

Il retinoblastoma

ALFONSO D'AMBROSIO¹, GIANNI CORIOLANI¹, MAURO CAINI¹, DANIELA GALIMBERTI¹, SARA GIOMI¹, SILVIA BADII¹, SILVIA MORETTI¹, MARIA STEFANIA TOTI¹, FRANCESCA COCCINA¹, FEDERICA CARRA¹, THEODORA HADJISTILIANOU²

¹Sezione di Oncoematologia Pediatrica, Dipartimento di Pediatria, Ostetricia e Medicina della Riproduzione;

²Sezione di Oftalmologia, Centro di Riferimento per il Retinoblastoma, Dipartimento di Chirurgia, Azienda Ospedaliero-Universitaria Senese, Policlinico "Santa Maria alle Scotte", Siena

Il pediatra neonatologo e quello di famiglia hanno un ruolo importante nella diagnosi precoce di questa rara condizione che rappresenta il modello per eccellenza di tumore ereditario. I progressi terapeutici compiuti sono stati straordinari e la conoscenza di questi progressi è doverosa, anche da un punto di vista solo culturale.

Il Retinoblastoma (Rb) è il tumore oculare infantile più frequente; rappresenta il 3% di tutti i tumori maligni in età pediatrica. L'incidenza della neoplasia è di 1 caso ogni 15-20.000 nati vivi/anno¹. Per l'Italia è stimata un'incidenza di 32 casi/anno². L'età media alla diagnosi varia tra 6 e 12 mesi nei casi bilaterali e tra 18 e 24 mesi nei casi unilaterali³. Meno del 2% dei casi si manifesta dopo i 5 anni (Rb tardivo).

Nel 70% dei casi la neoplasia è unilaterale mentre nel 30% è bilaterale; i casi unilaterali osservati nei primi 6 mesi di vita hanno un elevato rischio di bilateralizzarsi. Quando c'è un interessamento della ghiandola pineale, si parla di Rb trilaterale⁴⁻⁶.

Nel 40% dei casi la neoplasia è trasmessa ereditariamente: in questo caso l'interessamento è di solito bilaterale e l'esordio precoce, mentre nel 60% dei casi si presenta in forma sporadica con interessamento unilaterale ed esordio tardivo rispetto alle forme ereditarie.

SEGNI E SINTOMI

I segni e i sintomi dipendono dallo stadio della malattia al momento della diagnosi, dal tipo di crescita neoplastica, dalla grandezza e dalla localizzazione della neoplasia. I sintomi più frequenti sono la leucocoria (*Figura 1*) e lo strabismo che possono comparire sia da soli che associati. La leucocoria è

RETINOBLASTOMA

(Medico e Bambino 2013;32:227-236)

Key words

Retinoblastoma, Leucocoria, Genetics, Chemotherapy, Intra-arterial Melphalan

Summary

Retinoblastoma is the most frequently diagnosed intraocular malignancy in infants. Recently, there have been significant advances in the management of this disease. New therapeutic strategies, such as superselective intra-arterial chemotherapy and periocular/intravitreal chemotherapy, have been added to conservative treatments with a long consolidated efficacy. All these procedures are available at the Referral Centre for Retinoblastoma of the University Hospital of Siena. These advances have been reflected in increased rates of eye salvage and improved visual outcomes, notwithstanding the primary objective to safeguard the lives of affected children. This article summarizes the most important clinical and therapeutic aspects of this malignancy that every paediatrician should be aware of, particularly when retinoblastoma is suspected in a young patient.

il riflesso bianco o fosforescente visibile nella pupilla dovuto alla crescita di una voluminosa massa neoplastica che si sviluppa nella zona papillo-maculare e/o che sporge nel vitreo. Lo strabismo è dovuto allo sviluppo del tumore in sede maculare con perdita della fissazione centrale e conseguente eso- o exo-tropia. In tutti i bambini di età inferiore ai 5 anni una leucocoria e/o uno strabismo insorti recentemente devono essere valutati da un oculista per escludere l'ipotesi di un Rb.

