

**Retinoblastoma – do diagnóstico ao aconselhamento genético, experiência
de 16 anos**

Pinto M.^{1*}, Garabal A.², Venâncio M.^{1,2}, Sá J.², Silva S.³, Van der Hout A.⁴, Saraiva
J.M.^{1,2}

¹*Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal*

²*Serviço de Genética Médica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal*

³*Serviço de Oncologia Pediátrica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal*

⁴*Department of Genetics, University Medical Centre Groningen, Netherlands*

**Email: martapinto7@gmail.com*

Resumo

O Retinoblastoma é um tumor maligno das células precursoras da retina que resulta de mutações no gene supressor tumoral *RBI*. Tem uma incidência de 1 em 15000-20000 nascimentos, e ocorre em crianças antes dos 5 anos de idade.

Este estudo teve como objetivo avaliar a realização do estudo molecular do gene *RBI* para confirmação molecular do diagnóstico em crianças e adolescentes com história pessoal de retinoblastoma de forma a facilitar o aconselhamento genético.

Estudaram-se dez casos, com antecedentes de retinoblastoma e com idades compreendidas entre os cinco e os 16 anos. Posteriormente foram incluídos 15 familiares. Todos os indivíduos receberam aconselhamento genético.

Dos 10 casos, seis (60%) tiveram retinoblastoma unilateral, com uma idade média de diagnóstico de 29,8 meses. Os restantes quatro (40%) tiveram retinoblastoma bilateral, com uma idade média de diagnóstico de 12,7 meses. Foi identificada história familiar de retinoblastoma em três (33,3%) dos casos. Em seis (60%), dois dos seis com retinoblastoma unilateral e todos os quatro com retinoblastoma bilateral, foi encontrada uma mutação, incluindo um mosaicismo. Os testes foram também efetuados a 15 familiares, tendo sido identificados oito indivíduos heterozigotos.

Este estudo enfatiza a importância do estudo molecular do gene *RBI* no plano de seguimento de todos os casos com retinoblastoma, através da integração de uma equipa multidisciplinar para melhorar a sua vigilância e proporcionar um aconselhamento genético adequado ao próprio e aos seus familiares.

Palavras-Chave

Retinoblastoma; Aconselhamento genético; Gene *RBI*; Cancro hereditário.

Introdução

O retinoblastoma (RTB) (OMIM #180200) é o tumor intraocular primário mais comum em crianças, com origem nas células em desenvolvimento da retina, cuja incidência estimada varia entre 1 em 15,000 e 1 em 20,000 nascimentos.¹ Pode ocorrer em qualquer idade pediátrica,² sendo mais frequente em crianças com menos de dois anos. Na maioria dos casos, o diagnóstico é feito antes dos 5 anos de idade.^{1,3}

O diagnóstico é baseado na história clínica, exame físico, exame histológico e exames imagiológicos.⁴ Os sinais mais frequentes são: a presença de reflexo pupilar branco (leucocória) e estrabismo. A confirmação do diagnóstico é normalmente feita através da avaliação do fundo ocular usando oftalmoscopia indireta. Outros exames complementares de imagem, como a ressonância magnética, a ecografia e a tomografia computadorizada, podem ser pedidos para diagnóstico diferencial e estadiamento. Se for realizada enucleação, a histopatologia confirma o diagnóstico de RTB.⁵

O tratamento do RTB depende do estágio do tumor, do número de focos tumorais (doença unifocal, unilateral multifocal ou bilateral), da localização e do tamanho do tumor dentro do olho, da presença de sementeira vítrea e da idade da criança. As opções de tratamento atuais incluem a enucleação, quimioterapia (sistêmica ou regional), radioterapia (externa ou braquiterapia com placas episclerais), crioterapia e fotocoagulação. Se não houver indicação da presença de células tumorais no exterior do olho, o tratamento é concluído com sucesso na maioria das crianças. No entanto, um RTB com presença de metástases apresenta geralmente um mau prognóstico. Após um tratamento com sucesso, as crianças necessitam de um seguimento regular, para a detecção precoce de recidiva ou de aparecimento de novo tumor intraocular.⁵

Cerca de 40% dos RTB são hereditários, resultando de mutações germinativas. Os restantes 60% são esporádicos, com origem em mutações somáticas. O RTB esporádico tem geralmente uma apresentação unilateral, sendo a idade média de diagnóstico de 24 meses. Nas crianças com RTB hereditário, a idade média de diagnóstico é mais precoce, por volta dos 12 meses, e aproximadamente 85% são bilaterais.⁶ Em apenas 10% dos doentes com RTB existe história familiar de RTB com uma hereditariedade autossômica dominante. Nestas circunstâncias, deve ser realizada avaliação oftalmológica a todos os familiares em primeiro grau para identificar possíveis cicatrizes ou tumores quiescentes (retinomas), que também são compatíveis com doença familiar e que quase sempre são desconhecidos.⁷ Por vezes, para além do RTB bilateral, desenvolve-se um tumor na região da glândula pineal correspondendo a retinoblastoma intracraniano ectópico, designado neste caso como RTB trilateral.⁴

Em 1971, *Knudson* propôs a hipótese dos dois eventos mutacionais (“*two-hit hypothesis*”), os quais teriam de ocorrer num determinado gene para a tumorigénese (**Fig. 1**).⁸ Nos tumores esporádicos, ambos os eventos (M1 e M2) são adquiridos nas células somáticas. Nas formas hereditárias, o primeiro evento (M1) é por definição germinativo, podendo ser herdado (em 10 a 15% dos casos) ou ter ocorrido *de novo* (em cerca de 85% dos casos), sendo

