, Podgor MJ, Horm JW. The incidence of retinoblastoma in the United States: 1974 through 1985. *Arch Ophthalmol* 1990; 108:128-32.
36. Saw SM, Tan N, Lee SB, Au Eong KG, Chia KS. Incidence and survival characteristics of retinoblastoma in Singapore from 1968-1995. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2000; 37:87-93.
37. 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; 84:155-8.
38. Freedman J, Goldberg L. Incidence of retinoblastoma in the Bantu of South Africa. *Br J Ophthalmol* 1976; 60:655-6.
39. Orjuela M, Castaneda VP, Ridaura C, et al. Presence of human papilloma virus in tumor tissue from children with retinoblastoma: an alternative mechanism for tumor development. *Clin Cancer Res* 2000; 6:4010-6.
40. Chetty R, Bramdev A, Aguirre-Arteta A, Pegoraro RJ, Sataar N. Relation between retinoblastoma and p53 proteins in human papilloma viruses 16/18 positive and negative cancers of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 1997; 50:413-6.
41. Anteby I, Cohen E, Anteby E, BenEzra D. Ocular manifestations in children born after in vitro fertilization. *Arch Ophthalmol* 2001; 119:1525-9.

42. Schieve LA, Rasmussen SA, Buck GM, Schendel DE, Reynolds MA, Wright VC. Are children born after assisted reproductive technology at increased risk for adverse health outcomes? *Obstet Gynecol* 2004; 103:1154-63.
43. DerKinderen DJ, Kolen JW, Tan KE, Beemer FA, Van Romunde LK, Den Otter W. Parental age in sporadic hereditary retinoblastoma. *Am J Ophthalmol*. 1990 Dec 15;110(6):605-9.
44. Dockerty JD, Draper G, Vincent T, Rowan SD, Bunch KJ. Case-control study of parental age, parity and socioeconomic level in relation to childhood cancers. *Int J Epidemiol*. 2001 Dec;30(6):1428-37.
45. Dryja TP, Morrow JF, Rapaport JM. Quantification of the paternal allele bias for new germline mutations in the retinoblastoma gene. *Hum Genet*. 1997 Sep;100(3-4):446-9.
46. Moll AC, Imhof SM, Kuik DJ, Bouter LM, Den Otter W, Bezemer PD, Kolen JW, Tan KE. High parental age is associated with sporadic hereditary retinoblastoma: the Dutch retinoblastoma register 1862-1994. *Hum Genet*. 1996 Jul;98(1):109-12.
47. Sivakumaran TA, Ghose S, Kumar H, A S, Kucheria K. Parental age in Indian patients with sporadic hereditary retinoblastoma. *Ophthalmic Epidemiol*. 2000 Dec;7(4):285-91.
48. Strong LC, Herson J, Haas C, Elder K, Chakraborty R, Weiss KM, Majumder P. Cancer mortality in relatives of retinoblastoma patients. *J Natl Cancer Inst*. 1984 Aug;73(2):303-11.
49. Poncet P, Levy C, Doz F, et al. Unilateral retinoblastomas with late bilateralization. Three case reports. *J Fr Ophtalmol* 1998; 21:223-6.
50. Rubinfeld M, Abramson DH, Ellsworth RM, Kitchin FD. Unilateral vs. bilateral retinoblastoma. Correlations between age at diagnosis and stage of ocular disease. *Ophthalmology* 1986; 93:1016-9.
51. Abramson DH, Frank CM, Susman M, Whalen MP, Dunkel IJ, Boyd NW III. Presenting signs of retinoblastoma. *J Pediatr* 1998; 132:505-8.
52. Abramson DH, Servodidio CA. Retinoblastoma in the first year of life. *Ophthalm Paediat Genet* 1992; 13:191-203.
53. Takahashi T, Tamura S, Inoue M, Isayama Y, Sashikata T. Retinoblastoma in an 26 year old-adult. *Ophthalmology* 1983; 90:179-83.
54. Shields CL, Shields JA, Shah P. Retinoblastoma in older children. *Ophthalmology* 1991; 98:395-9.
55. Salim A, Wiknjosastro GH, Danukusumo D, Barnas B, Zalud I. Fetal retinoblastoma. *J Ultrasound Med* 1998; 17:717-20.
56. Niebuhr E, Ottosen J. Ring chromosome D (13) associated with multiple congenital malformations. *Ann Genet* 1973; 16:157-66.
57. Bojinova RI, Schorderet DF, Addor MC, et al. Further delineation of the facial 13q14 deletion syndrome in 13 retinoblastoma patients. *Ophthalmic Genet* 2001; 22:11-8.
58. Jensen RD, Miller RW. Retinoblastoma: epidemiologic characteristics. *N Engl J Med* 1971; 285:307-11.

59. Seidman DJ, Shields JA, Augsburger JJ, Nelson LB, Lee ML, Sciorra LJ. Early diagnosis of retinoblastoma based on dysmorphic features and karyotype analysis. *Ophthalmology* 1987; 94:663-6.
60. Abramson DH, Notterman RB, Ellsworth RM, Kitchin FD. Retinoblastoma treated in infants in the first six months of life. *Arch Ophthalmol* 1983; 101:1362-6.
61. Haik BG, Dunleavy SA, Cooke C, et al. Retinoblastoma with anterior chamber extension. *Ophthalmology* 1987; 94:367-70.
62. Shields JA, Shields CL, Suvarnamani C, Schroeder RP, De Potter P. Retinoblastoma manifesting as orbital cellulitis. *Am J Ophthalmol* 1991; 112:442-9.
63. Grossniklaus HE, Dhaliwal RS, Martin DF. Diffuse anterior retinoblastoma. *Retina* 1998; 18:238-41.
64. Balasubramanya R, Pushker N, Bajaj MS, Ghose S, Kashyap S, Rani A. Atypical presentations of retinoblastoma. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2004; 41:18-24.
65. Canzano JC, Handa JT. Utility of pupillary dilation for detecting leukocoria in patients with retinoblastoma. *Pediatrics*. 1999 Oct;104(4):e44.
66. Abramson DH, Beaverson K, Sangani P, et al. Screening for retinoblastoma: presenting signs as prognosticators of patient and ocular survival. *Pediatrics* 2003; 112:1248-55.
67. Ryan.
68. Tapper D, Langer R, Bellows AR, Folkman J. Angiogenesis capacity as a diagnostic marker for human eye tumors. *Surgery*. 1979 Jul;86(1):36-40.
69. Marback EF, Arias VE, Paranhos A Jr, Soares FA, Murphree AL, Erwenne CM. Tumour angiogenesis as a prognostic factor for disease dissemination in retinoblastoma. *Br J Ophthalmol*. 2003 Oct;87(10):1224-8.
70. Rössler J, Dietrich T, Pavlakovic H, Schweigerer L, Havers W, Schüler A, Bornfeld N, Schilling H. Higher vessel densities in retinoblastoma with local invasive growth and metastasis. *Am J Pathol*. 2004 Feb;164(2):391-4.
71. Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Bröcker EB, Friedl P. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol*. 2003 Jan 20;160(2):267-77. Epub 2003 Jan 13.
72. Goddard AG, Kingston JE, Hungerford JL. Delay in diagnosis of retinoblastoma: risk factors and treatment outcome. *Br J Ophthalmol* 1999; 83:1320-3.
73. Butros LJ, Abramson DH, Dunkel IJ. Delayed diagnosis of retinoblastoma: analysis of degree, cause, and potential consequences. *Pediatrics* 2002; 109:e45.
74. Canzano JC, Handa JT. Utility of pupillary dilation for detecting leukocoria in patients with retinoblastoma. *Pediatrics* 1999; 104:e44.
75. Chow KN, Starostik P, Dean DC. The Rb family contains a conserved cyclin-dependent-kinase-regulated transcriptional repressor motif. *Mol Cell Biol*. 1996 Dec;16(12):7173-81.
76. Margolis R. Fluorescein angiogram detects iris neovascularization in eyes with advanced retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2004;(submitted).

77. Finger PT, Meskin SW, Wisnicki HJ, Albekioni Z, Schneider S. High-frequency ultrasound of anterior segment retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 2004; 137:944-6.
78. Alvarez ML, Barbón JJ, González LO, Abelairas J, Boto A, Vizoso FJ. Apolipoprotein D expression in retinoblastoma. *Ophthalmic Res.* 2003 Mar-Apr;35(2):111-6.
79. Cebulla C, Jockovich ME, Pina Y, Boutrid H, Alegret A, Kulak A, Hackam AS, Bhattacharya SK, Feuer WJ, Murray T. Basic Fibroblast Growth Factor impact on retinoblastoma progression and survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 Jul 9.
80. Piro PA Jr, Abramson DH, Ellsworth RM, Kitchin D. Aqueous humor lactate dehydrogenase in retinoblastoma patients. Clinicopathologic correlations. *Arch Ophthalmol* 1978; 96:1823-5.
81. Augsburger JJ, Shields JA, Folberg R, Lang W, O'Hara BJ, Claricci JD. Fine needle aspiration biopsy in the diagnosis of intraocular cancer. Cytologic-histologic correlations. *Ophthalmology.* 1985 Jan;92(1):39-49.
82. Karcioğlu ZA. Fine needle aspiration biopsy (FNAB) for retinoblastoma. *Retina.* 2002 Dec;22(6):707-10.
83. Roberts CW, Iwamoto M, Haik BC. Ultrastructural correlation of specular microscopy in retinoblastoma. *Am J Ophthalmol.* 1986 Aug 15;102(2):182-7.
84. Shields JA. Misconceptions and techniques in the management of retinoblastoma. The 1992 Paul Henkind Memorial Lecture. *Retina* 1992; 12:320-30.
85. Roth DB, Scott IU, Murray TG, et al. Echography of retinoblastoma: histopathologic correlation and serial evaluation after globe-conserving radiotherapy or chemotherapy. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2001; 38:136-43.
86. Yang MS, Hu YJ, Lin KC, Lin CC. Segmentation techniques for tissue differentiation in MRI of ophthalmology using fuzzy clustering algorithms. *Magn Reson Imaging* 2002; 20:173-9.
87. Coleman DJ. Reliability of ocular tumor diagnosis with ultrasound. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1973 Sep-Oct;77(5):OP677-86.
88. Sterns GK, Coleman DJ, Ellsworth RM. Characterization and evaluation of retinoblastoma by ultrasonography. *Bibl Ophthalmol.* 1975;(83):125-9.
89. Sterns GK, Coleman DJ, Ellsworth RM. The ultrasonographic characteristics of retinoblastoma. *Am J Ophthalmol.* 1974 Oct;78(4):606-11.
90. McNicholas MM, Brophy DP, Power WJ, Griffin JF. Ocular sonography. *Am J Roentgenol* 1994; 163:921-6.
91. Berrocal T, De Orbe A, Prieto C, et al. Common and uncommon US manifestations of retinoblastoma with pathologic correlation. *Ultrasound Med Biol* 1997; 23(Supl 1):81.
92. Lieb WE, Shields JA, Cohen SM, et al. Color Doppler imaging in the management of intraocular tumors. *Ophthalmology* 1990; 97:1660-4.
93. Summers CG. Calcification of scleral-wrapped orbital implant in patients with retinoblastoma. *Pediatr Radiol.* 1993;23(1):34-6.

94. Finger PT, Khoobehi A, Ponce-Contreras MR, Rocca DD, Garcia JP Jr. Three dimensional ultrasound of retinoblastoma: initial experience. *Br J Ophthalmol.* 2002 Oct;86(10):1136-8.
95. Maat-Kievit JA, Oepkes D, Hartwig NG, Vermeij-Keers C, van Kamp IL, van de Kamp JJ. A large retinoblastoma detected in a fetus at 21 weeks of gestation. *Prenat Diagn* 1993; 13:377-84.
96. Tateishi U, Hasegawa T, Miyakawa K, Sumi M, Moriyama N. CT and MRI features of recurrent tumors and second primary neoplasms in pediatric patients with retinoblastoma. *AJR Am J Roentgenol.* 2003 Sep;181(3):879-84.
97. Char DH, Hedges TR, Norman D. Retinoblastoma. CT diagnosis. *Ophthalmology* 1984; 91:1347-50.
98. O'Brien JM, Char DH, Tucker N, Gordon KB, Norman D. Efficacy of unanesthetized Spiral Computed Tomography Scanning in initial evaluation of childhood leukocoria. *Ophthalmology* 1995; 102:1345-50.
99. Haik BG, Saint Louis L, Smith ME, Abramson DH, Ellsworth RM. Computed tomography of the nonrhegmatogenous retinal detachment in the pediatric patient. *Ophthalmology.* 1985 Aug;92(8):1133-42.
100. Pelak VS, Volpe NJ, Liu GT, Galetta SL. *Neuroradiology in Ophthalmology.* *Ophthalmol Clin North Am* 1998; 11:339-58.
101. Kaufman LM, Mafee MF, Song CD. Retinoblastoma and simulating lesions. Role of CT, MR Imaging and use of Gd-DTPA contrast enhancement. *Radiol Clin North Am* 1998; 36:1101-17.
102. Dudgeon J, Lee WR. The trilateral retinoblastoma syndrome. *Trans Ophthalmol Soc U K.* 1983;103 (Pt 5):523-9.
103. Zimmerman LE. "Trilateral retinoblastoma". *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 1983 Mar-Apr;20(2):74.
104. Beets-Tan RGH, Hendriks MJ, Ramos LMP. Retinoblastoma: CT and MRI. *Neuroradiology* 1994; 36:59-62.
105. Royo A, García P. Aplicaciones de la Tomografía Computarizada y la Resonancia Magnética en los tratamientos del retinoblastoma previos o complementarios a la cirugía. En: *Actualización en Cirugía Oftálmica Pediátrica.* Tecnimedia Editorial SL. Madrid 2000; 281-7.
106. MacKay CJ, Abramson DH, Elsworth RM. Metastatic patterns of retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1984; 102:391-6.
107. Magrann I, Abramson DH, Ellsworth RM. Optic nerve involvement in retinoblastoma. *Ophthalmology* 1989; 96:217-22.
108. Shields CL, Shields JA, Baez K, Cater JR, De Potter P. Optic nerve invasion of retinoblastoma. Metastatic potential and clinical risk factors. *Cancer* 1994; 73:692-8.
109. Doz F, Khelifaoui F, Mosseri V, et al. The role of chemotherapy in orbital involvement of retinoblastoma: the experience of a single institution with 33 patients. *Cancer* 1994; 74:722-32.