Altri segni e sintomi che devono far porre il sospetto di un Rb sono rappresentati soprattutto da segni infiammatori dovuti a necrosi spontanee massive all'interno della massa tumorale, che

possono determinare uveite, panoftalmite, esoftalmo o in tempi più lunghi ftisi del bulbo, edema palpebrale, chemosi o congiuntivite. Tali quadri infiammatori possono col tempo evolvere e complicarsi in glaucoma, megalocornea, buftalmo (letteralmente "occhio di bue", indica un aumento del diametro corneale), lussazione del cristallino o cataratta (*Figura 1*).

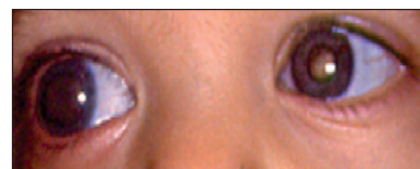


Figura 1. Leucocoria e buftalmo.

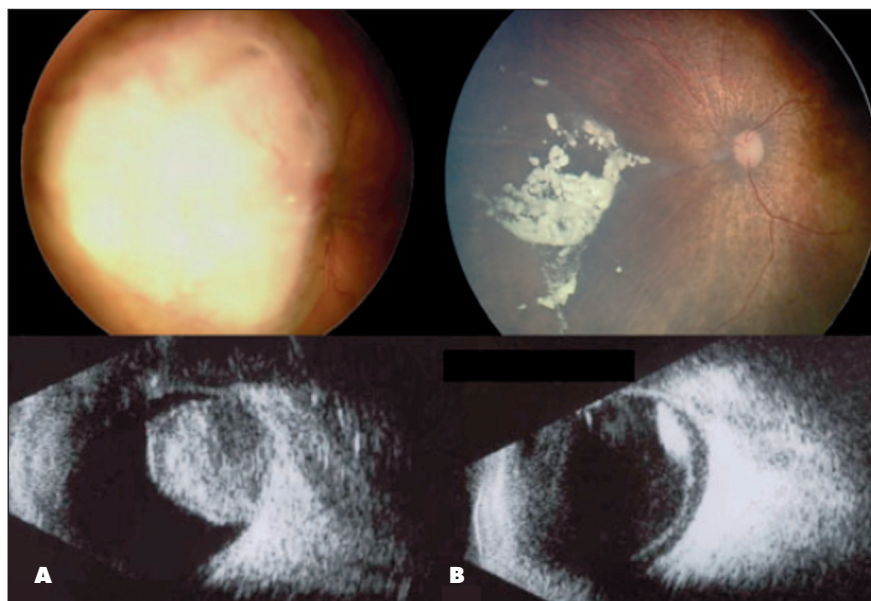


Figura 2. L'esame oftalmoscopico ed ecografico mostrano un retinoblastoma in stadio Vb di Reese (A). La bambina è stata sottoposta a un ciclo di trattamento endoarterioso (3 somministrazioni di Melphalan), a seguito del quale l'oftalmoscopia e gli ultrasuoni mostrano un pattern di regressione di tipo I (B). La paziente non è stata sottoposta a ulteriori trattamenti e il follow-up a 25 mesi non mostrava recidiva di malattia.

LA DIAGNOSI

L'iter diagnostico si articola in varie fasi.

- Il primo passo è rappresentato da un'attenta anamnesi personale e familiare, con particolare riguardo a eventuali casi di neoplasie (anche non oculari) in ascendenti e/o collaterali, disegnando l'albero genealogico.
- Segue un esame obiettivo generale e distrettuale. Un ruolo decisivo può avere il pediatra nel ricercare precocemente la leucocoria o lo strabismo e gli altri segni e sintomi che devono consigliare un'immediata valutazione del paziente da parte di un oculista⁷⁻¹⁰. La ricerca del riflesso rosso pupillare è fortemente consigliata ai neonatologi e ai pediatri di famiglia in occasione dei "bilanci di salute": la sua assenza indica una patologia oculare da far valutare con urgenza dallo specialista oftalmologo.
- Un'accurata valutazione oftalmologica infatti è indispensabile per un completo inquadramento della neoplasia retinica alla diagnosi^{11,12}: esame esterno del bulbo, esame al biomicroscopio, oftalmoscopia binocu-

lare indiretta con depressione sclerale di entrambi gli occhi, documentazione fotografica con RETcam (sistema digitale grandangolare che permette di visualizzare in tempo reale l'intero fondo oculare del bambino, diagnosticando e monitorando le patologie della retina, *in primis* il Rb; l'esame eseguito con tale strumento non è invasivo anche se da effettuare in sedazione generale), tonometria, ecografia A e B-scan (ecografie mono e bidimensionale che forniscono informazioni su istologia, forma e topografia della massa) (Figura 2).