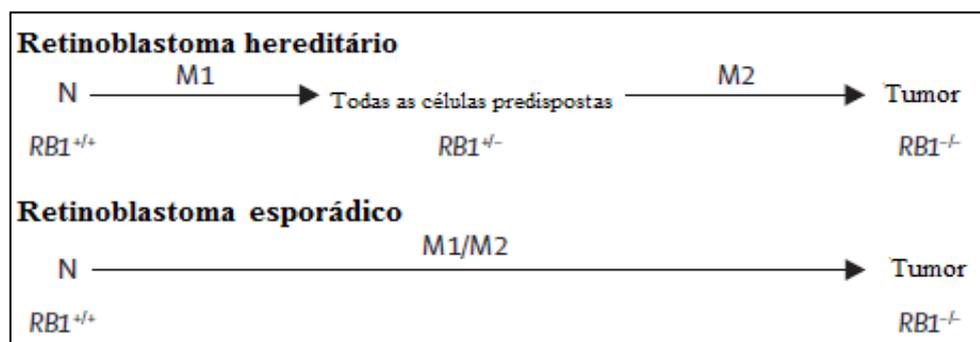


Fig. 1 - Genética do RTB hereditário e esporádico.

N= normal. RB1^{+/+}= dois alelos RB1 normais. M1= mutação germinativa. RB1^{+/-}= um alelo mutado e um alelo normal. M2= mutação somática. RB1^{-/-}= dois alelos mutados. (Imagem adaptada de Dimaras et al. (2012). *Retinoblastoma*. The Lancet 379, 1436-1446.)

assim apenas necessário que ocorra um evento somático (M2), para o desenvolvimento de RTB.⁵ Nestas circunstâncias, a probabilidade deste único evento somático ocorrer numa determinada célula é muito maior do que os dois eventos independentes nos dois alelos numa mesma célula. Isto explica consequentemente a maior frequência, precocidade do diagnóstico e número de focos tumorais observados nos casos familiares em comparação com os esporádicos.⁹

Em alguns indivíduos, são identificados mosaicismos, os quais são explicados por fenómenos pós-zigóticos. Nestes casos, a mutação não está presente em todas as células, pelo que a apresentação clínica, assim como o risco de transmissão à descendência, vai depender da percentagem do mosaicismo e da distribuição celular.⁵ Mosaicismos estão presentes em cerca de 4% dos doentes com RTB unilateral e em cerca de 6% dos doentes com RTB bilateral.^{10,11}

Em 1986 foi identificado um gene no braço longo do cromossoma 13 (13q14.2), designado por *RBI* (OMIM *614041), numa região onde tinham sido identificadas mutações em crianças com RTB bilateral, confirmando-se assim a suscetibilidade genética do RTB.¹² É constituído por 27 exões, e codifica uma fosfoproteína (pRB) que tem como função regular um dos pontos de verificação (“*check point*”) do ciclo celular entre G1 e a entrada na fase S.¹³

O estudo molecular do gene *RBI* encontra-se disponível há mais de 15 anos, e a sua sensibilidade continua a aumentar devido à melhoria contínua das técnicas de biologia molecular. A capacidade de detetar uma mutação germinativa em indivíduos com RTB bilateral é de cerca de 90% a 95%, dependendo dos métodos utilizados.¹⁴ Para indivíduos com doença bilateral ou história familiar conhecida de RTB, o teste molecular é realizado diretamente a partir de uma amostra de sangue periférico, de forma a identificar mutações no

gene *RBI*. Nos casos com RTB unilateral (sem história familiar), o estudo inicia-se pela análise do gene *RBI* na peça tumoral (quando disponível após enucleação), seguido da pesquisa, no ADN extraído do sangue periférico, das mutações encontradas no tumor para determinar se estamos perante um caso hereditário.¹⁵ Em cerca de 14% dos casos de RTB unilateral sem história familiar, é identificada, no sangue periférico, uma das mutações encontradas no tumor, quer em heterozigotia, (correspondendo a uma mutação germinativa), quer em mosaico (correspondendo a um fenómeno pós-zigótico).⁹

A predisposição genética para RTB é autossómica dominante e tem uma expressividade variável e uma penetrância incompleta. A penetrância é de cerca 90%, isto é, 90% dos heterozigotos terão RTB e os restantes 10% serão heterozigotos assintomáticos. Assim sendo, o risco de um indivíduo afetado ou de um heterozigoto (assintomático) ter um descendente com RTB será de 45% [50% (risco de transmissão do alelo mutado) x 90% (penetrância)].^{9,16}

Devido aos avanços recentes nas diferentes modalidades de tratamento do retinoblastoma, o seu prognóstico tem vindo a melhorar e a sobrevida aos 10 anos após o início do tratamento é já de cerca de 90%.¹⁷ Neste sentido torna-se crucial ter em atenção as implicações que a predisposição genética do RTB poderá ter no doente e seus familiares ao longo da sua vida. Uma das implicações é o aumento do risco de segundas neoplasias (osteossarcomas, sarcomas dos tecidos moles, neoplasias epiteliais, melanoma), cuja incidência em sobreviventes de retinoblastoma hereditário é de 0,5 a 1% por ano, que leva a que estes doentes devam de ter vigilância médica adequada ao longo da vida.^{18,19} Para além disso, familiares assintomáticos que possuam a mesma mutação que o indivíduo afetado, beneficiam de um rastreio precoce e adequado para o RTB e outras neoplasias.²⁰ Contrariamente, os familiares em que não for encontrada nenhuma mutação, não requerem

uma avaliação oftalmológica regular, levando a uma redução significativa dos custos nos cuidados de saúde e a uma diminuição do potencial de morbidade.^{14,15,21} De forma semelhante, a confirmação molecular da doença permite melhorar o aconselhamento genético para os seus progenitores no que diz respeito à avaliação do risco de recorrência e à possibilidade de realização de um diagnóstico genético pré-implantação ou diagnóstico pré-natal molecular (por biopsia das vilosidades coriônicas entre as 11 e as 13 semanas de gestação ou por amniocentese entre as 16 e as 18 semanas).^{22,23}

Assim, os testes moleculares revolucionaram o acompanhamento de doentes com RTB e seus familiares, permitindo o diagnóstico e tratamento precoce de outras neoplasias, eliminando a necessidade de uma vigilância regular em indivíduos sem mutações germinativas e facilitando o aconselhamento genético.