110. Messmer EP, Heinrich T, Höpping W, de Sutter E, Havers W, Sauerwein W. Risk factors for metastases in patients with retinoblastoma. *Ophthalmology* 1991; 98:136-41.
111. Khelifaoui F, Validire P, Auperin A, et al. Histopathologic risk factors in retinoblastoma: a retrospective study of 172 patients treated in a single institution. *Cancer* 1996; 77:1206-13.
112. Shields CL, Shields JA, Baez KA, Cater J, De Potter P. Choroidal invasion of retinoblastoma: metastatic potential and clinical risk factors. *Br J Ophthalmol* 1993; 77:544-8.
113. Uusitalo MS, van Quill KR, Scott IU, Matthay KK, Murray TG, O'Brien JM. Evaluation of chemoprophylaxis in patients with unilateral retinoblastoma with high-risk features on histopathologic examination. *Arch Ophthalmol* 2001; 119:41-8.
114. Shields CL, Shields JA. Recent developments in the management of retinoblastoma. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1999; 36:8-18.
115. Pradhan DG, Sandridge AL, Mullaney P, et al. Radiation therapy for retinoblastoma: a retrospective review of 120 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 39:3-13.
116. DeCaprio JA, Ludlow JW, Lynch D, Furukawa Y, Griffin J, Piwnica-Worms H, Huang CM, Livingston DM. The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell*. 1989 Sep 22;58(6):1085-95.
117. Binder PS. Unusual manifestations of retinoblastoma. *Am J Ophthalmol*. 1974 May;77(5):674-9.
118. Ohnishi Y, Yamana Y, Minei M, Yoshitomi F. Snowball opacity in retinoblastoma. *Jpn J Ophthalmol*. 1982;26(2):159-65.
119. Sheta A. Some aspects on the different clinical characteristics of retinoblastoma. *Bull Ophthalmol Soc Egypt*. 1971;64(68):413-24.
120. Zakka KA, Yee RD, Foos RY. Retinoblastoma in a 12-year-old girl. *Ann Ophthalmol*. 1983 Jan;15(1):88-91..
121. Lopez JF, Alvarez JC. Atypical echographic forms of retinoblastomas. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1983 Nov-Dec;20(6):230-4.
122. Margo C, Hidayat A, Kopelman J, Zimmerman LE. Retinocytoma. A benign variant of retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*. 1983 Oct;101(10):1519-31.
123. Singh AD, Santos CM, Shields CL, Shields JA, Eagle RC Jr. Observations on 17 patients with retinocytoma. *Arch Ophthalmol*. 2000 Feb;118(2):199-205.
124. Jakobiec FA, Tso MO, Zimmerman LE, Danis P. Retinoblastoma and intracranial malignancy. *Cancer*. 1977 May;39(5):2048-58.
125. Bader JL, Meadows AT, Zimmerman LE, Rorke LB, Voute PA, Champion LA, Miller RW. Bilateral retinoblastoma with ectopic intracranial retinoblastoma: trilateral retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1982 Mar;5(3):203-13.
126. Kingston JE, Plowman PN, Hungerford JL. Ectopic intracranial retinoblastoma in childhood. *Br J Ophthalmol*. 1985 Oct;69(10):742-8.
127. Meadows A. Trilateral retinoblastoma. *Med Pediatr Oncol*. 1986;14(6):323-6.

128. Bullitt E, Crain BJ. Retinoblastoma as a possible primary intracranial tumor. *Neurosurgery*. 1981 Dec;9(6):706-9. 371.
129. Malik RK, Friedman HS, Djang WT, Falletta JM, Buckley E, Kurtzberg J, Kinney TR, Stine K, Chaffee S, et al. Treatment of trilateral retinoblastoma with vincristine and cyclophosphamide. *Am J Ophthalmol*. 1986 Nov 15; 102(5):650-6.
130. Kivela T. Trilateral retinoblastoma: a meta-analysis of hereditary retinoblastoma associated with primary ectopic intracranial retinoblastoma. *J Clin Oncol* 1999; 17:1829-37.
131. Duncan JL, Scott IU, Murray TG, Gombos DS, van Quill K, O'Brien JM. Routine neuroimaging in retinoblastoma for the detection of intracranial tumors. *Arch Ophthalmol* 2001; 119:450-2.
132. Nelson SC, Friedman HS, Oakes WJ, et al. Successful therapy for trilateral retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 1992; 114:23-9.
133. Jubran RF, Erdreich-Epstein A, Butturini A, Murphree AL, Villablanca JG. Approaches to treatment for extraocular retinoblastoma: Children's Hospital Los Angeles experience. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004; 26:31-4.
134. Shields CL, Meadows AT, Shields JA, Carvalho C, Smith AF. Chemoreduction for retinoblastoma may prevent intracranial neuroblastic malignancy (trilateral retinoblastoma). *Arch Ophthalmol* 2001; 119:1269-72.
135. Kiss S, Leiderman YI, Mukai S. Diagnosis, classification, and treatment of retinoblastoma. *Int Ophthalmol Clin*. 2008 Spring;48(2):135-47.
136. Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al, eds. *AJCC Cancer Staging Manual*. 6th ed. New York: Springer; 2002.
137. Sobin LH, Wittekind C. *UICC TNM Classification of Malignant Tumours*. 6th ed. New York: Wiley-Liss; 2002.
138. Reese AB, Ellsworth RM. The evaluation and current concept of retinoblastoma therapy. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1963; 67:164-72.
139. Höpping W. The new Essen prognosis classification for conservative sight-saving treatment of retinoblastoma in intraocular tumors. In: Lommatzsch PK, Blodi FC eds: *Intraocular Tumors: International Symposium under the auspices of the European Ophthalmological Society*. Berlin: Springer-Verlag, 1983; 497-505.
140. Pratt CB. Management of malignant solid tumors in children. *Pediatr Clin North Am* 1972; 19:1141-55.
141. Howarth C, Meyer D, Hustu HO, et al. Stage-related combined modality treatment of retinoblastoma: results of a prospective study. *Cancer* 1980; 45:851-8.
142. Reese AB, Ellsworth RM. Management of retinoblastoma. *Ann N Y Acad Sci*. 1964 Apr 2;114(2):958-62.
143. Ellsworth RM. The practical management of retinoblastoma. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1969;67:462-534.
144. Ellsworth RM. Retinoblastoma. *Mod Probl Ophthalmol* 1977; 18: 94-100.
145. de Sutter E, Havers W, Hopping W, Zeller G, Alberti W. The prognosis of retinoblastoma in terms of globe saving treatment. A computer assisted study. Part I. *Ophthalm Paediat Genet* 1987; 8:77-84.

146. de Sutter E, Havers W, Hopping W, Zeller G, Alberti W. The prognosis of retinoblastoma in terms of survival. A computer assisted study. Part II. *Ophthalm Paediat Genet* 1987; 8:85-8.
147. Abelairas JM, Peralta J, de las Heras A, Sánchez M. Manejo actual del Retinoblastoma. En: *Actualización en tumores intraoculares*. Tecnimedia Editorial S.L. Madrid, 1999; 187-92.
148. Shields CL, Mashayekhi A, Demirci H, Meadows AT, Shields JA. Practical approach to management of retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2004; 122:729-35.
149. Shields CL, Mashayekhi A, Au AK, Czyz C, Leahey A, Meadows AT, Shields JA. The International Classification of Retinoblastoma predicts chemoreduction success. *Ophthalmology*. 2006 Dec;113(12):2276-80.
150. Shields CL, Shields JA Basic understanding of current classification and management of retinoblastoma. *Curr Opin Ophthalmol*. 2006 Jun;17(3):228-34.
151. Murphree AL. A proposed new classification of intraocular retinoblastoma. *Scientific Papers. X International Congress of Ocular Oncology*. Amsterdam, 2001.
152. El Sawy E, Villablanca J, Jubran R, et al. Outcome in eyes with retinoblastoma confined to the retina. *Scientific Papers. X International Congress of Ocular Oncology*. Amsterdam, 2001.
153. Linn Murphree A. Intraocular retinoblastoma: the case for a new group classification. *Ophthalmol Clin North Am*. 2005 Mar;18(1):41-53, viii.
154. Chantada G, Doz F, Antoneli CB, Grundy R, Clare Stannard FF, Dunkel IJ, Grabowski E, Leal-Leal C, Rodríguez-Galindo C, Schwartzman E, Popovic MB, Kremens B, Meadows AT, Zucker JM. A proposal for an international retinoblastoma staging system. *Pediatr Blood Cancer*. 2006 Nov;47(6):801-5.
155. Albert, DM. Historic Review of Retinoblastoma. *Ophthalmology* 1987; 94:654-62.
156. Brisse HJ, Lumbroso L, Freneaux PC, et al. Sonographic, CT, and MR imaging findings in diffuse infiltrative retinoblastoma: report of two cases with histologic comparison. *Am J Neuroradiol* 2001; 22:499-504.
157. He W, Hashimoto H, Tsuneyoshi M, Enjoji M, Inomata H. A reassessment of Histologic Classification and a Immunohistochemical Study of 88 retinoblastomas. *Cancer* 1992; 70:2901-8.
158. Chong EM, Coffee RE, Chintagumpala M, Hurwitz RL, Hurwitz MY, Chévez-Barrios P. Extensively necrotic retinoblastoma is associated with high-risk prognostic factors. *Arch Pathol Lab Med*. 2006 Nov;130(11):1669-72.
159. McCaffery S, Wieland MR, O'Brien JM, Cooper KL, Wieland MR, Wendel RT. Atypical retinoblastoma presentations: a challenge for the treating ophthalmologist. *Arch Ophthalmol*. 2002 Sep;120(9):1222-5.
160. *South Med J*. 1970 Jan;63(1):4-8. Unusual presentations of retinoblastoma. Schuster SA, Ferguson EC 3rd.
161. Stafford WR, Yanoff M, Parnell BL. Retinoblastomas initially misdiagnosed as primary ocular inflammations. *Arch Ophthalmol*. 1969 Dec;82(6):771-3.

162. Flick H, Schwab B. [Infiltrating retinoblastoma - a difficult differential diagnosis (author's transl)]*Klin Monatsbl Augenheilkd.* 1980;177(2):220-4.
163. Fan RF, Ling YH. Pseudohypopyon--an unusual presenting sign in retinoblastoma. *Singapore Med J.* 1991 Oct;32(5):368-70.
164. Rosselet E, Gailloud C, Verrey F. [Retinoblastoma and hypopyon] *Ophthalmologica.* 1970;161(2):139-44.
165. Shields JA, Shields CL, Eagle RC, Blair CJ. Spontaneous pseudohypopyon secondary to diffuse infiltrating retinoblastoma. *Arch Ophthalmol.* 1988 Sep;106(9):1301-2.
166. Bremner MH. Retinoblastoma in the anterior chamber of the eye. *Aust J Ophthalmol.* 1983 May;11(2):123-6.
167. Robins HI, d'Oleire F, Kutz M, Bird A, Schmitt-Tiggelaar CL, Cohen JD, Spriggs DR. Cytotoxic interactions of tumor necrosis factor, melphalan and 41.8 degrees C hyperthermia. *Cancer Lett.* 1995 Feb 10;89(1):55-62.
168. Kovanlikaya A, Nelson MD Jr, Murphree AL. Radiological case of the month. Retinoblastoma presenting with orbital cellulitis. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1996 Aug;150(8):873-4.
169. Ruiz del Río N, Abelairas Gómez JM, Peralta Calvo JM, Miranda Lloret P. Atypical retinoblastoma in Sotos syndrome (cerebral gigantism). *Arch Ophthalmol.* 2007 Apr;125(4):578-80.
170. Anteby I, Ramu N, Gradstein L, Miskin H, Pe'er J, Benezra D. Ocular and orbital complications following the treatment of retinoblastoma. *Eur J Ophthalmol.* 1998 Apr-Jun;8(2):106-11.
171. Irvine AR, Albert DM, Sang DN. Retinal neoplasia and dysplasia. II. Retinoblastoma occurring with persistence and hyperplasia of the primary vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1977 May;16(5):403-7.
172. Gallie BL, Ellsworth RM, Abramson DH, Phillips RA. Retinoma: spontaneous regression of retinoblastoma or benign manifestation of the mutation? *Br J Cancer.* 1982 Apr;45(4):513-21.
173. Gallie BL, Phillips RA. Multiple manifestations of the retinoblastoma gene. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1982;18(6):689-701.
174. Kiratli H, Bilgiç S. Multiple bilateral retinomas. A case study. *J Fr Ophtalmol.* 2006 Jan;29(1):58-60.
175. Sanborn GE, Augsburger JJ, Shields JA. Spontaneous regression of bilateral retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* 1982; 66:685-90.
176. Theodossiadis P, Emfietzoglou I, Grigoropoulos V, Moschos M, Theodossiadis GP. Evolution of a retinoma case in 21 years. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging.* 2005 Mar-Apr;36(2):155-7.
177. Eagle RC Jr, Shields JA, Donoso L, Milner RS. Malignant transformation of spontaneously regressed retinoblastoma, retinoma/retinocytoma variant. *Ophthalmology.* 1989 Sep;96(9):1389-95.