- Anche il contributo della neuroradiologia nello studio delle caratteristiche morfologiche del Rb è importante. In particolare la RM con contrasto paramagnetico rappresenta la metodica d'elezione nella valutazione per la capacità di valutare massa e sede della neoplasia, comportamento del segnale con l'assenza/presenza di impregnazione, distacco retinico e tipo di essudato, segni di emorragia, infiltrazione coroidea, sclerale, del nervo ottico, ingrossamento e impregnazione della ghiandola pineale.

- L'indicazione alla esecuzione di mieoloaspirato, osteomioblastoma, puntura lombare, biopsia di linfonodi aumentati di volume, Rx scheletro, scintigrafia ossea con ⁹⁹Tc ecc., viene considerata caso per caso e solo a fronte di malattia localmente molto avanzata, in presenza di un sospetto clinico di retinoblastoma metastatico.
- Consulenza genetica e analisi del gene RB1.
- Nella definizione delle caratteristiche dell'eventuale campione biotico dopo enucleazione non può mancare il contributo dell'anatomopatologo.

LA DIAGNOSI DIFFERENZIALE

Le principali diagnosi differenziali da prendere in considerazione sono riportate nella Tabella I.

L'ISTOPATOLOGIA

Il Rb è un tumore che origina dal neuroepitelio retinico ed è caratterizzato dalla presenza di aggregati cellulari di forma sferica, le rosette, in cui le cellule neoplastiche si dispongono con un prolungamento cellulare rivolto verso l'interno. Le rosette possono essere distinte in:

- rosette di Homer-Wright** (caratteristiche del Rb, si possono osservare anche nel pinealoblastoma e nel medulloblastoma);
- rosette di Flexner-Wintersteiner** (caratterizzate da un prolungamento citoplasmatico che delimita uno spazio centrale otticamente vuoto)¹³.

Un altro elemento tipico del Rb è rappresentato dalle *fluerettes* che presentano l'appendice citoplasmatica rivolta all'esterno¹³.

LE MODALITÀ DI CRESCITA

La crescita del tumore può essere di tre tipi.

- **Endofitica:** il tumore cresce dalla superficie interna della retina verso il vitreo. All'esame oftalmoscopico

si apprezza la massa tumorale con vasi retinici dilatati in prossimità della massa (*feeder vessels*). La crescita tumorale può dare origine a dispersione di cellule neoplastiche nel vitreo definita come *seeding* vitreale, le cellule neoplastiche dal vitreo possono diffondere verso la camera anteriore provocando uno pseudoipopion.

- **Esofittica:** il tumore cresce dalla superficie esterna della retina e successivamente verso la coroide, sollevando e poi distaccando la retina. All'esame oftalmoscopico i vasi retinici sono ben visibili sulla superficie neoplastica che appare di colorito più rosato rispetto alla forma endofittica. La proliferazione neoplastica è indirizzata verso l'esterno interessando il liquido sottoretinico, l'epitelio pigmentato retinico e la coroide.
- **Mista:** il tumore presenta entrambe le caratteristiche di crescita e di diffusione.

LA CLASSIFICAZIONE E LA PROGNOSI

Le principali due classificazioni in uso per la stadiazione del tumore sono riportate nella *Tabella II*. I primi fattori prognostici considerati sono stati la lateralità, la progressione della malattia al nervo ottico e/o all'orbita e la malattia metastatica. In seguito è stata attribuita una prognosi migliore per i pazienti con neoplasia piccola e non prociidente e una prognosi cattiva per i pazienti con masse estese al vitreo o nella coroide. Questi dati sono stati utilizzati per la prima Classificazione del Retinoblastoma da Reese-Ellsworth¹⁴. È stata successivamente evidenziata da studi monocentrici l'importanza dell'infiltrazione a tutto spessore della sclera e del nervo ottico fino al margine di resezione.