A realização deste trabalho teve como objetivo principal a avaliação da realização do estudo molecular do gene *RBI* para confirmação molecular do diagnóstico clínico de RTB de doentes seguidos no Hospital Pediátrico Carmona da Mota, em Coimbra, de forma a promover o aconselhamento genético a toda a família.

Materiais e métodos

Foram inseridas neste estudo 10 casos (três do sexo feminino e sete do sexo masculino) com idades compreendidas entre os cinco e os 16 anos de idade, com história pessoal de retinoblastoma, referenciados ao serviço de genética do Hospital Pediátrico Carmona da Mota pelo serviço de Oncologia do mesmo hospital entre Novembro de 2011 e Abril de 2012. Em três casos foi identificada também história familiar.

Todas as crianças e adolescentes são acompanhados no Hospital Pediátrico Carmona da Mota em Coimbra desde o momento do diagnóstico, por uma equipa multidisciplinar que inclui oncologistas, oftalmologistas, otorrinolaringologistas e geneticistas.

Foram posteriormente incluídos no estudo os 15 familiares (dos casos em que foi detetada uma mutação no gene *RBI*) que solicitaram a realização dos testes genéticos após serem devidamente informados sobre a importância da sua realização.

Inicialmente foi realizada uma primeira consulta em que foi recolhida toda a informação da história pessoal de RTB e da história familiar. Todos os indivíduos incluídos no estudo foram informados das possibilidades e limitações do estudo molecular tendo concordado com a sua realização. Foram recolhidas amostras de sangue periférico e realizados os testes moleculares apenas aos indivíduos afetados. Posteriormente foram recolhidas amostras de sangue periférico aos familiares dos casos em que foi possível confirmar molecularmente a doença.

O estudo molecular do gene *RBI* foi realizado no Departamento de Genética da *University Medical Center Groningen*. As sequências codificantes (exões), as sequências intrónicas flanqueadoras, bem como a região promotora, foram analisadas por sequenciação direta. Para a análise de rearranjos intragénicos (deleções e duplicações de um ou mais exões) do gene *RBI* foi utilizada a *multiplex-ligation dependent probe amplification* (MLPA) (MRC

Holland kit P047-B1). Estas duas técnicas em conjunto detetam mais de 90% das mutações germinativas no gene *RBI* em doentes com RTB familiar e/ou bilateral.

Não foi possível a realização da análise do ADN tumoral em nenhum dos casos, uma vez que não foi possível ter acesso a nenhuma das amostras tumorais dos doentes em que houve enucleação, devido ao tempo já decorrido entre o diagnóstico e a realização dos testes moleculares.

Foi obtido o consentimento informado de todos os doentes de acordo com os princípios da declaração de Helsínquia. O estudo foi aprovado pelo comité de ética do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

Todos os resultados adquiridos até ao momento foram comunicados aos progenitores numa última consulta, concluindo-se o processo de aconselhamento genético com a elaboração de um relatório de alta com toda a informação.

Resultados

A **tabela 1** resume os dados clínicos e moleculares relativos aos dez casos *índex*. A idade média do diagnóstico é de 19,5 meses, sendo maior (29,8 meses) nos casos com RTB unilateral e menor (12,7 meses) nos com RTB bilateral. Seis (60%) tiveram RTB unilateral e quatro (40%) tiveram RTB bilateral. Relativamente à história familiar, esta foi positiva em três doentes (33,3%).

O estudo molecular do gene *RBI* identificou uma mutação em seis doentes (60%), dois dos seis com RTB unilateral e todos os quatro com RTB bilateral. Em relação à história familiar destes seis casos, os respetivos heredogramas estão representadas nas **Fig. 2, 3, 4, 5, 6, e 7**. Foi realizado estudo molecular em 15 familiares dos seis casos *índex* (incluindo pais, irmãos, avós, tios e primos) onde se confirmou molecularmente o diagnóstico, estando os respetivos resultados descritos na **tabela 2**.

Discussão

Em Portugal, a realização de testes moleculares em famílias com RTB ainda não faz sempre parte do seguimento destes doentes, devido ao facto de não existirem laboratórios locais que disponibilizem os testes para esta patologia. É útil reforçar a importância da realização destes testes, uma vez que podem ter grande influência não só no diagnóstico mas, principalmente, no prognóstico da doença.

Os riscos e benefícios da realização de testes de suscetibilidade genética no cancro dependem da compreensão da genética do cancro, da precisão do teste e da disponibilidade dos portadores da mutação para a realização de intervenções eficazes.²⁴

Analisando os resultados do nosso estudo pudemos constatar uma diferença na percentagem de doentes com RTB hereditário (60%), de doentes com RTB não hereditário relativamente aos resultados já publicados na literatura^{25,26}, facilmente justificável pela dimensão reduzida da amostra (**Tabelas 3 e 4**). A idade média do diagnóstico, tanto no caso dos RTB bilaterais como no caso dos RTB unilaterais, bem como a percentagem de doentes com RTB unilateral (60%) e bilateral (40%), foram consistentes com os resultados já encontrados na literatura.⁶ Na nossa casuística, nos doentes com RTB unilateral identificou-se uma percentagem superior (33,3%) de casos com mutação germinativa comparativamente ao que se encontra descrito na literatura (~14%).⁹ Todos os RTB bilaterais estudados tiveram confirmação molecular, no entanto a diferença não é significativa em relação à literatura (**Tabelas 3 e 4**).