178. Eagle RC Jr, Shields JA, Donoso L, Milner RS. Malignant transformation of spontaneously regressed retinoblastoma, retinoma/retinocytoma variant. *Ophthalmology* 1989; 96:1389-95.
179. Lueder GT, Héon E, Gallie BL. Retinoma associated with vitreous seeding. *Am J Ophthalmol* 1995; 119:522-3.
180. Dimaras H, Khetan V, Halliday W, Orlic M, Prigoda NL, Piovesan B, Marrano P, Corson TW, Eagle RC Jr, Squire JA, Gallie BL. Loss of RB1 induces non-proliferative retinoma: increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma. *Hum Mol Genet.* 2008 May 15;17(10):1363-72.
181. Balmer A, Munier F, Gailloud C. Retinoma. Case studies. *Ophthalmic Paediatr Genet.* 1991 Sep;12(3):131-7.
182. Lueder GT, Héon E, Gallie BL. Retinoma associated with vitreous seeding. *Am J Ophthalmol.* 1995 Apr;119(4):522-3.
183. Bhatnagar R, Vine AK. Diffuse infiltrating retinoblastoma. *Ophthalmology.* 1991 Nov;98(11):1657-61.
184. Mansour AM, Greenwald MJ, O'Grady R. Diffuse infiltrating retinoblastoma. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 1989 May-Jun;26(3):152-4.
185. Girard B, Brezin A, Gaumond MC, D'Hermies F, Berges O, Cabanis EA, Iba-Zizen MT, Rousselie F. [Diffuse retinoblastoma--a propos of a case] *Bull Soc Ophtalmol Fr.* 1989 Jan;89(1):25-30.
186. Shields JA, Shields CL, Materin M. Diffuse infiltrating retinoblastoma presenting as a spontaneous hyphema. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 2000 Sep-Oct;37(5):311-2.
187. Kao LY. Diffuse infiltrating retinoblastoma: an inherited case. *Retina.* 2000;20(2):217-9.
188. Benedict WF, Murphree AL, Banerjee A, Spina CA, Sparkes MC, Sparkes RS. Patient with 13 chromosome deletion: evidence that the retinoblastoma gene is a recessive cancer gene. *Science.* 1983 Feb 25;219(4587):973-5.
189. Schipper J, Imhoff SM, Tan KE. Precision megavoltage external beam radiation therapy for retinoblastoma. *Front Radiat Ther Oncol.* 1997;30:65-80.
190. Khodadoust AA, Roozitalab HM, Smith RE, Green WR. Spontaneous regression of retinoblastoma. *Surv Ophthalmol* 1977; 21:467-78.
191. Gallie BL, Phillips RA, Ellsworth RM, Abramson DH. Significance of retinoma and phthisis bulbi for retinoblastoma. *Ophthalmology* 1982; 89:1393-9.
192. Lam A, Shields CL, Manquez ME, Shields JA. Progressive resorption of a presumed spontaneously regressed retinoblastoma over 20 years. *Retina.* 2005 Feb-Mar;25(2):230-1.
193. Abramson DH. Retinoma, retinocytoma and the retinoblastoma gene. *Arch Ophthalmol* 1983; 101:1517-8.
194. Kingston JE, Hungerford JL, Madreperla SA, Plowman PN. Results of combined chemotherapy and radiotherapy for advanced intraocular retinoblastoma. *Arch Ophthalmol.* 1996 Nov;114(11):1339-43.

195. Shidnia H, Hornback NB, Helveston EM, Gettlefinger T, Biglan AW. Treatment results of retinoblastoma at Indiana University Hospitals. *Cancer* 1977; 40:2917-22.
196. Kupfer C. Retinoblastoma treated by intravenous nitrogen mustard. *Am J Ophthalmol* 1953; 36:1721-3.
197. Reese AB, Hyman G, Merriam GR Jr, Forrest AW, Kligerman MM. Treatment of retinoblastoma by radiation and triethylenemelamine. *Arch Ophthalmol* 1954; 53:505-13.
198. Zelter M, González G, Schwartz L, et al. Treatment of retinoblastoma. Results obtained from a prospective study of 51 patients. *Cancer* 1988; 61:153-60.
199. White L. The role of chemotherapy in the treatment of retinoblastoma. *Retina*. 1983;3(3):194-9. Review.
200. Pratt CB, Crom DB, Howarth C. The use of chemotherapy for extraocular retinoblastoma. *Med Pediatr Oncol*. 1985;13(6):330-3.
201. Haye C, Desjardins L, Schlienger P, Zucker JM, Laurent M. Treatment of bilateral retinoblastoma stage V at the Curie Foundation. 33 cases. *Ophthalm Paediat Genet* 1987; 8:73-6.
202. White L. Chemotherapy in retinoblastoma: current status and future directions. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991; 13:189-201.
203. Deuchars KL, Ling V. P-glycoprotein and multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Semin Oncol* 1989; 16:156-65.
204. Chan HSL, Thorner PS, Haddad G, Gallie BL. Multidrug-resistant phenotype in retinoblastoma correlates with P-glycoprotein expression. *Ophthalmology* 1991; 98:1425-31.
205. Chan HSL, DeBoer G, Thiessen JJ, et al. Combining cyclosporin with chemotherapy controls intraocular retinoblastoma without requiring radiation. *Clin Cancer Res* 1996; 2:1499-508.
206. Chan HSL, Lu Y, Grogan TM, et al. Multidrug resistance protein (MRP) expression in retinoblastoma correlates with the rare failure of chemotherapy despite cyclosporine for reversal of P-glycoprotein. *Cancer Res* 1997; 57:2325-30.
207. Finger PT, Harbour JW, Karcioğlu ZA. Risk factors for metastasis in retinoblastoma. *Surv Ophthalmol* 2002; 47:1-16.
208. Howarth C, Meyer D, Hustu HO, et al. Stage-related combined modality treatment of retinoblastoma: results of a prospective study. *Cancer* 1980; 45:851-8.
209. Camassei FD, Cozza R, Acquaviva A, et al. Expression of the lipogenic enzyme fatty acid synthase (FAS) in retinoblastoma and its correlation with tumor aggressiveness. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:2399-403.
210. Yamashita N, Nishiuchi R, Oda M, et al. Molecular detection of metastatic retinoblastoma cells by reverse transcription polymerase reaction for interphotoreceptor retinoid-binding protein mRNA. *Cancer* 2001; 91:1568-73.
211. Honavar SG, Singh AD, Shields CL, et al. Postenucleation adjuvant therapy in high-risk retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2002; 120:923-31.
212. Chantada G, Fandino A, Davila MT, et al. Results of a prospective study for the treatment of retinoblastoma. *Cancer* 2004; 100:834-42.

213. Bellaton E, Bertozzi AI, Behar C, et al. Neoadjuvant chemotherapy for extensive unilateral retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* 2003; 87:327-9.
214. Kopelman JE, McLean IW, Rosenberg SH. Multivariate analysis of risk factors for metastasis in retinoblastoma treated by enucleation. *Ophthalmology* 1987; 94:371-7.
215. Zucker JM, Desjardins J, Doz F. Paediatric Update. Retinoblastoma. *Eur J Cancer* 1998; 34:1045-9.
216. Stevenson KE, Hungerford J, Garner A. Local extraocular extension of retinoblastoma following intraocular surgery. *Br J Ophthalmol* 1989; 73:739-42.
217. Shields CL, Honavar SG, Shields JA, Demirci H, Meadows AT. Vitrectomy in eyes with unsuspected retinoblastoma. *Ophthalmology* 2000; 107:2250-5.
218. Brooks HL Jr, Meyer D, Shields JA, Balas AG, Nelson LB, Fontanesi J. Removal of radiation-induced cataracts in patients treated for retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1990; 108:1701-8.
219. Honavar SG, Shields CL, Shields JA, Demirci H, Naduvilath TJ. Intraocular surgery after treatment of retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2001; 119:1613-21.
220. Pratt CB. Topical Topic. Use of chemotherapy for retinoblastoma. *Med Pediatr Oncol* 1998; 31:531-3.
221. Kingston JE, Hungerford JL, Plowman PN. Chemotherapy in metastatic retinoblastoma. *Ophthalm Paediat Genet* 1987; 8:69-72.
222. Doz F, Neusenschwander S, Plantaz D, et al. Etoposide and carboplatin in extraocular retinoblastoma: a study by the Société Française d'Oncologie Pédiatrique. *J Clin Oncol* 1995; 13:902-9.
223. Schwartzman E, Chantada G, Fandino A, de Davila MT, Raslawski E, Manzitti J. Results of a stage-based protocol for the treatment of retinoblastoma. *J Clin Oncol* 1996; 14:1532-6.
224. Namouni F, Doz F, Tanguy ML, et al. High-dose chemotherapy with carboplatin, etoposide and cyclophosphamide followed by a haematopoietic stem cell rescue in patients with high-risk retinoblastoma: a SFOP and SFGM study. *Eur J Cancer* 1997; 33:2368-75.
225. Goble RR, McKenzie J, Kingston JE, Plowman PN, Hungerford JL. Orbital recurrence of retinoblastoma successfully treated by combined therapy. *Br J Ophthalmol* 1990; 74:97-8.
226. Kiratli H, Bilgic S, Ozerdem U. Management of massive orbital involvement of intraocular retinoblastoma. *Ophthalmology* 1998; 105:322-6.
227. Hungerford JL, Kingston JE, Plowman PN. Orbital recurrence of retinoblastoma. *Ophthalm Paediat Genet* 1987; 8:63-8.
228. Saarinen UM, Sariola H, Hovi L. Recurrent disseminated retinoblastoma treated by high-dose chemotherapy, total body irradiation, and autologous bone marrow rescue. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991; 13:315-9.
229. Dunkel IJ, Aledo A, Kernan NA, et al. Successful treatment of metastatic retinoblastoma. *Cancer* 2000; 89:2117-21.

230. Kremens B, Wieland R, Reinhard H, et al. High-dose chemotherapy with autologous stem cell rescue in children with retinoblastoma. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31:281-4.
231. Rodriguez-Galindo C, Wilson MW, Haik BG, et al. Treatment of metastatic retinoblastoma. *Ophthalmology* 2003; 110:1237-40.
232. Marec-Berard P, Khelifaoui F, Frappaz D, et al. Prolonged remission in a child with late brain metastasis of retinoblastoma. *Arch Pediatr* 1996; 3:1001-5.
233. Tacyildiz N, Yavuz G, Unal E, Gunduz K, Gunalp I, Ekinici C. Encouraging result of tamoxifen in a retinoblastoma patient with central nervous system metastasis. *Pediatr Hematol Oncol* 2003; 20:473-6.
234. Dropcho EJ, Rosenfeld SS, Marawetz RB, et al. Preradiation intracarotid cisplatin treatment of newly diagnosed anaplastic gliomas. *J Clin Oncol* 1992; 10:452-8.
235. Duffner PK, Horowitz ME, Krisher JP, et al. Postoperative chemotherapy and delayed radiation in children less than three years of age with malignant brain tumors. *N Engl J Med* 1993; 328:1725-31.
236. Chamberlain MC, Barba D, Kormanik P, Berson A, Saunders WM, Shea MC. Concurrent cisplatin therapy and iodine 125 brachytherapy for recurrent malignant brain tumors. *Arch Neurol* 1995; 52:162-7.
237. Castel V, Badal MD, Bezanilla JL, et al. Treatment of stage III neuroblastoma with emphasis on intensive induction chemotherapy: a report from the Neuroblastoma Group of the Spanish Society of Pediatric Oncology. *Med Pediatr Oncol* 1995; 24:29-35.
238. Gaynon PS. Carboplatin in pediatric malignancies. *Semin Oncol* 1994; 21(5 suppl 12):65-76.
239. Cairo MS. The use of ifosfamide, carboplatin and etoposide in children with solid tumors. *Semin Oncol* 1995; 22(3 suppl 7):23-7.
240. Gallie BL, Budning A, DeBoer G, et al. Chemotherapy with focal therapy can cure intraocular retinoblastoma without radiotherapy. *Arch Ophthalmol* 1996; 114:1321-8.
241. Murphree AL, Villablanca JG, Deegan WF III, et al. Chemotherapy plus local therapy in the treatment of intraocular retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1996; 114:1348-56.
242. Shields CL, De Potter P, Himelstein BP, et al. Chemoreduction in the initial management of intraocular retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1996; 114:1330-8.
243. Greenwald MJ, Strauss LC. Treatment of intraocular retinoblastoma with carboplatin and etoposide chemotherapy. *Ophthalmology* 1996; 103:1989-97.
244. Ishii E, Matsuzaki A, Ohnishi Y, Kai T, Ueda K. Successful treatment with ranimustine and carboplatin for recurrent intraocular retinoblastoma with vitreous seeding. *Am J Clin Oncol* 1996; 19:562-5.
245. De Potter P. Current treatment of retinoblastoma. *Curr Opin Ophthalmol* 2002; 13:331-6.

246. Finger PT, Czechonska G, Demirci H, Rausen A. Chemotherapy for retinoblastoma: a current topic. *Drugs* 1999; 58:983-96.
247. Deegan WF. Emerging strategies for the treatment of retinoblastoma. *Curr Opin Ophthalmol* 2003; 14:291-5.
248. Eng C, Lin FP, Abramson DH, et al. Mortality from second tumors among long-terms survivors of retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:1121-8.
249. Abramson DH, Frank CM. Second nonocular tumors in survivors of bilateral retinoblastoma; a possible age effect on radiation-related risk. *Ophthalmology* 1998; 105:573-80.
250. Gombos DS, Kelly A, Coen PG, Kingston JE, Hungerford JL. Retinoblastoma treated with primary chemotherapy alone: the significance of tumour size, location, and age. *Br J Ophthalmol* 2002; 86:80-3.
251. Brichard B, De Bruycker JJ, De Potter P, Neven B, Vermeylen C, Cornu G. Combined chemotherapy and local treatment in the management of intraocular retinoblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2002; 38:411-5.
252. Draper GJ, Sanders BM, Kingston JE. Second primary neoplasms in patients with retinoblastoma. *Br J Cancer* 1986; 53:661-71.
253. Rosenthal S, Kaufman S. Vincristine neurotoxicity. *Ann Intern Med* 1974; 80:733-7.
254. Munier F, Perentes E, Herbort CP, Uffer S, Biollaz J. Selective loss of optic nerve beta-tubulin in vincristine-induced blindness. *Am J Med* 1992; 93:232-4.
255. Riccardi R, Riccardi A, Di Rocco C, et al. Cerebrospinal fluid pharmacokinetics of carboplatin in children with brain tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 1992; 30:21-4.
256. Abramson DH, Frank CM, Chantada GL, et al. Intraocular carboplatin concentrations following intravenous administration for human intraocular retinoblastoma. *Ophthalm Genet* 1999; 20:31-6.
257. O'Brien ME, Tonge K, Blake P, Moskovic E, Wiltshaw E. Blindness associated with high-dose carboplatin. *Lancet* 1992; 339:558.
258. Rankin EM, Pitts JF. Ophthalmic toxicity during carboplatin therapy. *Ann Oncol* 1993; 4:337-8.
259. Hawkins MM, Wilson LM, Stovall MA, et al. Epipodophyllotoxins, alkylating agents, and radiation and risk of secondary leukaemia after childhood cancer. *BMJ* 1992; 304:951-8.
260. Pui C, Ribeiro RC, Hancock ML, et al. Acute myeloid leukemia in children treated with epipodophyllotoxins for acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1991; 325:1682-7.
261. Winick NJ, McKenna RW, Shuster JJ, et al. Secondary acute myeloid leukemia in children with acute lymphoblastic leukemia treated with etoposide. *J Clin Oncol* 1993; 11:209-17.
262. Palestine AG, Nussenblatt RB, Chan CC. Cyclosporine penetration into the anterior chamber and cerebrospinal fluid. *Am J Ophthalmol* 1985; 99:210-1.