Si possono quindi definire i seguenti **fattori prognostici sfavorevoli** (in *Tabella III* sono riportati i fattori istoprognostici sfavorevoli):

- dimensioni e spessore del/dei focali retinici;
- distacco retinico totale;
- *seeding* sottoretinico;
- *seeding* vitreale diffuso.

CONDIZIONI CHE POSSONO SIMULARE IL RETINOBLASTOMA

Condizioni ereditarie

Malattia di Norrie
Retinoschisi congenita
Incontinentia pigmenti
Vitreo-retinopatia essudativa

Anomalie di sviluppo

Persistenza di vitreo primario iperplastico
Coloboma
Displasia retinica
Fibre mieliniche
Sindrome di Morning-Glory
Piega retinica congenita

Malattie infiammatorie

Toxocara canis
Toxoplasmosi congenita
Retinite congenita da CMV
Endoftalmite

Tumori benigni e maligni

Amartoma astrocitico retinico
Medulloepitelioma
Emangioma della coroide
Emangioma capillare della retina
Amartoma retinico combinato

Miscellanea

Malattia di Coats
Retinopatia del prematuro
Distacco di retina regmatogeno

Tabella I

CLASSIFICAZIONI DEL RETINOBLASTOMA

Classificazione di Reese-Ellsworth

Stadio I

- Tumore unico di diametro < 4 dp, all'equatore o dietro
- Tumori multipli di diametro < 4 dp, all'equatore o dietro

Stadio II

- Tumore unico di diametro tra 4-10 dp, all'equatore o dietro
- Tumori multipli di diametro tra 4-10 dp, all'equatore o dietro

Stadio III

- Ogni tumore anteriore all'equatore
- Tumore unico di diametro > 10 dp, dietro all'equatore

Stadio IV

- Tumori multipli, alcuni di diametro > 10 dp
- Ogni tumore che si estende anteriormente all'ora serrata

Stadio V

- Tumori massivi che coinvolgono più della metà della retina
- Disseminazione nel vitreo

Classificazione A B C

Gruppi A-C: tumori a prognosi favorevole

Gruppo A: tumori piccoli < 3 mm e a distanza di < 2 dp dal disco o dalla fovea e con *seeding* vitreale assente
Gruppo B: focali senza *seeding* o solo con minimo *seeding* focale vitreale
Non DR < 5 mm da base della neoplasia
Gruppo C: fine diffuso *seeding* vitreale
DR maggiore del gruppo B o totale DR
Diametro tumorale > 15 mm

Gruppi D-E: tumori a prognosi sfavorevole

Gruppo D: massivo *seeding* vitreale o subretinico
DR maggiore del gruppo B o totale DR
Tumore che occupa oltre il 50% della superficie retinica
Gruppo E: nessuna possibilità di visus residuo oppure presenza di uno o più dei seguenti quadri clinici:
A. Tumore in camera anteriore
B. Glaucoma secondario con neo-vascolarizzazione
C. Emorragia intravitrea
D. Occhio fisso o pre-fisso
E. Ipoema o pseudoipopion con impronta sull'endotelio corneale
F. Pseudo-cellulite orbitaria
G. Tumore a livello della membrana jaloidea anteriore

1 diametro papillare (dp) = 1,5 mm
DR : Distacco Retinico

Tabella II

FATTORI ISTOLOGICI PROGNOSTICI SFAVOREVOLI DEL RETINOBLASTOMA

- a) Invasione del nervo ottico oltre la lamina cribrosa
- b) Interessamento diffuso, a tutto spessore, della coroide*
- c) Invasione delle arterie penetranti
- d) Invasione della sclera
- e) Interessamento della camera anteriore con infiltrazione dell'iride, dell'angolo irido-corneale o del trabecolato

*La scelta del Protocollo RB AIEOP 05 di ricomprendere tra i fattori isto-prognostici sfavorevoli l'interessamento della coroide, anche a tutto spessore, è stata più recentemente rivista dal Gruppo Interdisciplinare sul Rb alla luce delle segnalazioni della letteratura e dell'esperienza di altri Centri esteri, che non hanno segnalato il ricorrere significativo di malattia metastatica nei pazienti con tale evidenza istologica.