Em quatro dos seis RTB unilaterais (66,6%) não foi detetada nenhuma mutação germinativa, uma vez que, muito provavelmente, corresponderão a casos esporádicos resultantes de mutações nas células somáticas. Esta percentagem é inferior à que se encontra descrita na literatura (~86%) o que é justificável pelo aumento de casos de RTB unilaterais

com mutação germinativa no nosso estudo (**Tabelas 3 e 4**).⁹ Nestes casos teria sido fundamental fazer o estudo molecular na peça tumoral.

Tendo em conta o objetivo deste trabalho, é importante analisarmos o impacto da realização dos testes moleculares no doente e na respetiva família. Em quatro casos (todos RTB unilaterais e sem antecedentes familiares da doença), não foi encontrada nenhuma mutação na amostra de sangue periférico, não sendo por isso necessário realizar testes genéticos nos pais e irmãos. Nestas circunstâncias, no que diz respeito ao aconselhamento genético, existe um risco empírico de recorrência de 1 a 2% para outros irmãos e de 6 a 50% para descendentes do indivíduo afetado, pelo que está indicado realizar avaliações oftalmológicas logo após o nascimento. Não é possível oferecer um diagnóstico pré-natal orientado ou um diagnóstico genético pré-implantação.

Nos restantes seis casos foi encontrada uma mutação tendo sido por isso realizados testes genéticos em familiares.

Na família 2 (**Fig.3**), uma vez que estamos perante um mosaicismo, a mutação ocorreu na fase pós-zigótica, ou seja, é uma mutação *de novo*, não sendo assim necessário que os progenitores realizem os testes moleculares.⁹ Não existe um risco específico acrescido de RTB para outros filhos do casal ou para outros familiares, a não ser para a descendência de III:1 em que a probabilidade de herdar o alelo mutado poderá ser de até 50%.

Nas famílias 1 (**Fig.2**), 5 (**Fig.6**) e 6 (**Fig.7**), foi encontrada uma mutação num dos progenitores, fazendo com que estes tenham uma probabilidade de 50% de transmitir a mutação à descendência.⁹ Tendo em conta que o RTB tem uma penetrância de 90%, a probabilidade destes serem afetados é de 45%. Desta forma, a confirmação molecular possibilita oferecer diagnóstico pré-natal molecular por biopsia das vilosidades coriônicas ou por amniocentese.²⁷ Uma outra opção para estes casais passa pelo diagnóstico genético pré-

implantação, que combina a fertilização *in vitro* (FIV) com a análise genética de blastómeros, selecionando assim os embriões que não possuem a mutação.²² No caso da família 6, deverá também efetuar aconselhamento genético a III:2 (heterozigótico sintomático), a II:4 (heterozigótico assintomático) e ao indivíduo II:1 que ainda aguarda o resultado do teste molecular, no entanto tendo em conta o tipo de hereditariedade da doença (autossômica dominante) será um heterozigótico obrigatório (assintomático). O indivíduo III:4 deverá também realizar os testes moleculares para que, em caso de positividade, usufrua de aconselhamento genético.

Na família 3 (**Fig.4**), não foi encontrada nenhuma mutação em nenhum dos progenitores, podendo ser explicado por uma mutação germinativa *de novo*, o que se verifica em 85% dos casos. No entanto, uma vez que não pode ser excluída a existência em um dos progenitores de um mosaicismo gonadal ou de um mosaicismo de muito baixa expressão, existe um risco específico de 3 a 5% de RTB para outros filhos deste casal.^{26,28} Assim, este casal, se o desejar, poderá ser orientado para diagnóstico pré-natal molecular ou para diagnóstico genético pré-implantação moleculares. O risco de transmissão da mutação para a descendência do indivíduo III:1 é de 50% e de 45% de ser afetado.

Na família 4 (**Fig.5**), aguardamos o resultado da amostra de um dos progenitores (II:6). Se a mutação não for identificada em nenhum deles o aconselhamento é igual ao da família 3, caso seja encontrada em um deles, o aconselhamento deverá ser feito da mesma forma que às famílias 1, 5 e 6.

Tendo em conta alguns estudos de *follow-up* em doentes com mutação germinativa no gene *RBI*²⁹⁻³³, indivíduos com retinoblastoma hereditário possuem um risco aumentado para outras neoplasias primárias (osteossarcoma, sarcoma dos tecidos moles, melanoma e tumores epiteliais) que conseqüentemente se encontram associadas a um aumento da

mortalidade.^{18,34,35} Uma vez que não existe um protocolo específico para estas neoplasias, é de salientar a importância do acompanhamento médico regular nestes doentes para que seja possível o diagnóstico precoce e um tratamento adequado.

Em conclusão, este trabalho, apesar da reduzida amostra, permitiu reforçar a necessidade de implementar um protocolo de seguimento e aconselhamento genético em indivíduos diagnosticados com RTB, para que se possa agir precocemente com o objetivo de melhorar o prognóstico e qualidade de vida destes doentes e de evitar o aparecimento desta patologia em outros membros da família.

Tabela 1

Dados demográficos e mutações identificadas em 10 casos com retinoblastoma, encaminhados para o Serviço de Genética do Hospital Pediátrico Carmona da Mota, Coimbra, entre Novembro de 2011 e Abril de 2012.