263. Feutren G. The optimal use of cyclosporin A in autoimmune diseases. *J Autoimmun* 1992;5:183-195.
264. Gündüz K, Shields CL, Shields JA, et al. The outcome of chemoreduction treatment in patients with Reese-Ellsworth group V retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1998; 116:1613-7.
265. Chan HS, Canton MD, Gallie BL. Chemosensitivity and multidrug resistance to antineoplastic drugs in retinoblastoma cell lines. *Anticancer Res* 1989; 9:469-74.
266. Kashani-Sabet M, Wang W, Scanlon KJ. Cyclosporin A suppresses cisplatin-induced c-fos gene expression in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 1990; 265:11285-8.
267. Slater LM, Cho J, Wetzel M. Cyclosporin A potentiation of VP-16: production of long-term survival in murine acute lymphatic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 1992; 31:53-6.
268. Shields CL, Shields JA, Needle M, et al. Combined chemoreduction and adjuvant treatment for intraocular retinoblastoma. *Ophthalmology* 1997; 104:2101-11.
269. Bechrakis NE, Bornfeld N, Schueler A, Coupland SE, Henze G, Foerster MH. Clinicopathologic features of retinoblastoma after primary chemoreduction. *Arch Ophthalmol* 1998; 116:887-93.
270. Sussman DA, Escalona-Benz E, Benz MS, et al. Comparison of retinoblastoma reduction for chemotherapy vs external beam radiotherapy. *Arch Ophthalmol* 2003; 121:979-84.
271. Wilson MW, Rodriguez-Galindo C, Haik BG, Moshfeghi DM, Merchant TE, Pratt CB. Multiagent chemotherapy as neoadjuvant treatment for multifocal intraocular retinoblastoma. *Ophthalmology* 2001; 108:2106-14.
272. Rodríguez-Galindo C, Wilson MW, Haik BG, et al. Treatment of intraocular retinoblastoma with vincristine and carboplatin. *J Clin Oncol* 2003; 21:2019-25.
273. Shields CL, Shields JA, De Potter P, Himmelstein BP, Meadows AT. The effect of chemoreduction on retinoblastoma-induced retinal detachment. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1997; 34:165-9.
274. Scott IU, Murray TG, Toledano S. New retinoblastoma tumors in children undergoing systemic chemotherapy. *Arch Ophthalmol* 1998; 116:1685-6.
275. Lee TC, Hayashi NI, Dunkel IJ, Beaverson K, Novetsky D, Abramson DH. New retinoblastoma tumor formation in children initially treated with systemic carboplatin. *Ophthalmology* 2003; 110:1989-94.
276. Shields CL, Shelil A, Cater J, Meadows AT, Shields JA. Development of new retinoblastomas after 6 cycles of chemoreduction for retinoblastoma in 162 eyes of 106 consecutive patients. *Arch Ophthalmol* 2003; 121:1571-6.
277. Shields CL, Honavar SG, Shields JA, Demirci H, Meadows AT, Naduvilath TJ. Factors predictive of recurrence of retinal tumors, vitreous seeds, and subretinal seeds following chemoreduction for retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2002; 120:460-4.

278. Fontanesi J, Parham DM, Pratt CB, Meyer D. Second malignant neoplasms in children with retinoblastoma: the St. Jude Children`s Research Hospital Experience. *Ophthalmic Genet* 1995; 16:105-8.
279. Felice MS, Zubizarreta PA, Chantada GL et al. acute myeloid leukaemia as a second malignancy: report of 9 pediatric patients in a single institution in Argentina. *Med Pediatr Oncol* 1998;30:160-250Ryan
280. Friedman DL, Himelstein B, Shields CL, et al. Chemoreduction and local ophthalmic therapy for intraocular retinoblastoma. *J Clin Oncol* 2000; 18:12-7.
281. Beck MN, Balmer A, Dessing C, Pica A, Munier F. First-line chemotherapy with local treatment can prevent external-beam irradiation and enucleation in low-stage intraocular retinoblastoma. *J Clin Oncol* 2000; 18:2881-7.
282. Shields CL, Honavar SG, Meadows AT, et al. Chemoreduction plus focal therapy for retinoblastoma: factors predictive of need for treatment with external beam radiotherapy or enucleation. *Am J Ophthalmol* 2002; 133:657-64.
283. Shields CL, Honavar SG, Meadows AT, Shields JA, Demirci H, Naduvilath TJ. Chemoreduction for unilateral retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2002; 120:1653-8.
284. Inomata M, Kaneko A. In vitro chemosensitivity assays of retinoblastoma cells. *Int J Clin Oncol* 2004; 9:31-5.
285. Demirci H, Eagle RC Jr, Shields CL, Shields JA. Histopathologic findings in eyes with retinoblastoma treated only with chemoreduction. *Arch Ophthalmol* 2003; 121:1125-31.
286. Patrón M, Gorospe MA, Salinas S, Larrauri J. Anatomía patológica de los retinoblastoma enucleados tras quimiorreducción. En: *Actualización en Cirugía Oftálmica Pediátrica*. Tecnimedia Editorial SL. Madrid 2000; 333-41.
287. Abramson DH, Frank CM, Dunkel IJ. A phase I/II study of subconjunctival carboplatino for intraocular retinoblastoma. *Ophthalmology* 1999;106:1947.
288. Murray TG, Cicciarelli N, O'Brien JM, et al. Subconjunctival carboplatin therapy and cryotherapy in the treatment of transgenic murine retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1997; 115:1286-90.
289. Abramson DH, Frank CM, Dunkel IJ. A phase I/II study of subconjunctival carboplatin for intraocular retinoblastoma. *Ophthalmology* 1999; 106:1947-50.
290. Hayden BJ, Murray TG, Scott IU, et al. Subconjunctival carboplatin in retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2000; 118:1549-54.
291. Mulhivill A, Budning A, Jay V, et al. Ocular motility changes after subtenon carboplatin chemotherapy for retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2003; 121:1120-4.
292. Anagnoste SR, Scott IU, Murray TG, Kramer D, Toledano S. Rhegmatogenous retinal detachment in retinoblastoma patients undergoing chemoreduction and cryotherapy. *Am J Ophthalmol* 2000; 129:817-9.
293. Amoaku WM, Archer DB. Cephalic radiation and retinal vasculopathy. *Eye* 1990; 4:195-203.
294. Elsas T, Thorud E, Jetne V, Conradi IS. Retinopathy after low dose irradiation for an intracranial tumor of the frontal lobe: a case report. *Acta Ophthalmol* 1988; 66:65-8.

295. Roebuck DJ, Howard RG, Li CK, et al. Orbital cellulitis following chemotherapy for retinoblastoma. *Med Pediatr Oncol* 1998; 31:534-5.
296. Tucker MA, D'Angio GJ, Boice JD Jr, et al. Bone sarcomas linked to radiotherapy and chemotherapy in children. *N Engl J Med* 1987; 317:588-93.
297. Jaha S, Jaffe N, Robertson R. Secondary acute non-lymphoblastic leukemia in two children following treatment with a cis-diamminedichloroplatinum-II-based regimen for osteosarcoma. *Med Pediatr Oncol* 1992; 20:71-4.
298. Felix CA, Winick NJ, Negrini M, Bowman WP, Croce CM, Lange BJ. Common region of ALL-1 gene disrupted in epipodophyllotoxin-related secondary acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 1993; 53:2954-6.
299. Gombos DS, Kingston JE, Hungerford JL. Secondary leukemia and death following treatment of intraocular retinoblastoma with primary chemotherapy. *Scientific Papers. X International Congress of Ocular Oncology. Amsterdam, 2001.*
300. Shternfeld IS, Lasudry JGH, Chappell RJ, Darjatmoko SR, Albert DM. Antineoplastic effect of 1,25-dihydroxy-16-ene-23-yne-Vitamin D3 analogue in transgenic mice with retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1996; 114:1396-1401.
301. Dawson DG, Gleiser J, Zimbric ML, et al. Toxicity and dose-response studies of 1-alpha hydroxyvitamin D2 in LH-beta-tag transgenic mice. *Ophthalmology* 2003; 110:835-9.
302. Yamane T, Kaneko A, Morí M. The technique of ophthalmic arterial infusion therapy for patients with intraocular retinoblastoma. *Int J Clin Oncol* 2004; 9:69-73.
303. Seregard S, Kock E, af Trampe E. Intravitreal chemotherapy for recurrent retinoblastoma in an only eye. *Br J Ophthalmol* 1995; 79:194-5.
304. Andrysek O, Bláhová E, Gregora V, Rezný Z. An experimental model for predicting the synergism of hyperthermia with cytostatics. *Neoplasma*. 1985;32(1):93-101
305. Hegewisch-Becker S, Braun K, Otte M, Corovic A, Atanackovic D, Nierhaus A, Hossfeld DK, Pantel K. Effects of whole body hyperthermia (41.8 degrees C) on the frequency of tumor cells in the peripheral blood of patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res*. 2003 Jun;9(6):2079-84.
306. Matsushita S, Reynolds R, Urano M. Synergism between alkylating agent and cis-platin with moderate local hyperthermia: the effect of multidrug chemotherapy in an animal system. *Int J Hyperthermia*. 1993 Mar-Apr;9(2):285-96.
307. Storm FK. Clinical hyperthermia and chemotherapy. *Radiol Clin North Am*. 1989 May;27(3):621-7.
308. Takahashi I, Emi Y, Hasuda S, Kakeji Y, Maehara Y, Sugimachi K. Clinical application of hyperthermia combined with anticancer drugs for the treatment of solid tumors. *Surgery*. 2002 Jan;131(1 Suppl):S78-84.
309. Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, Felix R, Riess H. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002 Jul;43(1):33-56.
310. Finger PT, Packer S, Svitra PP, et al. Hyperthermic treatment of intraocular tumors. *Arch Ophthalmol* 1984; 102:1477-81.

311. Legendijk JJW. A microwave heating technique for the hyperthermic treatment of tumors in the eye, especially retinoblastoma. *Phys Med Biol* 1995; 27:1313-24.
312. Ohtsubo T, Saito H, Tanaka N, Tsuzuki H, Saito T, Kano E. In vitro effect of hyperthermia on chemoenhancement and uptake of cisplatin in human pharyngeal carcinoma KB cells. *Chemotherapy*. 1997 Jan-Feb;43(1):43-50.
313. Beeks JW. Hyperthermia as an adjunct to the treatment of neoplasms. *J Kans Med Soc*. 1966 Oct;67(10):521-3.
314. Anderson H, Wagstaff J, Crowther D, Swindell R, Lind MJ, McGregor J, Timms MS, Brown D, Palmer P. Comparative toxicity of cisplatin, carboplatin (CBDCA) and iproplatin (CHIP) in combination with cyclophosphamide in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1988 Sep;24(9):1471-9.
315. Cohen JD, Robins HI, Schmitt CL. Tumoricidal interactions of hyperthermia with carboplatin, cisplatin and etoposide. *Cancer Lett*. 1989 Mar;44(3):205-10.
316. Journée de Korver JG, Oosterhuis JA, de Wolf Rouendaal D, Kemme H. Histopathological findings in human choroidal melanomas after transpupillary thermotherapy. *Br J Ophthalmol* 1997; 81:234-9.
317. Shields CL, Shields JA, De Potter P, Kheterpal S. Transpupillary thermotherapy in the management of choroidal melanoma. *Ophthalmology* 1996; 103:1642-50.
318. Abramson DH, Scheffler AC. Transpupillary thermotherapy as initial treatment for small intraocular retinoblastoma: technique and predictors of success. *Ophthalmology* 2004; 111:984-91.
319. Balmer A, Munier F, Zografos L. [New strategies in the management of retinoblastoma] *J Fr Ophtalmol*. 2002 Feb;25(2):187-93.
320. Imhof SM, Moll AC, Schouten-van Meeteren AY. [Intraocular retinoblastoma: new therapeutic options] *Ned Tijdschr Geneesk*. 2001 Nov 10;145(45):2165-70. Dutch.
321. Inomata M, Kaneko A, Kunimoto T, Saijo N. In vitro thermo- and thermochemo-sensitivity of retinoblastoma cells from surgical specimens. *Int J Hyperthermia*. 2002 Jan-Feb;18(1):50-61
322. Levy C, Doz F, Quintana E, Pacquement H, Michon J, Schlienger P, Validire P, Asselain B, Desjardins L, Zucker JM. Role of chemotherapy alone or in combination with hyperthermia in the primary treatment of intraocular retinoblastoma: preliminary results. *Br J Ophthalmol*. 1998 Oct;82(10):1154-8
323. Shields CL, Santos MCM, Diniz W, et al. Thermotherapy for retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1999; 117:885-93.
324. Lumbroso L, Doz F, Levy C, et al. Diode laser thermotherapy and chemothermotherapy in the treatment of retinoblastoma. *J Fr Ophtalmol* 2003; 26:154-9.
325. Schueler AO, Jurklies C, Heimann H, Wieland R, Havers W, Bornfeld N. Thermochemotherapy in hereditary retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* 2003; 87:90-5.
326. Lueder GT, Goyal R. Visual function after laser hyperthermia and chemotherapy for macular retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 1996; 121:582-4.

327. Shields JA, Shields CL, De Potter P, Needle M. Bilateral macular retinoblastoma managed by chemoreduction and chemothermotherapy. *Arch Ophthalmol* 1996; 114:1426-7.
328. Lee TC, Lee SW, Dinkin MJ, Ober MD, Beaverson KL, Abramson DH. Chorioretinal scar growth after 810-nanometer laser treatment for retinoblastoma. *Ophthalmology* 2004; 111:992-6.
329. Harbour JW, Meredith TA, Thompson PA, Gordon ME. Transpupillary thermotherapy versus plaque radiotherapy for suspected choroidal melanomas. *Ophthalmology* 2003; 110:2207-15.
330. Cauchi P, Addison P, Gombos D, Hungerford J, Kingston J. Does thermotherapy of retinoblastoma increase the rate of vitreous relapse? *Scientific Papers. X International Congress of Ocular Oncology*. Amsterdam, 2001.
331. Shields JA. The expanding role of laser photocoagulation for intraocular tumors. The 1993 H. Christian Zweng Memorial Lecture. *Retina* 1994; 14:310-22.
332. Abramson DH, Servodidio CA, Nissen M. Treatment of retinoblastoma with the transscleral diode laser. *Am J Ophthalmol* 1998; 126:733-5.
333. Shields JA, Shields CL, Parsons H, Giblin ME. The role of photocoagulation in the management of retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1990; 108:205-8.
334. Augsburger JJ, Faulkner CB. Indirect ophthalmoscope argon laser treatment of retinoblastoma. *Ophthalmic Surg* 1992; 23:591-3.
335. Lincoff H, McLean J, Long RS. The cryosurgical treatment of intraocular tumors. *Am J Ophthalmol* 1967; 63:389-99.
336. Shields JA, Shields CL. Treatment of retinoblastoma with cryotherapy. *Trans Pa Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1990;42:977-80.
337. Shields JA, Parsons H, Shields CL, Giblin ME. The role of cryotherapy in the management of retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 1989; 108:260-4.
338. Shields JA, Shields CL, Donoso LA et al. current treatment of retinoblastoma. *Trans Pa Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1989;41:818.
339. Abramson DH, Ellsworth RM, Rozakis GW. Cryotherapy for retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1982; 100:1253-6.
340. Lincoff HA, McLean JM. Cryosurgical treatment of retinal detachment. II. *Am J Ophthalmol* 1966;61:1227.
341. Mullaney PB, Abboud EB, Al-Mesfer SA. Retinal detachment associated with type III retinoblastoma regression after cryotherapy and external beam radiotherapy. *Am J Ophthalmol* 1997;123:140.
342. Lim TH, Robertson DM. Presumed rhegmatogenous retinal detachment in patients with retinoblastoma. *Retina* 2000; 20:22-7.
343. Baupal CR, Shields CL, Shields JA, Tasman WS. Surgical repair of rhegmatogenous retinal detachment after treatment for retinoblastoma. *Ophthalmology* 1998; 105: 2134-9.
344. Wilson TW, Chan HSL, Moselhy GM, et al. Penetration of chemotherapy into vitreous is increased by cryotherapy and cyclosporine in rabbits. *Arch Ophthalmol* 1996; 114:1390-5.