Tabella III

La prognosi è strettamente correlata allo stadio della neoplasia alla diagnosi. L'80% circa dei decessi è causato da metastasi che si evidenziano a 6-24 mesi dalla diagnosi^{15,16}.

IL SECONDO TUMORE

È ormai noto che pazienti con Rb, soprattutto in forma ereditaria, che sopravvivono alla prima neoplasia, hanno un elevato rischio di sviluppare una seconda neoplasia maligna (SNM)^{17,22}. Il rischio di osteosarcoma è stato stimato essere circa 500 volte superiore a quello della popolazione generale. A rischio sono, ovviamente, tutti i pazienti con mutazione germinale, cioè tutti i bilaterali e circa il 15% degli unilaterali (con malattia multifocale alla diagnosi). La SNM può svilupparsi in sede periorbitaria o a distanza.

Dal 1977 è stato segnalato nei pazienti bilaterali il pinealoblastoma o "trilateral retinoblastoma", cioè tumori neuroblastici della linea mediana in pazienti con gene mutato per il Rb^{23,24}. L'origine embrionale della ghiandola pineale dai fotorecettori della retina suggerisce che la trasformazione maligna di tale ghiandola rappresenti un'altra espressione del gene RB1.

È stato evidenziato ormai con certezza il ruolo svolto dalla radioterapia nel favorire lo sviluppo della SNM^{17,25}, ruolo non confermato del tutto per quel che riguarda la chemioterapia²⁰.

LE ALTERAZIONI GENETICHE

Il Rb rappresenta il modello per eccellenza di tumore ereditario nell'uomo. Esso può essere sporadico o familiare. La predisposizione a tale neoplasia maligna della retina è legata ad alleli mutanti ad alta penetranza (80-90%), mappati su un singolo locus (RB1) della banda q14 del cromosoma 13 (mutazioni puntiformi, delezioni o traslocazioni)²⁶. L'allele mutato può essere ereditato da un genitore (mutazioni costituzionali). In tal caso il Rb è in genere presente in un genitore. In alternativa, l'allele mutato può insorgere nelle cellule somatiche dell'epitelio retinico (caso sporadico o *de novo*). La delezione della banda 13q14, osservabile in circa il 5% dei casi di Rb, comporta anomalie sistemiche e oculari inquadrabili nella "13q Deletion syndrome".

Altre alterazioni genetiche che possono essere documentate nei pazienti affetti da Rb sono:

- tetrasomia 6p;
- monosomia 16 o delezione 16;
- monosomia 17 o delezione 17^{27,28};
- completa assenza dell'eterocromatina pericentromerica sul cromosoma 9²⁹;
- perdita del X o Y³⁰;
- alterazioni genetiche nel cromosoma 19;20;21;22³¹.

Da quanto esposto consegue che la presenza di anomalie sistemiche e oculari congenite dovrebbe sempre far sospettare la possibilità di associazione con il retinoblastoma e dunque richiedere una valutazione oculistica e gene-

tica. Le teorie sui diversi aspetti di ereditarietà del Rb sono riportate nel *Box 1*^{32,37}.

Caratteristica della malattia ereditaria è la bilateralità e/o la multifocalità. Si considerano ereditari tutti i Rb bilaterali. Inoltre il 10-15% dei pazienti con Rb unilaterale ha una malattia multifocale ed è a rischio per la trasmissione dell'allele mutato alla prole. Il rimanente numero di casi è a più basso rischio di trasmissione. Il gene RB1 gioca inoltre un ruolo anche nelle genesi di altre neoplasie (soprattutto osteosarcomi). Esiste pertanto un rischio elevato di sviluppo di secondo tumore nei pazienti con Rb ereditario lungo-sopravviventi. È compito primario dell'équipe di cura del Rb dare ai genitori di bambini affetti e ai soggetti in età fertile "guariti" un'adeguata informazione in merito alla possibilità del rischio di ricorrenza in altri figli. La probabilità di avere un altro figlio con Rb dipende da due fattori: se il figlio affetto ha il tumore in forma unilaterale o bilaterale e se c'è un altro membro della famiglia con Rb.