Doente	Idade	Sexo	Idade de diagnóstico	Clinica no momento do diagnóstico	Lateralidade	Terapêutica instituída	História familiar de RTB	Presença de mutação	Mutação identificada
1	14 A	F	13 m	-	Unilateral (OD)	Enucleação	Irmão (unilateral, OE)	Sim	c.500+1G>A
2	11 A	F	28 m	Estrabismo	Unilateral (OE)	Enucleação	-	Sim	c.1072C>T(p.Arg358X)
3	12 A	M	22 m	Leucocória	Bilateral	Enucleação (OD) QT, Crio	-	Sim	c.763C>T (p.Arg255X)
4	16 A	M	3 m	Leucocória	Bilateral	Enucleação (OE) QT	-	Sim	c.1735C>T(p.Arg579X)
5	15 A	M	0 m	Leucocória	Bilateral	Crio, QT, Laser	Mãe (unilateral, OE)	Sim	c.1858dupA
6	14 A	F	10 m	-	Trilateral	Enucleação (OD) Crio, QT	Primo (bilateral)	Sim	c.1696-2A>G
7	12 A	M	22 m	Leucocória e estrabismo	Unilateral (OD)	Enucleação QT, RT	-	Não	-
8	9 A	M	27 m	Leucocória e estrabismo	Unilateral (OE)	QT	-	Não	-
9	10 A	M	4 A	Descolamento de retina	Unilateral (OE)	Enucleação QT, RT	-	Não	-
10	5 A	M	22 m	Leucocória	Unilateral (OE)	QT	-	Não	-

A – anos; m – meses; F – feminino; M – masculino; OD – olho direito; OE – olho esquerdo; QT – quimioterapia; RT – radioterapia; Crio – crioterapia.

Tabela 2

Resultados dos testes moleculares efetuados em 15 familiares dos 6 casos *índex*.

Família	1		2	3		4		5	6							
Indivíduos estudados (grau de parentesco)	II:2 (Pai)	III:1 (Irmão)		II:5 (Pai)	II:6 (Mãe)	II:5 (Pai)	II:6 (Mãe)	II:2 (Mãe)	II:9 (Pai)	III:8 (Irmã)	I:2 (Avó)	III:2 (Primo)	II:4 (Tia paterna)	II:6 (Tia paterna)	II:8 (Tia paterna)	II:1 (Tio paterno)
Resultado do estudo	+	Em curso	X	-	-	-	Em curso	+	+	-	+	+	+	-	-	Em curso
Familiar com história pessoal de RTB		■					■					■				

+ = Presença de mutação; - = Ausência de mutação; X = Sem familiares estudados; ■ = Familiar afetado.

Tabela 3**Percentagem de RTB quanto à lateralidade e à presença de mutação germinativa na literatura.**

Literatura	RTB (%)	RTB com mutação germinativa (%)
RTB unilateral	40%	~14%
RTB bilateral	60%	95%

RTB = retinoblastoma.

Tabela 4**Percentagem de RTB quanto à lateralidade e à presença de mutação germinativa na casuística.**

Casuística	RTB (N.º casos/Total, %)	RTB com mutação germinativa (N.º casos/Total, %)
RTB unilateral	6/10, 60%	2/6, 33,3%
RTB bilateral	4/10, 40%	4/4, 100%

RTB = retinoblastoma.

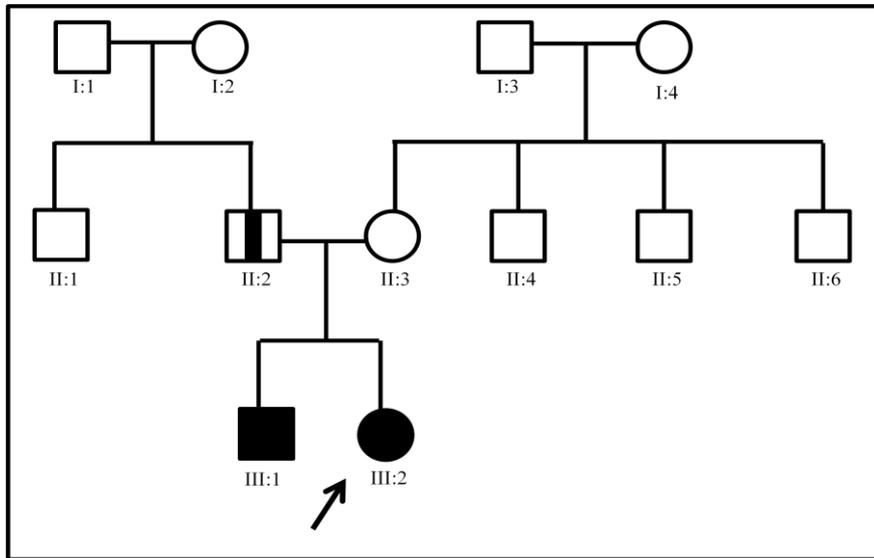


Fig. 2 - Família 1. Encontrada mutação em II:2 e III:1. ▨ = Heterozigótico assintomático. ■ = Heterozigótico com RTB. ● = Heterozigótica com RTB.

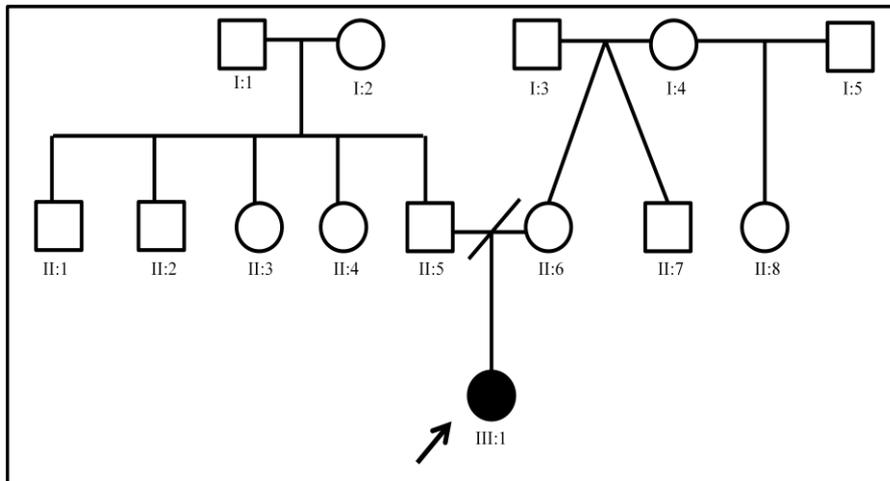


Fig. 3 - Família 2. ● = Heterozigótica com RTB.