345. Verhoeff FH. Glioma retinae treated by x-rays with apparent destruction of the tumor and preservation of vision. *Arch Ophthalmol* 1921; 50:450-6.
346. Reese AB, Merriam GR Jr, Martin HE. Treatment of bilateral retinoblastoma by irradiation and surgery. Report on 15-year results. *Am J Ophthalmol* 1949; 32:175-90.
347. Marcus DM, Craft JL, Albert DM. Histopathologic verification of Verhoeff's 1918 irradiation cure of retinoblastoma. *Ophthalmology* 1990; 97:221-4.
348. Balmer A, Munier F, Zografos L. Centenary of the first radiotherapy treatment of retinoblastoma (Hilgartner, 1903). *J Fr Ophthalmol* 2003; 26: 1089-96.
349. Phillips C, Sexton M, Wheeler G, McKenzie J. Retinoblastoma: review of 30 years' experience with external beam radiotherapy. *Australas Radiol.* 2003 Sep;47(3):226-30.
350. Scott IU, Murray TG, Feuer WJ, Van Quill K, Markoe AM, Ling S, Roth DB, O'Brien JM. External beam radiotherapy in retinoblastoma: tumor control and comparison of 2 techniques. *Arch Ophthalmol.* 1999 Jun;117(6):766-70.
351. Hungerford JL, Toma NMG, Plowman PN, Kingston JE. External beam radiotherapy for retinoblastoma: I, whole eye technique. *Br J Ophthalmol* 1995; 79:109-11.
352. Gombos DS, Kelly A, Coen PG, Kingston JE, Hungerford JL. Retinoblastoma treated with primary chemotherapy alone: the significance of tumour size, location, and age. *Br J Ophthalmol* 2002; 86:80-3.
353. Chin LM, Harter WK, Svensson GK, Cassady JR. An external beam treatment technique for retinoblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988; 15:455-60.
354. Abramson DH, Gamell LS, Ellsworth RM, et al. Unilateral retinoblastoma: new intraocular tumours after treatment. *Br J Ophthalmol* 1994; 78:698-701.
355. Abramson DH, Ellsworth RM, Tretter P, Adams K, Kitchin FD. Simultaneous bilateral radiation for advanced bilateral retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1981; 99:1763-6.
356. Amendola BE, Lamm FR, Markoe AM, et al. Radiotherapy of retinoblastoma. A review of 63 children treated with different irradiation techniques. *Cancer* 1990; 66:21-6.
357. Abramson DH, Ellsworth RM, Rosenblatt M, Tretter P, Jereb B, Kitchin FD. Retreatment of retinoblastoma with external beam irradiation. *Arch Ophthalmol* 1982; 100:1257-60.
358. Plowman PN, Kingston JE, Hungerford JL. Prophylactic retinal radiotherapy has an exceptional place in the management of familial retinoblastoma. *Br J Cancer* 1993; 68:743-5.
359. Toma NMG, Hungerford JL, Plowman PN, Kingston JE, Doughty D. External beam radiotherapy for retinoblastoma: II Lens sparing technique. *Br J Ophthalmol* 1995; 79:112-7.
360. Schipper J, Tan KEWP, Van Peperzeel HA. Treatment of retinoblastoma by precision megavoltage radiation therapy. *Radiother Oncol* 1985; 3:117-32.

361. Harnett AN, Hungerford JL, Lambert GD, et al. Improved external beam radiotherapy for the treatment of retinoblastoma. *Br J Radiol* 1987; 60:753-60.
362. Foote RL, Garretson BR, Schomberg PJ, Buskirk SJ, Robertson DM, Earle JD. External beam irradiation for retinoblastoma: patterns of failure and dose-response analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 16:823-30.
363. Weiss DR, Cassady JR, Peterson R. Retinoblastoma: a modification in radiation therapy technique. *Radiology* 1975; 114:705-8.
364. Harnett AN. Ocular radiotherapy: a review of current management. *Br J Radiol Suppl.* 1988;22:122-32.
365. Pomarede R, Czernichow P, Zucker JM, et al. Incidence of anterior pituitary deficiency after radiotherapy at an early age: study in retinoblastoma. *Acta Paediatr Scand* 1984; 73:115-9.
366. McCormick B, Ellsworth RM, Abramson DH, et al. Radiation therapy for retinoblastoma: Comparison of results with lens sparing vs lateral beam techniques. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988; 15:567-74.
367. Hernandez JC, Brady LW, Shields JA, et al. External beam radiation for retinoblastoma: results, patterns of failure, and a proposal for treatment guidelines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 35:125-32.
368. Merchant TE, Gould CJ, Hilton NE, et al. Ocular preservation after 36 Gy external beam radiation therapy for retinoblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002; 24:246-9.
369. Sobrin L, Hayden BC, Murray TG, et al. External beam radiation "salvage" therapy in transgenic murine retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2004; 122:251-7.
370. Bedford MA, Bedotto C, MacFaul PA. Retinoblastoma: a study of 139 cases. *Br J Ophthalmol* 1971; 55:19-27.
371. Singh AD, Garway-Heath D, Love S, Plowman PN, Kingston JE, Hungerford JL. Relationship of regression pattern to recurrence in retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* 1993; 77:12-16.
372. Egbert PR, Donaldson SS, Moazed K, Rosenthal AR. Visual results and ocular complications following radiotherapy of retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1978; 96:1826-30.
373. Abramson DH, Servodidio CA, De Lillo AR, Gamell LS, Kruger EF, McCormick B. Recurrence of unilateral retinoblastoma following radiation therapy. *Ophthalmic Genet* 1994;15:107-13.
374. Migdal C. Bilateral retinoblastoma: the prognosis for vision. *Br J Ophthalmol* 1983; 67:592-5.
375. Abramson DH, Ellsworth RM, Tretter P, et al. Treatment of bilateral groups 1-3 retinoblastoma with bilateral radiation. *Arch Ophthalmol* 1981; 99:1761-2.
376. Abramson DH, McCormick B, Fass D, et al. Retinoblastoma: The long-term appearance of radiated intraocular tumors. *Cancer* 1991; 67:2753-55.
377. Abramson DH, Gerardi CM, Ellsworth RM, McCormick B, Sussman D, Turner L. Radiation regression patterns in treated retinoblastoma: 7 to 21 years later. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1991; 28:108-12.

378. 318
379. Brooks HL Jr, Meyer D, Shields JA, Balas AG, Nelson LB, Fontanesi J. Removal of radiation-induced cataracts in patients treated for retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1990; 108:1701-8.
380. Portellos M, Buckley EG. Cataract surgery and intraocular lens implantation in patients with retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1998; 116:449-52.
381. Ruiz del Río N, Abelairas Gómez JM, Peralta Calvo JM. Funcionalidad visual tras facoemulsificación de cataratas radioinducidas en pacientes tratados con radioterapia externa por retinoblastoma. 86º Congreso Sociedad española de oftalmología. Sept 2007.
382. 320
383. Imhof SM, Mourits MP, Hofman P, et al. Quantification of orbital and midfacial growth retardation after megavoltage external beam irradiation in children with retinoblastoma. *Ophthalmology* 1996; 103:263-8.
384. 321
385. Egbert PR, Fajardo LF, Donaldson SS, Moazed K. Posterior ocular abnormalities after irradiation for retinoblastoma: a histopathological study. *Br J Ophthalmol* 1980; 64:660-5.
386. Coucke PA, Schmid C, Balmer A, et al. Hypofractionation in retinoblastoma: An increased risk of retinopathy. *Radiother Oncol* 1993; 28:157-61.
387. Kinyoun JL, Zamber RW, Lawrence BS, Barlow WE, Arnold AM. Photocoagulation treatment for clinically significant radiation macular oedema. *Br J Ophthalmol* 1995; 79:144-9.
388. Nahum MP, Gdal-On M, Kuten A, Herzl G, Horovitz Y, Weyl Ben Arush M. Long-term follow-up of children with retinoblastoma. *Pediatr Hematol Oncol* 2001; 18:173-9.
389. Ross G, Lipper EG, Abramson DH, Preiser L. The development of young children with retinoblastoma. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2001; 155:80-3.
390. Inhof SM, Hofman P, Tan KEWP. Quantification of lacrimal function after D-shaped field irradiation for retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* 1993; 77:482-4.
391. Lueder GT, Judisch GF, O'Gorman TW. Second nonocular tumors in survivors of heritable retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1986; 104:372-3.
392. Mohny BG, Robertson DM, Schomberg PJ, Hodge DO. Second nonocular tumors in survivors of heritable retinoblastoma and prior radiation therapy. *Am J Ophthalmol* 1998; 126:269-77.
393. 326
394. Wong FL, Boice JD Jr, Abramson DH, et al. Cancer incidence after retinoblastoma. Radiation dose and sarcoma risk. *JAMA* 1997; 278:1262-7.
395. Roarty JD, McLean IW, Zimmerman LE. Incidence of second neoplasms in patients with bilateral retinoblastoma. *Ophthalmology* 1988; 95:1583-7.

396. Abramson DH, Ellsworth RM, Grumbach N, Kitchin FD. Retinoblastoma: survival, age at detection and comparison 1914-1958, 1958-1983. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1985 Nov-Dec;22(6):246-50.
397. Strong LC, Williams WR. The genetic implications of long-term survival of childhood cancer. A conceptual framework. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1987; 9:99
398. Wenzel CT, Halperin EC, Fisher SR. Second malignant neoplasms of the head and neck in survivors of retinoblastoma. *Ear Nose Throat J* 2001; 80:109-12.
399. Gold DG, Neglia JP, Dusenbery KE. Second neoplasms after megavoltage radiation for pediatric tumors. *Cancer* 2003; 97:2588-96.
400. Alsner J, Overgaard J, Olsen JH, Ehlers N. Risk of second primary cancer in hereditary and non-hereditary retinoblastoma: Results from a population based study with more than 40 years follow-up. *Scientific Papers. X International Congress of Ocular Oncology*. Amsterdam, 2001.
401. Moll AC, Imhof SM, Schouten-van Meeteren AYN, Kuik DJ, Hofman P, Boers M. Second primary tumors in hereditary retinoblastoma: a register-based study, 1945-1997. Is there an age effect on radiation-related risk? *Scientific Papers. X International Congress of Ocular Oncology*. Amsterdam, 2001.
402. Hasegawa T, Matsumo Y, Niki T, et al. Second primary rhabdomyosarcomas in patients with bilateral retinoblastoma. *Am J Surg Pathol* 1998; 22:1351-60.
403. Pratt CB, Michalkiewicz E, Rao BN, Lipson M, Cain A, Kaste S. Multifocal osteosarcoma following retinoblastoma. *Ophthalmic Genet* 1999; 20:23-9.
404. Traboulsi EI, Zimmerman LE, Manz HJ. Cutaneous malignant melanoma in survivors of heritable retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1988; 106:1059-61.
405. Strong LC, Knudson AG Jr. Letter: second cancers in retinoblastoma. *Lancet* 1973; 77:95.
406. Strong LC, Williams WR. The genetic implications of long-term survival of childhood cancer. A conceptual framework. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1987; 9:99.
407. Francois J, DeBie S, Leuven MT. the Costenbader Memorial Lecture. Genesis and genetics of retinoblastoma. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1979; 16:85.
408. Moll AC, Imhof SM, Schouten-Van Meeteren AY et al. second primary tumors in hereditary retinoblastoma: a register-based study, 1945-1997: is there an age effect on radiation-related risk? *Ophthalmology* 2001; 108:1109.
409. Vázquez E, Castellote A, Piqueras J, et al. Second malignancies in pediatric patients: imaging findings and differential diagnosis. *Radiographics* 2003; 23:1155-72.
410. Abramson DH, Melson MR, Dunkel IJ, Frank CM. Third (fourth and fifth) nonocular tumors in survivors of retinoblastoma. *Ophthalmology* 2001; 108:1868-76.
411. 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; 40:1522-9.