Il rischio genetico varia in rapporto alla situazione considerata e può essere così valutato^{23,38}:

- a. **Rischio di comparsa di altri casi di Rb nella famiglia di soggetti affetti:** i genitori "sani" di un bambino affetto hanno un rischio di avere un secondo figlio affetto pari all'1% in caso di forma monolaterale e del 6% in caso di bilaterale (il rischio scende al 2% se l'indagine genetica è negativa nel bambino affetto da Rb). Il rischio sale però al 45% se un altro membro all'interno della famiglia è affetto da Rb.
- b. **Rischio di sviluppare un Rb nella discendenza di un paziente sopravvissuto al Rb:** il rischio di trasmettere la malattia al figlio è del 45% nei casi bilaterali e/o familiari; nei casi sporadici (monolaterali con storia familiare negativa) il rischio scende all'8% (2-6% se il test genetico è negativo).

La probabilità di secondi tumori maligni non oculari, anche a distanza di decenni dalla diagnosi, è ben più elevata nei casi bilaterali di Rb e/o con altri familiari affetti dal tumore, rispetto

alla popolazione generale di sopravvissuti a una prima diagnosi di tumore (nel caso di Rb è pari a circa il 15%). Si tratta generalmente di sarcomi dell'osso o dei tessuti molli. Numerosi sono stati i sarcomi osteogenici nell'epoca di massimo ricorso alla RT orbitaria ad alte dosi dopo l'enucleazione; oggi la pratica è molto meno frequente, limitata essenzialmente all'evidenza di localizzazione metastatica orbitaria, sostituita dal ricorso a RT focale sul cono orbitario solo in caso di interessamento del nervo ottico oltre la trancia di sezione all'esame istologico. Si possono verificare anche altri tipi di patologie neoplastiche (leucemie, tumori cerebrali, melanomi ecc.).

LA TERAPIA

Il trattamento del Rb è complesso e le scelte terapeutiche sono influenzate da diversi fattori: lateralità del tumore (*Tabella IV*)³⁹, coinvolgimento della macula, dimensione del tumore, presenza di seeding vitreale o subretinico, rapporti della massa neoplastica con i tessuti circostanti (disco ottico, corioide, iride, sclera e orbita), età e stato di salute generale del paziente.

I bambini con **Rb unilaterale sporadico** hanno diverse opzioni terapeutiche: trattamenti focali (quali fotocoagulazione con Argon laser, crioterapia, termoterapia e termo-chemioterapia transpupillare, chemioterapia subconjuntivale e intravitreale, placche radioterapiche con ¹²⁵I o ¹⁰⁶Ru), chemioterapia (CHT) sistemica (endovenosa, ev), CHT endoarteriosa superselettiva (protocolli sperimentali, in Italia presso il Centro Retinoblastoma dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Senese), radioterapia esterna, enucleazione.

La maggior parte dei bambini con **Rb bilaterale** ricevono invece CHT ev sistemica in associazione a procedure locali per trattare entrambi gli occhi e prevenire lo sviluppo di tumori neuroblastici intracranici correlati (pinealoblastomi; trilaterale Rb). Si stima infatti che circa l'8-10% dei bambini con mutazioni germinali sviluppino il pinealoblastoma⁴⁰, anche se l'incidenza di questa neoplasia fatale è notevolmente di-

Box 1 - LE TEORIE SUI DIVERSI ASPETTI DI EREDITARIETÀ DEL RETINOBLASTOMA

Knudson³² nel 1971 ha elaborato la nota omonima teoria per spiegare i diversi aspetti dell'ereditarietà del Rb: due eventi mutazionali darebbero luogo alla neoplasia. Nei casi ereditari la prima mutazione è costitutiva (sono interessate le cellule germinali) e tale informazione è presente in tutte le cellule dell'organismo. Il secondo evento mutazionale, colpendo una qualsiasi cellula somatica, provoca la comparsa del tumore. I casi sporadici invece sono la conseguenza del verificarsi di due mutazioni somatiche. Lo sviluppo della malattia è legato a delezione o perdita funzionale di entrambi gli alleli omologhi del gene oncosoppressore, essendo sufficiente un solo allele normale per proteggere dalla malattia. I soggetti geneticamente predisposti al Rb sono eterozigoti per un allele mutante al locus RB: una successiva mutazione dell'allele normale in una cellula retinica determina l'insorgenza del tumore^{33,34}.