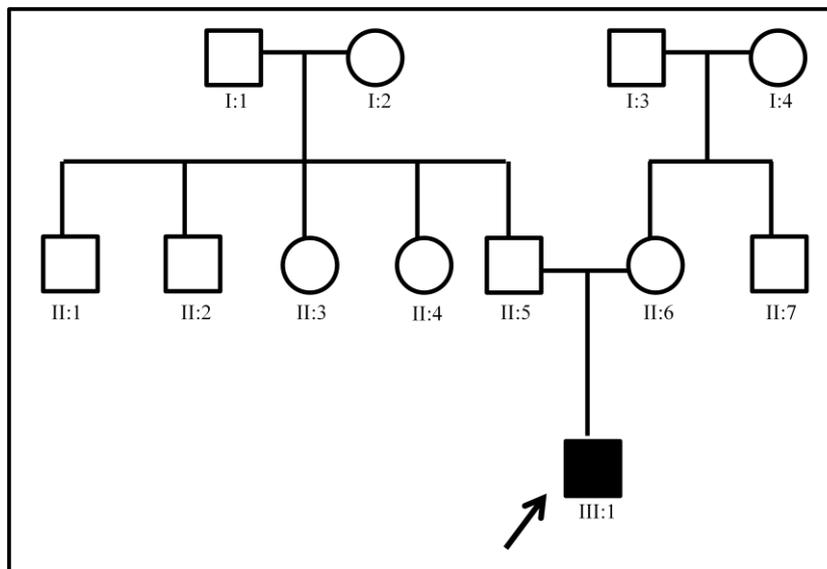


Fig. 4 - Família 3. Em II:5 e II:6 foi pesquisada a mutação com resultado negativo. ■ = Heterozigótico com RTB.

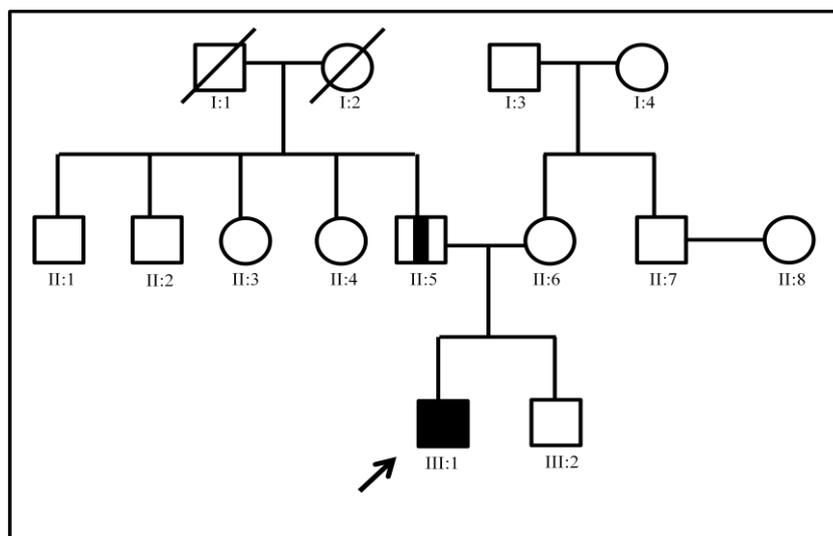


Fig. 5 - Família 4. Encontrada mutação em II:5. ■ = Heterozigótico com RTB. ▨ = Heterozigótico assintomático.

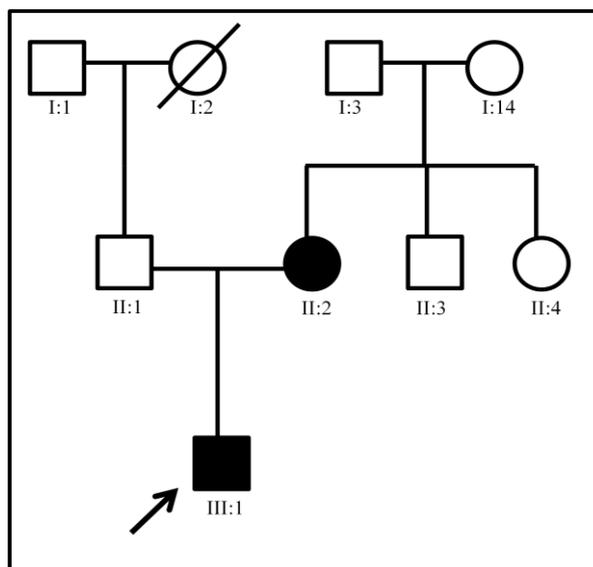


Fig. 6 - Família 5. Encontrada mutação em II:2. ■ = Heterozigótico com RTB. ● = Heterozigótica com RTB.