412. Gragoudas ES, Goitein M, Verhey L, et al. Proton beam irradiation. An alternative to enucleation for intraocular melanomas. *Ophthalmology* 1980; 87:571-81.
413. Hannouche D, Frau E, Desjardins L, et al. Efficacy of proton therapy in circumscribed choroidal hemangiomas associated with serous retinal detachment. *Ophthalmology* 1997; 104:1780-4.6
414. Krenfli M, Hug EB, Adams JA, Smith AR, Tarbell NJ, Munzenrider JE. Proton radiation therapy for retinoblastoma: comparison of various intraocular tumor locations and beam arrangements. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005 Feb 1;61(2):583-93.
415. Balmer A, Munier F, Zografos L. [New strategies in the management of retinoblastoma] *J Fr Ophtalmol.* 2002 Feb;25(2):187-93.
416. Rosengren B, Tengroth B. Retinoblastoma treated with a ⁶⁰Co applicator. *Acta Radiol Ther Phys Biol.* 1977 Apr;16(2):110-6.
417. Zografos L, Bercher L, Chamot L, Gailloud C, Raimondi S, Egger E. Cobalt-60 treatment of choroidal hemangiomas. *Am J Ophthalmol* 1996; 121:190-9.
418. Luxton G, Astrahan MA, Liggett PE, Neblett DL, Cohen DM, Petrovich Z. Dosimetric calculations and measurements of gold plaque ophthalmic irradiators using iridium-192 and iodine-125 seeds. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1988 Jul;15(1):167-76.
419. Luxton G, Astrahan MA, Petrovich Z. Backscatter measurements from a single seed of ¹²⁵I for ophthalmic plaque dosimetry. *Med Phys.* 1988 May-Jun;15(3):397-400.
420. Astrahan MA, Luxton G, Jozsef G, Kampp TD, Liggett PE, Sapozink MD, Petrovich Z. An interactive treatment planning system for ophthalmic plaque radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1990 Mar;18(3):679-87.
421. Astrahan MA, Luxton G, Pu Q, Petrovich Z. Conformal episcleral plaque therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997 Sep 1;39(2):505-19.
422. Shields JA, Giblin ME, Shields CL, et al. Episcleral plaque radiotherapy for retinoblastoma. *Ophthalmology* 1989; 96:530-7.
423. Astrahan MA. A patch source model for treatment planning of ruthenium ophthalmic applicators. *Med Phys.* 2003 Jun;30(6):1219-28.
424. Shields CL, Shields JA, De Potter P, et al. Plaque radiotherapy in the management of retinoblastoma. Use as a primary and secondary treatment. *Ophthalmology* 1993; 100:216-24.
425. Madreperla SA, Hungerford JL, Doughty D, Plowman PN, Kingston JE, Singh AD. Treatment of retinoblastoma vitreous base seeding. *Ophthalmology* 1998; 105:120-4.
426. Stannard C, Sealy R, Hering E, et al. Localized whole eye radiotherapy for retinoblastoma using a ¹²⁵I applicator, "claws". *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 51:399-409.

427. Stannard C, Sealy R, Hering E, et al. Postenucleation orbits in retinoblastoma: treatment with 125 I brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 54:1446-54.
428. Amendola BE, Markoe AM, Augsburger JJ, et al. Analysis of treatment results in 36 children with retinoblastoma treated with scleral plaque irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 17:63-70.
429. Shields CL, Shields JA, Cater J, Othmane I, Singh AD, Micaily B. Plaque radiotherapy for retinoblastoma: long-term tumor control and treatment complications in 208 tumors. *Ophthalmology* 2001; 108:2116-21.
430. Buys RJ, Abramson DH, Ellsworth RM, Haik B. Radiation regression patterns after cobalt plaque insertion for retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1983; 101:1206-8.
431. Scott IU, McCabe CM, Murray TG, Rosa RH Jr, Toledano S, Markoe AM. Eyelid and scleral necrosis following bare iridium-192 seed for retinoblastoma. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2003 Jul-Aug;34(4):324-6.
432. Shields JA, Giblin ME, Shields CL, et al. Episcleral plaque radiotherapy for retinoblastoma. *Ophthalmology* 1989; 96:530-7.
433. Abramson DH, Ellsworth RM. The surgical management of retinoblastoma. *Ophthalmol Surg* 1980; 11:596-8.
434. Shields JA, Shields CL, De Potter P. Enucleation technique for children with retinoblastoma. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1992; 29:213-5.
435. Moshfeghi DM, Moshfeghi AA, Finger PT. Enucleation. *Surv Ophthalmol* 2000; 44:277-301.
436. Shields JA, Shields CL, De Potter P. Hydroxyapatite orbital implant after enucleation. Experience with initial 100 consecutive cases. *Arch Ophthalmol* 1992; 110:333-8.
437. Karesh JW, Dresner SC. High-density porous polyethylene (Medpor) as a successful anophthalmic socket implant. *Ophthalmology* 1994; 101:1688-96.
438. Jordan DR, Allen LH, Ells A, et al. The use of Vicryl mesh (Polyglactin 910) for implantation of hydroxyapatite orbital implants. *Ophthalm Plast Reconstr Surg* 1995; 11: 95-9.
439. Sánchez M, Abelairas JM, Peralta J, Sánchez E, Fernández JM. Enucleación, evisceración, prótesis oculares vascularizables. En: *Actualización en Cirugía Oftálmica Pediátrica*. Tecnimedia Editorial SL. Madrid 2000; 735-49.
440. Karcioğlu ZA, Mullaney PB, Millar LC. Extrusion of porous polyethylene orbital implant in recurrent retinoblastoma. *Ophthalm Plast Reconstr Surg* 1998; 14:37-44.
441. Oestreicher JH, Liu E, Berkowitz M. Complications of hydroxyapatite orbital implants. A review of 100 consecutive cases and a comparison of Dexon mesh (polyglycolic acid) with scleral wrapping. *Ophthalmology* 1997; 104:324-9.
442. De Potter P, Shields CL, Shields JA, Flanders AE. Role of magnetic resonance imaging in the evaluation of the hydroxyapatite orbital implant. *Ophthalmology* 1992; 99:824-30.

443. Edelstein C, Shields CL, De Potter P, Shields JA. Complications of motility peg placement for the hydroxyapatite implant. *Ophthalmology* 1997; 104:1616-21.
444. Ashworth JL, Rhatigan M, Sampath R, et al. The hydroxyapatite orbital implant: a prospective study. *Eye* 1996; 10:29-37.
445. Shields CL, Shields JA, De Potter P, Singh AD. Problems with the hydroxyapatite orbital implant: experience with 250 consecutive cases. *Br J Ophthalmol* 1994; 78:702-6.
446. Kaltreider SA, Peake LR, Carter BT. Pediatric enucleation: analysis of volume replacement. *Arch Ophthalmol* 2001; 119:379-84.
447. Fountain TR, Goldberger S, Murphree AL. Orbital development after enucleation in early childhood. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 1999 Jan;15(1):32-6.
448. Yago K, Furuta M. Orbital growth after unilateral enucleation in infancy without an orbital implant. *Jpn J Ophthalmol*. 2001 Nov-Dec;45(6):648-52.
449. Sarnat BG. Eye and orbital size in the young and adult. Some postnatal experimental and clinical relationships. *Ophthalmologica*. 1982;185(2):74-89.
450. Chantada GL, de Davila MT, Fandino A et al. Retinoblastoma with low risk for extraocular relapse. *Ophthalmic Genet* 1999; 20:133.
451. Magrath I, Abramson DH, Ellsworth RM. Optic nerve involvement in retinoblastoma. *Ophthalmology* 1989; 96:217.
452. Mouriaux F, Barraco P, Patenotre P, Pellerin P. Orbital exenteration. *J Fr Ophthalmol* 2001; 24:865-74.
453. Shields JA, Shields CL, Demirci H, Honavar SG, Singh AD. Experience with eyelid-sparing orbital exenteration: the 2000 Tullio O. Coston Lecture. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 2001; 17:355-61.
454. Uusitalo M, Ibarra M, Fulton L, et al. Reconstruction with rectus abdominis myocutaneous free flap after orbital exenteration in children. *Arch Ophthalmol* 2001; 119:1705-9.
455. Lee JO, Russo AA, Pavletich NP. Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature*. 1998 Feb 26;391(6670):859-65.
456. Swaminathan R, Rama R, Shanta V. Childhood cancers in Chennai, India, 1990-2001: incidence and survival. *Int J Cancer*. 2008 Jun 1;122(11):2607-11.
457. Moll AC, Kuik DJ, Bouter LM, Den Otter W, Bezemer PD, Koten JW, Imhof SM, Kuyt BP, Tan KE. Incidence and survival of retinoblastoma in The Netherlands: a register based study 1862-1995. *Br J Ophthalmol*. 1997 Jul;81(7):559-62.
458. Abramson DH, Ellsworth RM, Kitchin FD, Tung G. Second nonocular tumors in retinoblastoma survivors. Are they radiation-induced? *Ophthalmology*. 1984 Nov;91(11):1351-5.
459. Li FP, Abramson DH, Tarone RE et al. Hereditary retinoblastoma, lipoma, and second primary cancers. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:83.
460. Sinniah D, Narasimha G, Prathap K. Advanced retinoblastoma in Malaysian children. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1980 Oct;58(5):819-24.

461. Chantada G, Fandino A, Manzitti J et al. late diagnosis of retinoblastoma in a developing country. *Arch Dis Child* 1999; 80:171.
462. Kodilinye HC. Retinoblastoma in Nigeria: problems of treatment. *Am J Ophthalmol* 1967; 63:469.
463. Matsunaga E. retinoblastoma in Japan: follow up survey of sporadic cases. *Jpn J Ophthalmol* 1976; 20:266.
464. Abramson DH, Niksarli K, Ellsworth RM, Servodidio CA. Changing trends in the management of retinoblastoma: 1951-1965 vs 1966-1980. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1994; 31:32-7.
465. Lee V, Hungerford JL, Bunce C, Ahmed F, Kingston JE, Plowman PN. Globe conserving treatment of the only eye in bilateral retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* 2003; 87:1374-80.
466. Sant M, Capocaccia R, Badioni V; UROCARE Working Group. Survival for retinoblastoma in Europe. *Eur J Cancer* 2001; 37:730-5.
467. Erwenne CM, Franco EL. Age and lateness of referral as determinants of extra-ocular retinoblastoma. *Ophthalm Paediat Genet* 1989; 10:179-84.
468. de Aguirre Neto JC, Antoneli CB, Ribeiro KB, Castilho MS, Novaes PE, Chojniak MM, Arias V. Retinoblastoma in children older than 5 years of age. *Pediatr Blood Cancer*. 2007 Mar;48(3):292-5.
469. Gündüz K, Müftüoğlu O, Günalp I, Unal E, Taçyıldız N. Metastatic retinoblastoma clinical features, treatment, and prognosis. *Ophthalmology*. 2006 Sep;113(9):1558-66. Epub 2006 Jul 7.
470. Leal-Leal CA, Rivera-Luna R, Flores-Rojo M, Juárez-Echenique JC, Ordaz JC, Amador-Zarco J. Survival in extra-orbital metastatic retinoblastoma:treatment results. *Clin Transl Oncol*. 2006 Jan;8(1):39-44.
471. Kao LY, Su WW, Lin YW. Retinoblastoma in Taiwan: survival and clinical characteristics 1978-2000. *Jpn J Ophthalmol*. 2002 Sep-Oct;46(5):577-80.
472. Mashiah M, Barishak YR. Photoreceptor differentiation in retinoblastoma and its significance in prognosis. *Br J Ophthalmol* 1977; 61:417-22.
473. Kerimogglu H, Kiratli H, Dincturk AA, Soylemezoglu F, Bilgic S. Quantitative analysis of proliferation, apoptosis, and angiogenesis in retinoblastoma and their association with the clinicopathologic parameters. *Jpn J Ophthalmol* 2003; 47:565-71.
474. Rubin CM, Robison LL, Cameron JD, et al. Intraocular retinoblastoma group V: an analysis of prognostic factors. *J Clin Oncol* 1985; 3:680-5.
475. Bouguila H, Malek I, Boujemaa C, et al. Prognosis of retinoblastoma. Report of 50 cases. *J Fr Ophtalmol* 2001; 24:1053-6.
476. Cullinan AE, Brandt CR. Cytokine induced apoptosis in human retinoblastoma cells. *Mol Vis* 2004; 10:315-22.
477. Li A, Zhu X, Brown B, Craft CM. Gene expression networks underlying retinoic acid-induced differentiation of human retinoblastoma cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:996-1007.

478. Cebulla C, Jockovich ME, Pina Y, Boutrid H, Alegret A, Kulak A, Hackam AS, Bhattacharya SK, Feuer WJ, Murray T. BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR IMPACT ON RETINOBLASTOMA PROGRESSION AND SURVIVAL. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Jul 9.
479. Mashayekhi A, Shields CL, Eagle RC Jr, Shields JA. Cavitory changes in retinoblastoma: relationship to chemoresistance. *Ophthalmology*. 2005 Jun;112(6):1145-50.
480. Abramson DH, Beaverson K, Sangani P, et al. Screening for retinoblastoma: presenting signs as prognosticators of patient and ocular survival. *Pediatrics* 2003; 112:1248-55.
481. Ozdemir H, Tacyildiz N, Unal E, Yavuz G, Ugur H, Gunduz K. Clinical and epidemiological characteristics of retinoblastoma: correlation with prognosis in a Turkish pediatric oncology center. *Pediatr Hematol Oncol*. 2007 Apr-May;24(3):221-31.
482. Chang CY, Chiou TJ, Hwang B, Bai LY, Hsu WM, Hsieh YL. Retinoblastoma in Taiwan: survival rate and prognostic factors. *Jpn J Ophthalmol*. 2006 May-Jun;50(3):242-9.
483. Cerecedo F, López E, Rivera H, Arias J, Ramírez F, Rodríguez M. Survival and clinical features of retinoblastoma. *An Pediatr* 2003; 58:3-9.
484. Dudgeon J. Retinoblastoma. Trends in conservative management. *Br J Ophthalmol* 1995; 79:104.
485. Petersen RA, Friend SH, Albert DM. Prolonged survival of a child with metastatic retinoblastoma. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1987 Sep-Oct;24(5):247-8.
486. Abramson DH, Notterman RB, Ellsworth RM, Kitchin FD. Retinoblastoma treated in infants in the first six months of life. *Arch Ophthalmol*. 1983 Sep;101(9):1362-6.
487. Haik BG, Siedlecki A, Ellsworth RM, Sturgis-Buckhout L. Documented delays in the diagnosis of retinoblastoma. *Ann Ophthalmol*. 1985 Nov;17(11):731-2.
488. Lam BL, Judisch GF, Sobol WM, Blodi CF. Visual prognosis in macular retinoblastomas. *Am J Ophthalmol*. 1990 Sep 15;110(3):229-32.
489. Weiss AH, Karr DJ, Kalina RE, Lindsley KL, Pendergrass TW. Visual outcomes of macular retinoblastoma after external radiation therapy. *Ophthalmology* 1994; 101:1244-9.
490. Balasubramanya R, Pushker N, Bajaj MS, Rani A, Ghose S, Arya LS. Visual outcome in macular retinoblastoma treated with primary chemotherapy. *Ophthalmologica* 2003; 217:417-21.
491. Buckley EG, Heath H. Visual acuity after successful treatment of large macular retinoblastoma. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1992 Mar-Apr;29(2):103-6.
492. Bradford GM, Kutschke PJ, Scott WE. Results of amblyopia therapy in eyes with unilateral structural abnormalities. *Ophthalmology* 1992; 99:1616-21.
493. Watts P, Westall C, Colpa L, et al. Visual results in children treated for macular retinoblastoma. *Eye* 2002; 16:75-80.