I pazienti con retinoblastoma sporadico invece sono omozigoti per l'allele normale: i due eventi mutazionali che portano al tumore si verificano entrambi nella cellula bersaglio.

Alcuni Autori hanno messo in discussione l'ipotesi di Knudson, postulando la necessità di più di un evento mutageno per spiegare l'insorgenza del tumore³⁴.

Il gene RB1 è stato clonato; è il prototipo di un gruppo di geni, chiamati "geni oncosoppressori" (*Tumor Suppressing Genes*, TSG) che normalmente inibiscono la crescita tumorale³⁵.

Il prodotto genico è una fosfoproteina nucleare di 928 aminoacidi, pRb/p105, espressa ubiquitariamente, che potrebbe essere coinvolta nel controllo della crescita cellulare³⁶. Molte evidenze indicano che la sola perdita della proteina pRb/p105 non è sufficiente per lo sviluppo della neoplasia maligna. Un possibile candidato che contribuisce allo sviluppo del retinoblastoma è il gene RB2/p130, costituito da 22 esoni e situato sul cromosoma 16q12.2. Il gene RB2 codifica per la proteina pRb/p130. La inattivazione della sua funzione biologica è stata descritta in neoplasie a carico di diversi organi e in particolar modo nel tumore del polmone, mammella, ovaio, e nei linfomi non Hodgkin. L'inattivazione delle funzioni biologiche di questa proteina dovuta a interazione con proteine virali è stata descritta nel mesotelioma e nei linfomi correlati a AIDS.

Recentemente è stato dimostrato che spesso l'espressione della proteina pRb/p130 si riduce fortemente nel Rb primario. Inoltre l'espressione della pRb/p130 sembra essere correlata con l'indice apoptotico dei campioni di Rb: neoplasie che non esprimono la proteina hanno un indice apoptotico più basso rispetto a tumori in cui l'espressione è maggiore o normale. Ciò suggerisce che la pRb/p130 esercita un effetto pro-apoptotico sui campioni di Rb in vivo. È stato visto che in campioni sia di Rb ereditario che sporadico la pRb/p130 è mutata a livello dell'esone 1. Come meccanismo alternativo è stato descritto l'ipermetilazione dell'isola CpG del gene RB2/p130³⁷.

Le tecniche di clonazione del gene hanno permesso lo sviluppo di un test genetico. Attualmente tale test include l'analisi di mutazioni puntiformi e l'analisi di delezioni. Nel nostro centro è prevista al momento della diagnosi una consulenza genetica con esame obiettivo e prelievo di sangue per l'analisi del gene RB1 al fine di rilevare la presenza di dismorfismi e di mutazioni e delezioni del gene.

minuita negli ultimi anni. Questo decremento potrebbe correlarsi anche al ridotto impiego della radioterapia esterna^{41,42}.

Terapia demolitiva

Fino agli anni '70 il paziente con neoplasia unilaterale veniva sempre enucleato; in quello con malattia bilaterale veniva enucleato l'occhio con stadio di malattia più avanzato. Tale scelta era motivata dall'inadeguatezza o dalla scarsa dimestichezza con i trattamenti focali, dall'inefficienza o dall'eccessiva tossicità dei regimi chemioterapici adottati.

Attualmente le indicazioni di approccio al Rb privilegiano la terapia conservativa e riservano la scelta dell'**enucleazione** nel caso di:

- bulbo con glaucoma secondario;
- bulbo in ftisi;
- Rb unilaterale con interessamento massivo della retina (> 50%) e distacco retinico totale, senza alcuna possibilità di residuo visivo;
- Rb unilaterale con seeding vitreale massivo;
- interessamento della camera anteriore;
- persistenza di malattia dopo ogni trattamento conservativo.