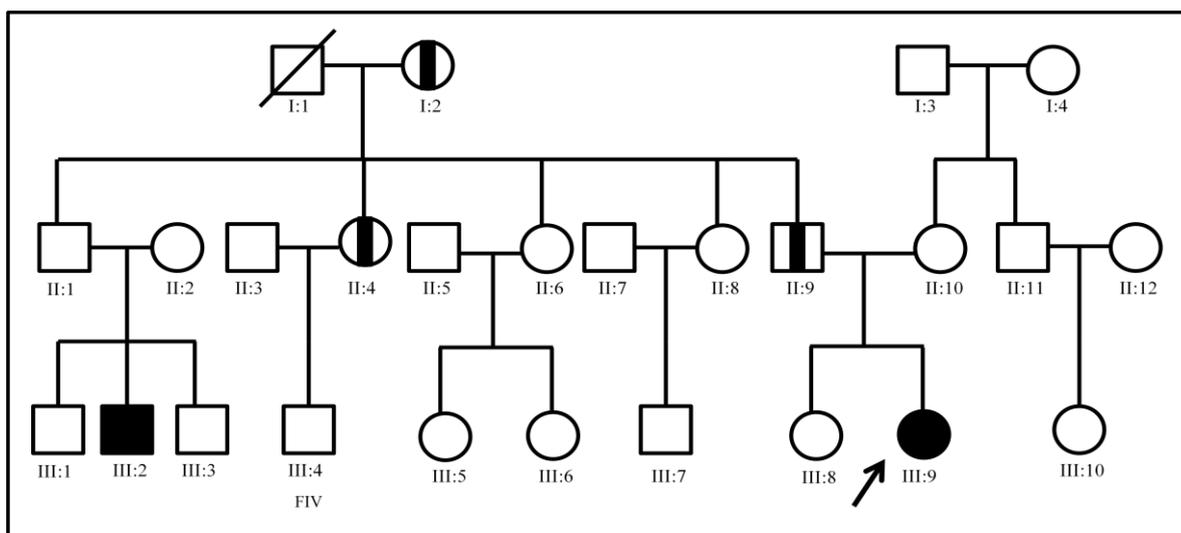


Fig. 7 - Família 6. Encontrada mutação em I:2, II:4, II:9 e III:2. Em II:6, II:8 e III:8 foi pesquisada a mutação, com resultado negativo. ● = Heterozigótica com RTB. ■ = Heterozigótico com RTB. ◻ = Heterozigótico assintomático. ◐ = Heterozigótica assintomática. FIV – Fertilização *in vitro*.

Bibliografia

1. Moll, A.C., Kuik, D.J., Bouter, L.M., Den Otter, W., Bezemer, P.D., Korten, J.W., Imhof, S.M., Kuyt, B.P., and Tan, K.E. (1997). Incidence and survival of retinoblastoma in The Netherlands: a register based study 1862-1995. *The British Journal of Ophthalmology* 81, 559–562.
2. Biswas, J., Mani, B., Shanmugam, M.P., Patwardhan, D., Kumar, K.S., and Badrinath, S.S. (2000). Retinoblastoma in adults. Report of three cases and review of the literature. *Survey of Ophthalmology* 44, 409–414.
3. Odashiro, A.N., Pereira, P.R., De Souza Filho, J.P., Cruess, S.R., and Burnier, M.N. (2005). Retinoblastoma in an adult: case report and literature review. *Canadian Journal of Ophthalmology. Journal Canadien D'ophtalmologie* 40, 188–191.
4. Godson, O.C., Williams Jr, B.K., Scheffler, A.C., Bhagat, S.P., Houdayer, C., Gauthier-Villars, M., Castéra, L., Desjardins, L., Doz, F., Stoppa-Lyonnet, D., et al. (2012). Retinoblastoma - An Update on Clinical , Genetic Couselling, Epidemiology and Molecular Tumor Biology (Rijeka, Croatia: InTeck).
5. Lohmann, D.R., and Gallie, B.L. (2011). Retinoblastoma. In *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Chichester, ed.
6. Atchaneeyasakul, L., and Murphree, A. (2001). Retinoblastoma. In *Ryan SJ, Retina*, ed. (Mosby Inc.), pp. 513–570.

7. Gallie, B., Ellsworth, R., Abramson, D., and Phillips, R. (1982). Retinoma: spontaneous regression of retinoblastoma or benign manifestation of the mutation? *British Journal of Cancer* 45, 513–521.
8. Ellisen, L.W., and Haber., D.A. (2010). Principles of Cancer Genetics. In *Principles of Clinical Cancer Genetics: A Handbook from the Massachusetts General Hospital.*, D.C. Chung, and D.A. Haber, eds. (Springer),.
9. Lohmann, D.R., and Gallie, B.L. (Updated 2010). Retinoblastoma. In: *GeneReviews at GeneTests Medical Genetics Information Resource* (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2013. Available at <http://www.genetests.org>. Accessed [March 2012].
10. Lohmann, D.R., and Gallie, B.L. (2004). Retinoblastoma: revisiting the model prototype of inherited cancer. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* 129C, 23–28.
11. Schüler, A., Weber, S., Neuhäuser, M., Jurklies, C., Lehnert, T., Heimann, H., Rudolph, G., Jöckel, K.-H., Bornfeld, N., and Lohmann, D.R. (2005). Age at diagnosis of isolated unilateral retinoblastoma does not distinguish patients with and without a constitutional RB1 gene mutation but is influenced by a parent-of-origin effect. *European Journal of Cancer* (Oxford, England : 1990) 41, 735–740.
12. Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Albert, D.M., and Dryja, T.P. (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323, 643–646.