494. De Potter P, Flanders AE, Shields JA et al. magnetic resonance imaging of intraocular tumors. *Int Ophthalmol Clin* 1993; 33:37.
495. Howard GM, Ellsworth RM. Differential diagnosis of retinoblastoma. A statistical survey of 500 children. I. Relative frequency of the lesions which simulate retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 1965; 60:610-8.
496. Shields JA, Parsons H, Shields CL. Lesions simulating retinoblastoma. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1991; 28:338-40.
497. Awan KJ, Thumayam M. Changes in the contralateral eye in uncomplicated persistent hyperplastic primary vitreous. *Am J Ophthalmol* 1985; 99:122-4.
498. Wells R, Miro P, Brummond R. Color-flow doppler sonography of persistent hyperplastic primary vitreous. *J Ultrasound Med* 1991; 10:405-7.
499. Mafee M, Goldberg MF. Persistent hyperplastic primary vitreous (PHPV): Role of computed tomography and magnetic resonance. *Radiol Clin North Am* 1987; 25:683-92.
500. Karr DJ, Scott WE. Visual acuity results following treatment of persistent hyperplastic primary vitreous. *Arch Ophthalmol* 1986; 104:662-7.
501. Liang JC, Augsburger JJ, Shields JA. Diffuse infiltrating retinoblastoma associated with persistent primary vitreous. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1985; 22:31-3.
502. Ridley ME, Shields JA, Brown GC, Tasman W. Coats' disease: evaluation of management. *Ophthalmology* 1982; 89:1381-7.
503. Char DH. Coats' syndrome: Long term follow up. *Br J Ophthalmol* 2000; 84:37-9.
504. Scott MS, Tatsuo H, Delia S, et al. Difficulties in excluding the diagnosis of advanced Coats' disease: A clinicopathologic report. *Ophthalmologica* 1996; 210:336-46.
505. Sneed SR, Blodi CF, Pulido JS. Treatment of Coats' disease with the binocular indirect argon laser photocoagulator. *Arch Ophthalmol* 1989; 107:789-90.
506. Machemer R, Williams JM. Pathogenesis and therapy of traction detachment in various retinal vascular diseases. *Am J Ophthalmol* 1988; 105:170-81.
507. Gillespie SH, Dinning WJ, Voller A, Crowcroft NS. The spectrum of ocular toxocariasis. *Eye* 1993; 7:415-8.
508. Shields JA. Ocular toxocariasis: a review. *Surv Ophthalmol* 1984; 28:361-81.
509. Wan WL, Cano MR, Pince KJ, Green RL. Echographic characteristics of ocular toxocariasis. *Ophthalmology* 1991; 98:28-32.
510. Magnaval JF, Fabre R, Maurieres P, Charlet JP, de Larrard B. Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol Res* 1991; 77:697-702.
511. Werner JC, Ross RD, Green WR, Watts JC. Pars plana vitrectomy and subretinal surgery for ocular toxocariasis. *Arch Ophthalmol* 1999; 117:532-4.
512. Williams R, Taylor D. Tuberculous sclerosis. *Surv Ophthalmol* 1985; 30:143-54.

513. Ulbright TM, Fulling KM, Helveston EM. Astrocytic tumours of the retina. Differentiation of sporadic tumours from phacomatosis associated tumours. *Arch Pathol Lab Med* 1984; 108:160-3.
514. Gass JDM. Retinal and optic disc astrocytic hamartomas. In: Gass JDM. *Stereoscopic Atlas of Macular Diseases*. 3rd ed. St Louis: CV Mosby, 1987; 1:626-9.
515. Koestenberger M, Kroisel PM, Lackner H, Urban C. Simultaneous occurrence of retinoblastoma and neurofibromatosis I in a young child. *Med Pediatr Oncol* 2003; 40:124-5.
516. The International Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. An international classification of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 1984; 102:1130-4.
517. The International Committee for the Classification of the Late Stages of Retinopathy of Prematurity: II. The classification of retinal detachment. *Arch Ophthalmol* 1987; 105:906-12.
518. Peralta J, Abelairas JM, Fernández JM, Sánchez E, Fonseca A. Retinopatía del prematuro: III. Tratamiento de la RP en los grados 4 y 5. Cerclajes y vitrectomías. En: *Actualización en Cirugía Oftálmica Pediátrica*. Tecnimedia Editorial S.L. Madrid 2000; 175-86.
519. Lahav M, Albert DM, Wyand S. Clinical and histopathologic classification of retinal dysplasia. *Am J Ophthalmol* 1973; 75:648-67.
520. Preslan MW, Beauchamp GR, Zakcov ZN. Congenital glaucoma and retinal dysplasia. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1985; 22:166-70.
521. Broughton WL, Zimmerman LE. A clinicopathologic study of 56 cases of intraocular medulloepithelioma. *Am J Ophthalmol* 1987; 85:407-18.
522. Shields JA, Eagle RC, Shields CL, De Potter P. Congenital neoplasm of the nonpigmented ciliary epithelium (medulloepithelioma). *Ophthalmology* 1996; 103:1998-2006.
523. García-Arumí J, Sarasols L. Hemangiomas capilares retinianos. En: *Actualización en Tumores Intraoculares*. Tecnimedia Editorial S.L. Madrid, 1999; 221-32.
524. Good WV, Erodsky MC, Edwards MS, Hoyt WF. Bilateral retinal hamartomas in neurofibromatosis type 2. *Br J Ophthalmol* 1991; 75:190.
525. Fletcher O, Easton D, Anderson K, Gilham C, Jay M, Peto J. Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Mar 3;96(5):357-63.
526. Lee C, Chang JH, Lee HS, Cho Y. Structural basis for the recognition of the E2F transactivation domain by the retinoblastoma tumor suppressor. *Genes Dev.* 2002 Dec 15;16(24):3199-212.
527. Lee JO, Russo AA, Pavletich NP. Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature.* 1998 Feb 26;391(6670):859-65.

528. Zhang J, Gray J, Wu L, Leone G, Rowan S, Cepko CL, Zhu X, Craft CM, Dyer MA. Rb regulates proliferation and rod photoreceptor development in the mouse retina. *Nat Genet.* 2004 Apr;36(4):351-60. Epub 2004 Feb 29.
529. Harbour JW, Dean DC. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 2000; 14:2393
530. Harbour JW. Molecular basis of low-penetrance retinoblastoma. *Arch Ophthalmol.* 2001 Nov;119(11):1699-704. Review.
531. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971 Apr;68(4):820-3.
532. NEEL JV, FALLS HF. The rate of mutation of the gene responsible for retinoblastoma in man. *Science.* 1951 Oct 19;114(2964):419-22.
533. Yunis JJ, Ramsay N. Retinoblastoma and subband deletion of chromosome 13. *Am J Dis Child.* 1978 Feb;132(2):161-3.
534. Sparkes RS, Sparkes MC, Wilson MG, Towner JW, Benedict W, Murphree AL, Yunis JJ. Regional assignment of genes for human esterase D and retinoblastoma to chromosome band 13q14. *Science.* 1980 May 30;208(4447):1042-4.
535. Cowell JK, Hungerford J, Rutland P, Jay M. Genetic and cytogenetic analysis of patients showing reduced esterase-D levels and mental retardation from a survey of 500 individuals with retinoblastoma. *Ophthalmic Paediatr Genet.* 1989 Jun;10(2):117-27.
536. Murphree AL, Benedict WF. Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. *Science.* 1984 Mar 9;223(4640):1028-33.
537. Balaban-Malenbaum G, Gilbert F, Nichols WW, Hill R, Shields J, Meadows AT. A deleted chromosome no. 13 in human retinoblastoma cells: relevance to tumorigenesis. *Cancer Genet Cytogenet.* 1981 Apr;3(3):243-50.
538. Dryja TP, Rapaport JM, Joyce JM, Petersen RA. Molecular detection of deletions involving band q14 of chromosome 13 in retinoblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Oct;83(19):7391-4.
539. Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature.* 1983 Oct 27-Nov 2;305(5937):779-84.
540. Cavenee WK, Hansen MF, Nordenskjold M, Kock E, Maumenee I, Squire JA, Phillips RA, Gallie BL. Genetic origin of mutations predisposing to retinoblastoma. *Science.* 1985 Apr 26;228(4698):501-3.
541. Lee EY, Lee WH. Molecular cloning of the human esterase D gene, a genetic marker of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Sep;83(17):6337-41.
542. Squire J, Dryja TP, Dunn J, Goddard A, Hofmann T, Musarella M, Willard HF, Becker AJ, Gallie BL, Phillips RA. Cloning of the esterase D gene: a polymorphic gene probe closely linked to the retinoblastoma locus on chromosome 13. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Sep;83(17):6573-7.
543. Fung YK, Murphree AL, T'Ang A, Qian J, Hinrichs SH, Benedict WF. Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science.* 1987 Jun 26;236(4809):1657-61

544. Goddard AD, Balakier H, Canton M, Dunn J, Squire J, Reyes E, Becker A, Phillips RA, Gallie BL. Infrequent genomic rearrangement and normal expression of the putative RB1 gene in retinoblastoma tumors. *Mol Cell Biol.* 1988 May;8(5):2082-8.
545. Madreperla SA, Whittum-Hudson JA, Prendergast RA, Chen PL, Lee WH. Intraocular tumor suppression of retinoblastoma gene-reconstituted retinoblastoma cells. *Cancer Res.* 1991 Dec 1;51(23 Pt 1):6381-4.
546. Huang HJ, Yee JK, Shew JY, Chen PL, Bookstein R, Friedmann T, Lee EY, Lee WH. Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science.* 1988 Dec 16;242(4885):1563-6.
547. Wiggs J, Nordenskjöld M, Yandell D, Rapaport J, Grondin V, Janson M, Werelius B, Petersen R, Craft A, Riedel K, et al. Prediction of the risk of hereditary retinoblastoma, using DNA polymorphisms within the retinoblastoma gene. *N Engl J Med.* 1988 Jan 21;318(3):151-7.
548. Mancini D, Singh S, Ainsworth P, Rodenhiser D. Constitutively methylated CpG dinucleotides as mutation hot spots in the retinoblastoma gene (RB1). *Am J Hum Genet.* 1997 Jul;61(1):80-7.
549. Bunin GR, Emanuel BS, Meadows AT, Buckley JD, Woods WG, Hammond GD. Frequency of 13q abnormalities among 203 patients with retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 1989 Mar 1;81(5):370-4.
550. Blanquet V, Gross MS, Turleau C, Sénamaud-Beaufort C, Doz F, Besmond C. Three novel germline mutations in exons 8 and 18 of the retinoblastoma gene. *Hum Mol Genet.* 1994 Jul;3(7):1185-6.
551. Shimizu T, Toguchida J, Kato MV, Kaneko A, Ishizaki K, Sasaki MS. Detection of mutations of the RB1 gene in retinoblastoma patients by using exon-by-exon PCR-SSCP analysis. *Am J Hum Genet.* 1994 May;54(5):793-800.
552. Lohmann DR, Brandt B, Höpping W, Passarge E, Horsthemke B. The spectrum of RB1 germ-line mutations in hereditary retinoblastoma. *Am J Hum Genet.* 1996 May;58(5):940-9.
553. Tsai T, Fulton L, Smith BJ, Mueller RL, Gonzalez GA, Uusitalo MS, O'Brien JM. Rapid identification of germline mutations in retinoblastoma by protein truncation testing. *Arch Ophthalmol.* 2004 Feb;122(2):239-48.
554. Dryja TP, Mukai S, Petersen R, Rapaport JM, Walton D, Yandell DW. Parental origin of mutations of the retinoblastoma gene. *Nature.* 1989 Jun 15;339(6225):556-8.
555. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science.* 1991 Nov 22;254(5035):1138-46.
556. Zhu X, Dunn JM, Goddard AD, Squire JA, Becker A, Phillips RA, Gallie BL. Mechanisms of loss of heterozygosity in retinoblastoma. *Cytogenet Cell Genet.* 1992;59(4):248-52.
557. Bonaïti-Pellié C, Briard-Guillemot ML. Segregation analysis in hereditary retinoblastoma. *Hum Genet.* 1981;57(4):411-9.

558. Greger V, Passarge E, Höpping W, Messmer E, Horsthemke B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet.* 1989 Sep;83(2):155-8.
559. Matsunaga E. Hereditary retinoblastoma: delayed mutation or host resistance? *Am J Hum Genet.* 1978 Jul;30(4):406-24.
560. Lohmann DR, Brandt B, Höpping W, Passarge E, Horsthemke B. Distinct RB1 gene mutations with low penetrance in hereditary retinoblastoma. *Hum Genet.* 1994 Oct;94(4):349-54.
561. Otterson GA, Chen W, Coxon AB, Khleif SN, Kaye FJ. Incomplete penetrance of familial retinoblastoma linked to germ-line mutations that result in partial loss of RB function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Oct 28;94(22):12036-40.
562. Schubert EL, Strong LC, Hansen MF. A splicing mutation in RB1 in low penetrance retinoblastoma. *Hum Genet.* 1997 Oct;100(5-6):557-63.
563. Onadim Z, Hogg A, Baird PN, Cowell JK. Oncogenic point mutations in exon 20 of the RB1 gene in families showing incomplete penetrance and mild expression of the retinoblastoma phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jul 1;89(13):6177-81.
564. Bremner R, Du DC, Connolly-Wilson MJ, Bridge P, Ahmad KF, Mostachfi H, Rushlow D, Dunn JM, Gallie BL. Deletion of RB exons 24 and 25 causes low-penetrance retinoblastoma. *Am J Hum Genet.* 1997 Sep;61(3):556-70.
565. Alonso J, Frayle H, Menéndez I, López A, García-Miguel P, Abelairas J, Sarret E, Vendrell MT, Navajas A, Artigas M, Indiano JM, Carbone A, Torrenteras C, Palacios I, Pestaña A. Identification of 26 new constitutional RB1 gene mutations in Spanish, Colombian, and Cuban retinoblastoma patients. *Hum Mutat.* 2005 Jan;25(1):99.
566. Belchis DA, Meece CA, Benko FA, Rogan PK, Williams RA, Gocke CD. Loss of heterozygosity and microsatellite instability at the retinoblastoma locus in osteosarcomas. *Diagn Mol Pathol.* 1996 Sep;5(3):214-9.
567. Wadayama B, Toguchida J, Shimizu T, Ishizaki K, Sasaki MS, Kotoura Y, Yamamuro T. Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas. *Cancer Res.* 1994 Jun 1;54(11):3042-8.
568. Bookstein R, Rio P, Madreperla SA, Hong F, Allred C, Grizzle WE, Lee WH. Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Oct;87(19):7762-6.
569. Harbour JW, Lai SL, Whang-Peng J, Gazdar AF, Minna JD, Kaye FJ. Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science.* 1988 Jul 15;241(4863):353-7.
570. Lee EY, To H, Shew JY, Bookstein R, Scully P, Lee WH. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science.* 1988 Jul 8;241(4862):218-21.
571. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science.* 1996 Dec 6;274(5293):1672-7.
572. DeCaprio JA, Furukawa Y, Ajchenbaum F, Griffin JD, Livingston DM. The retinoblastoma-susceptibility gene product becomes phosphorylated in multiple

- stages during cell cycle entry and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Mar 1;89(5):1795-8.
573. Lee WH, Shew JY, Hong FD, Sery TW, Donoso LA, Young LJ, Bookstein R, Lee EY. The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature*. 1987 Oct 15-21;329(6140):642-5.
574. Chen PL, Scully P, Shew JY, Wang JY, Lee WH. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell*. 1989 Sep 22;58(6):1193-8.
575. Ikeda MA, Jakoi L, Nevins JR. A unique role for the Rb protein in controlling E2F accumulation during cell growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 16;93(8):3215-20.
576. Stein GH, Beeson M, Gordon L. Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts. *Science*. 1990 Aug 10;249(4969):666-9.
577. DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang CM, Lee WH, Marsilio E, Paucha E, Livingston DM. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*. 1988 Jul 15;54(2):275-83.
578. Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Raybuck M, Weinberg RA, Harlow E. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature*. 1988 Jul 14;334(6178):124-9.
579. Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989 Feb 17;243(4893):934-7.
580. Harbour JW, Dean DC. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2000 Apr;2(4):E65-7.
581. Knudsen ES, Buckmaster C, Chen TT, Feramisco JR, Wang JY. Inhibition of DNA synthesis by RB: effects on G1/S transition and S-phase progression. *Genes Dev*. 1998 Aug 1;12(15):2278-92.
582. Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*. 1991 Jun 14;65(6):1053-61.
583. Helin K, Lees JA, Vidal M, Dyson N, Harlow E, Fattaey A. A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F. *Cell*. 1992 Jul 24;70(2):337-50.
584. Huber HE, Edwards G, Goodhart PJ, Patrick DR, Huang PS, Ivey-Hoyle M, Barnett SF, Oliff A, Heimbrook DC. Transcription factor E2F binds DNA as a heterodimer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Apr 15;90(8):3525-9.
585. Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev*. 1998 Aug 1;12(15):2245-62.
586. Dalton S. Cell cycle regulation of the human cdc2 gene. *EMBO J*. 1992 May;11(5):1797-804.

587. Ohtani K, DeGregori J, Nevins JR. Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 19;92(26):12146-50.
588. Thalmeier K, Synovzik H, Mertz R, Winnacker EL, Lipp M. Nuclear factor E2F mediates basic transcription and trans-activation by E1a of the human MYC promoter. *Genes Dev*. 1989 Apr;3(4):527-36.
589. Helin K, Harlow E, Fattaey A. Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*. 1993 Oct;13(10):6501-8.
590. Johnson DG, Schwarz JK, Cress WD, Nevins JR. Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature*. 1993 Sep 23;365(6444):349-52.
591. Chow KN, Dean DC. Domains A and B in the Rb pocket interact to form a transcriptional repressor motif. *Mol Cell Biol*. 1996 Sep;16(9):4862-8.
592. Sellers WR, Rodgers JW, Kaelin WG Jr. A potent transrepression domain in the retinoblastoma protein induces a cell cycle arrest when bound to E2F sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 5;92(25):11544-8.
593. Weintraub SJ, Chow KN, Luo RX, Zhang SH, He S, Dean DC. Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature*. 1995 Jun 29;375(6534):812-5.
594. Weintraub SJ, Prater CA, Dean DC. Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature*. 1992 Jul 16;358(6383):259-61.
595. Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*. 1998 Feb 5;391(6667):597-601.
596. Magnaghi-Jaulin L, Groisman R, Naguibneva I, Robin P, Lorain S, Le Villain JP, Troalen F, Trouche D, Harel-Bellan A. Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature*. 1998 Feb 5;391(6667):601-5.
597. Strobeck MW, Knudsen KE, Fribourg AF, DeCristofaro MF, Weissman BE, Imbalzano AN, Knudsen ES. BRG-1 is required for RB-mediated cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jul 5;97(14):7748-53.
598. Trouche D, Le Chalony C, Muchardt C, Yaniv M, Kouzarides T. RB and hbrm cooperate to repress the activation functions of E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Oct 14;94(21):11268-73.
599. Zhang HS, Gavin M, Dahiya A, Postigo AA, Ma D, Luo RX, Harbour JW, Dean DC. Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell*. 2000 Mar 31;101(1):79-89.
600. Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet*. 2000 Jul;25(3):338-42.
601. Dahiya A, Wong S, Gonzalo S, Gavin M, Dean DC. Linking the Rb and polycomb pathways. *Mol Cell*. 2001 Sep;8(3):557-69. Erratum in: *Mol Cell*. 2003 Jun;11(6):1693-6.

602. Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D, Firestein R, Cleary M, Jenuwein T, Herrera RE, Kouzarides T. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature*. 2001 Aug 2;412(6846):561-5.
603. Qin XQ, Chittenden T, Livingston DM, Kaelin WG Jr. Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. *Genes Dev*. 1992 Jun;6(6):953-64.
604. Horowitz JM, Park SH, Bogenmann E, Cheng JC, Yandell DW, Kaye FJ, Minna JD, Dryja TP, Weinberg RA. Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Apr;87(7):2775-9.
605. Stevaux O, Dyson NJ. A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol*. 2002 Dec;14(6):684-91.
606. Hiebert SW. Regions of the retinoblastoma gene product required for its interaction with the E2F transcription factor are necessary for E2 promoter repression and pRb-mediated growth suppression. *Mol Cell Biol*. 1993 Jun;13(6):3384-91.
607. Hamel PA, Gill RM, Phillips RA, Gallie BL. Regions controlling hyperphosphorylation and conformation of the retinoblastoma gene product are independent of domains required for transcriptional repression. *Oncogene*. 1992 Apr;7(4):693-701.
608. Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*. 1999 Sep 17;98(6):859-69.
609. Welch PJ, Wang JY. A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell*. 1993 Nov 19;75(4):779-90.
610. Xiao ZX, Chen J, Levine AJ, Modjtahedi N, Xing J, Sellers WR, Livingston DM. Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature*. 1995 Jun 22;375(6533):694-8.
611. Whitaker LL, Su H, Baskaran R, Knudsen ES, Wang JY. Growth suppression by an E2F-binding-defective retinoblastoma protein (RB): contribution from the RB C pocket. *Mol Cell Biol*. 1998 Jul;18(7):4032-42.
612. Welch PJ, Wang JY. Disruption of retinoblastoma protein function by coexpression of its C pocket fragment. *Genes Dev*. 1995 Jan 1;9(1):31-46.
613. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997 May 15;387(6630):296-9.
614. Hsieh JK, Chan FS, O'Connor DJ, Mittnacht S, Zhong S, Lu X. RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Mol Cell*. 1999 Feb;3(2):181-93.
615. Sterner JM, Dew-Knight S, Musahl C, Kornbluth S, Horowitz JM. Negative regulation of DNA replication by the retinoblastoma protein is mediated by its association with MCM7. *Mol Cell Biol*. 1998 May;18(5):2748-57.
616. Sterner JM, Murata Y, Kim HG, Kennett SB, Templeton DJ, Horowitz JM. Detection of a novel cell cycle-regulated kinase activity that associates with the

- amino terminus of the retinoblastoma protein in G2/M phases. *J Biol Chem.* 1995 Apr 21;270(16):9281-8.
617. Durfee T, Mancini MA, Jones D, Elledge SJ, Lee WH. The amino-terminal region of the retinoblastoma gene product binds a novel nuclear matrix protein that co-localizes to centers for RNA processing. *J Cell Biol.* 1994 Nov;127(3):609-22.
618. Xu HJ, Xu K, Zhou Y, Li J, Benedict WF, Hu SX. Enhanced tumor cell growth suppression by an N-terminal truncated retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Oct 11;91(21):9837-41.
619. Hsieh JK, Fredersdorf S, Kouzarides T, Martin K, Lu X. E2F1-induced apoptosis requires DNA binding but not transactivation and is inhibited by the retinoblastoma protein through direct interaction. *Genes Dev.* 1997 Jul 15;11(14):1840-52.
620. Lipinski MM, Jacks T. The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene.* 1999 Dec 20;18(55):7873-82. Review.
621. Ma D, Zhou P, Harbour JW. Distinct mechanisms for regulating the tumor suppressor and antiapoptotic functions of Rb. *J Biol Chem.* 2003 May 23;278(21):19358-66. Epub 2003 Mar 19.
622. Yee AS, Shih HH, Tevosian SG. New perspectives on retinoblastoma family functions in differentiation. *Front Biosci.* 1998 Jun 8;3:D532-47. Review.
623. Almasan A, Yin Y, Kelly RE, Lee EY, Bradley A, Li W, Bertino JR, Wahl GM. Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry, activation of E2F-responsive genes, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jun 6;92(12):5436-40.
624. Lundberg AS, Weinberg RA. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol.* 1998 Feb;18(2):753-61.
625. Knudsen ES, Wang JY. Differential regulation of retinoblastoma protein function by specific Cdk phosphorylation sites. *J Biol Chem.* 1996 Apr 5;271(14):8313-20.
626. Knudsen ES, Wang JY. Dual mechanisms for the inhibition of E2F binding to RB by cyclin-dependent kinase-mediated RB phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 1997 Oct;17(10):5771-83.
627. Templeton DJ, Park SH, Lanier L, Weinberg RA. Nonfunctional mutants of the retinoblastoma protein are characterized by defects in phosphorylation, viral oncoprotein association, and nuclear tethering. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Apr 15;88(8):3033-7.
628. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 1995 May 15;9(10):1149-63. Review.
629. van der Velden PA, Metzelaar-Blok JA, Bergman W, Monique H, Hurks H, Frants RR, Gruis NA, Jager MJ. Promoter hypermethylation: a common cause of reduced p16(INK4a) expression in uveal melanoma. *Cancer Res.* 2001 Jul 1;61(13):5303-6.

630. Otterson GA, Kratzke RA, Coxon A, Kim YW, Kaye FJ. Absence of p16INK4 protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB. *Oncogene*. 1994 Nov;9(11):3375-8.
631. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999 Jun 15;13(12):1501-12
632. Baldi A, Boccia V, Claudio PP, De Luca A, Giordano A. Genomic structure of the human retinoblastoma-related Rb2/p130 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 May 14;93(10):4629-32.
633. Ewen ME, Xing YG, Lawrence JB, Livingston DM. Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell*. 1991 Sep 20;66(6):1155-64.
634. Woo MS, Sánchez I, Dynlacht BD. p130 and p107 use a conserved domain to inhibit cellular cyclin-dependent kinase activity. *Mol Cell Biol*. 1997 Jul;17(7):3566-79.
635. Morgenbesser SD, Williams BO, Jacks T, DePinho RA. p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature*. 1994 Sep 1;371(6492):72-4.
636. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*. 2002 Aug;2(2):103-12. Review.
637. Howes KA, Ransom N, Papermaster DS, Lasudry JG, Albert DM, Windle JJ. Apoptosis or retinoblastoma: alternative fates of photoreceptors expressing the HPV-16 E7 gene in the presence or absence of p53. *Genes Dev*. 1994 Jun 1;8(11):1300-10. Erratum in: *Genes Dev* 1994 Jul 15;8(14):1738.
638. Nork TM, Poulsen GL, Millecchia LL, Jantz RG, Nickells RW. p53 regulates apoptosis in human retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*. 1997 Feb;115(2):213-9.
639. Laurie NA, Shih CS, Dyer MA. Targeting MDM2 and MDMX in retinoblastoma. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007 Nov;7(7):689-95.
640. Squire J, Phillips RA, Boyce S, Godbout R, Rogers B, Gallie BL. Isochromosome 6p, a unique chromosomal abnormality in retinoblastoma: verification by standard staining techniques, new densitometric methods, and somatic cell hybridization. *Hum Genet*. 1984;66(1):46-53.
641. Gallie BL, Campbell C, Devlin H, Duckett A, Squire JA. Developmental basis of retinal-specific induction of cancer by RB mutation. *Cancer Res*. 1999 Apr 1;59(7 Suppl):1731s-1735s.
642. Brantley MA Jr, Harbour JW. The molecular biology of retinoblastoma. *Ocul Immunol Inflamm*. 2001 Mar;9(1):1-8.
643. Salmonsens PC, Ellsworth RM, Kitchin FD. The occurrence of new retinoblastomas after treatment. *Ophthalmology*. 1979 May;86(5):837-43.
644. Turner DL, Cepko CL. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature*. 1987 Jul 9-15;328(6126):131-6.
645. Gonzalez-Fernandez F, Lopes MB, Garcia-Fernandez JM, Foster RG, De Grip WJ, Rosemberg S, Newman SA, VandenBerg SR. Expression of developmentally

- defined retinal phenotypes in the histogenesis of retinoblastoma. *Am J Pathol.* 1992 Aug;141(2):363-75. Review.
646. Hurwitz RL, Bogenmann E, Font RL, Holcombe V, Clark D. Expression of the functional cone phototransduction cascade in retinoblastoma. *J Clin Invest.* 1990 Jun;85(6):1872-8.
647. Adler R, Hatlee M. Plasticity and differentiation of embryonic retinal cells after terminal mitosis. *Science.* 1989 Jan 20;243(4889):391-3.
648. Matsunaga E. retinoblastoma in Japan: follow up survey of sporadic cases. *Jpn J Ophthalmol* 1976;20-266.
649. Ángel de las Heras Martín, José Abelairas Gómez, Ana Boto de los Bueys, Francisco Gayá Moreno. Reducción de los retinoblastomas con quimioterapia y tratamientos de consolidación. En: Actualización en cirugía oftálmica pediátrica. Parte 5. Capítulo 28. Ponencia oficial de la SEO 2000.
650. Alonso J, García-Miguel P, Abelairas J, Mendiola M, Pestaña A. A microsatellite fluorescent method for linkage analysis in familial retinoblastoma and deletion detection at the RB1 locus in retinoblastoma and osteosarcoma. *Diagn Mol Pathol.* 2001 Mar;10(1):9-14.
651. KAPLAN MEIER
652. Alonso J, García-Miguel P, Abelairas J, Mendiola M, Sarret E, Vendrell MT, Navajas A, Pestaña A. Spectrum of germline RB1 gene mutations in Spanish retinoblastoma patients: Phenotypic and molecular epidemiological implications. *Hum Mutat.* 2001 May;17(5):412-22.