13. Aerts, I., Lumbroso-Le Rouic, L., Gauthier-Villars, M., Brisse, H., Doz, F., and Desjardins, L. (2006). Retinoblastoma. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 1, 31.
14. Richter, S., Vandezande, K., Chen, N., Zhang, K., Sutherland, J., Anderson, J., Han, L., Panton, R., Branco, P., and Gallie, B. (2003). Sensitive and efficient detection of RB1 gene mutations enhances care for families with retinoblastoma. *American Journal of Human Genetics* 72, 253–269.
15. Cowell, J.K., and Gallie, B.L. (1998). Which Retinoblastoma Patients Should be Screened for RB1 Mutations ? *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 34, 1825–1826.
16. Harbour, J. (2001). Molecular basis of low-penetrance retinoblastoma. *Archives of Ophthalmology* 119, 1699–1704.
17. Murakami, Y., Kodama, T., Suzuki, S., Kaneko, A., Sugano, K., Yoshida, T., Izumi, H., Umezawa, S., Ushiyama, M., Ichikawa, A., et al. (2004). Outpatient clinic for genetic counseling and gene testing of retinoblastoma. *International Journal of Clinical Oncology* 9, 25–30.
18. Marees, T., Van Leeuwen, F.E., De Boer, M.R., Imhof, S.M., Ringens, P.J., and Moll, a C. (2009). Cancer mortality in long-term survivors of retinoblastoma. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 45, 3245–3253.
19. Acquaviva, A., Ciccolallo, L., Rondelli, R., Balistreri, A., Ancarola, R., Cozza, R., Hadjistilianou, D., Francesco, S. De, Toti, P., Pastore, G., et al. (2006). Mortality from second tumour among long-term survivors of retinoblastoma: a retrospective analysis of the Italian retinoblastoma registry. *Oncogene* 25, 5350–5357.

-
20. Abramson, D.H., Beaverson, K., Sangani, P., Vora, R. a, Lee, T.C., Hochberg, H.M., Kirsztrot, J., and Ranjithan, M. (2003). Screening for retinoblastoma: presenting signs as prognosticators of patient and ocular survival. *Pediatrics* 112, 1248–1255.
21. Noorani, H.Z., Khan, H.N., Gallie, B.L., and Detsky, a S. (1996). Cost comparison of molecular versus conventional screening of relatives at risk for retinoblastoma. *American Journal of Human Genetics* 59, 301–307.
22. Xu, K., Rosenwaks, Z., Beaverson, K., Cholst, I., Veeck, L., and Abramson, D.H. (2004). Preimplantation genetic diagnosis for retinoblastoma: the first reported liveborn. *American Journal of Ophthalmology* 137, 18–23.
23. Dhanjal, S., Kakourou, G., Mamas, T., Saleh, N., Doshi, A., Gotts, S., Nuttall, S., Fordham, K., Serhal, P., Delhanty, J., et al. (2007). Preimplantation genetic diagnosis for retinoblastoma predisposition. *The British Journal of Ophthalmology* 91, 1090–1091.
24. Collins, F., Benjamin, L., Botstein, D., Jerome, R., Davidson, N., Gray, J.W., Holtzman, N., Housman, D.E., Jamison, K.R., Rothstein, R., et al. (1994). Statement on use of DNA testing for presymptomatic identification of cancer risk. National Advisory Council for Human Genome Research. *JAMA : the Journal of the American Medical Association* 271, 785.
25. Moll, a C., Imhof, S.M., Meeteren, a Y., and Boers, M. (2000). At what age could screening for familial retinoblastoma be stopped? A register based study 1945-98. *The British Journal of Ophthalmology* 84, 1170–1172.

26. Rushlow, D., Piovesan, B., Zhang, K., Prigoda-Lee, N.L., Marchong, M.N., Clark, R.D., and Gallie, B.L. (2009). Detection of mosaic RB1 mutations in families with retinoblastoma. *Human Mutation* 30, 842–851.
27. Pierro, L., Brancato, R., and Capoferri, C. (1993). Prenatal detection and early diagnosis of hereditary retinoblastoma in a family. *Ophthalmologica. Journal International D’ophtalmologie. International Journal of Ophthalmology. Zeitschrift Für Augenheilkunde* 207, 106–111.
28. Chen, H. (2012). *Atlas of Genetic Diagnosis and Counseling* (Springer).
29. Moll, A.C., Imhof, S.M., Bouter, L.M., Kuik, D.J., Den Otter, W., Bezemer, P.D., Koten, J.W., and Tan, K.E. (1996). Second primary tumors in patients with hereditary retinoblastoma: a register-based follow-up study, 1945-1994. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 67, 515–519.
30. Fletcher, O., Easton, D., Anderson, K., Gilham, C., Jay, M., and Peto, J. (2004). Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors. *Journal of the National Cancer Institute* 96, 357–363.
31. Kleinerman, R.A., Tucker, M.A., Tarone, R.E., Abramson, D.H., Seddon, J.M., Stovall, M., Li, F.P., and Fraumeni, J.F. (2005). Risk of new cancers after radiotherapy in long-term survivors of retinoblastoma: an extended follow-up. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 2272–2279.

-
32. Marees, T., Moll, A.C., Imhof, S.M., De Boer, M.R., Ringens, P.J., and Van Leeuwen, F.E. (2008). Risk of second malignancies in survivors of retinoblastoma: more than 40 years of follow-up. *Journal of the National Cancer Institute* *100*, 1771–1779.
33. Type, T. (2010). Review of 676 Second Primary Tumors in Patients With Retinoblastoma. *Archives of Ophthalmology* *128*, 865–870.
34. Eng, C., Li, F.P., Abramson, D.H., Ellsworth, R.M., Wong, F.L., Goldman, M.B., Seddon, J., Tarbell, N., and Boice, J.D. (1993). Mortality from second tumors among long-term survivors of retinoblastoma. *Journal of the National Cancer Institute* *85*, 1121–1128.
35. Yu, C.-L., Tucker, M. a, Abramson, D.H., Furukawa, K., Seddon, J.M., Stovall, M., Fraumeni, J.F., and Kleinerman, R. a (2009). Cause-specific mortality in long-term survivors of retinoblastoma. *Journal of the National Cancer Institute* *101*, 581–591.