Il nervo ottico dovrà essere compreso nell'escissione per almeno 9-10 mm in modo da poterne verificare l'integrità istologica. Effettuata l'enucleazione, l'esame istopatologico potrà concorrere alla scelta terapeutica successiva (*Tabella IV*).

STRATEGIE DI TRATTAMENTO DEL RETINOBLASTOMA IN BASE ALLA LATERALITÀ E ALLO STADIO

Classificazione internazionale del retinoblastoma	Unilaterale	Bilaterale*
A	Laser o crioterapia	Laser o crioterapia
B	VC o placche	VC
C	VEC o placche	VEC
D	Enucleazione o VEC + SCC	VEC + SCC
E	Enucleazione	Enucleazione ma se entrambi gli occhi presentano uno stato di malattia avanzato allora VEC + SCC + EBRT a basso dosaggio

*Trattamento nei casi con Rb bilaterale eseguito sull'occhio che presenta uno stato di malattia più avanzato. Laser, fotocoagulazione con laser; EBRT, radioterapia esterna; placche, placche radioterapiche; SCC, carboplatino subcongiuntivale; VC, vincristina e carboplatino associati a termoterapia o crioterapia; VEC, vincristina, etoposide, carboplatino associati a termoterapia o crioterapia.

Tabella IV. Da voce bibliografica 39, modificato.

Terapia conservativa

Il trattamento conservativo del tumore retinico, che per esemplificazione qui si definisce "classico", anche se è recente la sua introduzione ed è ancora diffuso il suo impiego, ha perseguito lo scopo di evitare l'enucleazione attraverso la somministrazione di chemioterapia sistemica ev (a 2 o più farmaci antiblastici) e terapia focale, ovviamente quando possibile e in casi selezionati.

La **terapia focale** svolge un ruolo fondamentale nel trattamento conservativo del Rb. Nel tempo sono state sviluppate varie metodiche che hanno conseguito notevoli miglioramenti dal punto di vista prognostico.

Le singole possibili procedure vengono elencate di seguito.

A. Fotocoagulazione con argon laser. Si utilizza come trattamento di prima scelta, di consolidamento e per recidive per tumori non più spessi di 3 mm senza seeding, localizzati posteriormente all'equatore. *Complicazioni:* fibrosi retinica e trazioni, occlusioni vascolari retiniche.

B. Crioterapia. La criocoagulazione distrugge le cellule tumorali per un processo di cristallizzazione intracellulare e intravascolare con distruzione delle membrane cellulari. Verrebbe in questo modo risparmiata la membrana di Bruch e quindi ridotta la possibilità di diffusione

alla corioide. Tale tecnica è indicata per tumori anteriori (davanti all'equatore) non superiori a 3 mm^{12,13}. Si utilizza come trattamento primario, di consolidamento, per recidive e come *enhancement* in corso di chemioterapia sistemica o peribulbare. *Complicazioni:* atrofia corioretinica, rotture retiniche con distacco di retina secondario.

C. Termoterapia transpupillare e termochemioterapia. L'uso della termoterapia da sola (TTT) o in associazione alla CHT sistemica (TCT) rappresenta una possibilità relativamente nuova nel trattamento conservativo del Rb⁴³⁻⁴⁵. La TTT⁴⁵ eseguita con laser a diodi, induce un aumento della temperatura (fino a circa 45-60 °C), determinando una necrosi non coagulativa all'interno del tumore. Inoltre il calore, aumentando la perfusione sanguigna, agisce in maniera sinergica con la CHT con derivati del platino, incrementandone la citotossicità. Il numero delle applicazioni (effettuate sempre con la massima midriasi farmacologica) è strettamente correlato con la sede e le dimensioni dei focolai^{46,47}. Le indicazioni per la TTT sono tumori piccoli posteriormente all'equatore, per la TCT trattamento sinergico con chemioterapia sistemica per tumori non superiori a 12 mm e situati posteriormente al-

l'equatore. Possibili complicazioni: atrofia iridea, opacità focale del cristallino, fibrosi retinica e trazioni.

D. Brachiterapia con applicazione di dischi β/γ emittenti. Le placche sono un'alternativa preziosa alla radioterapia (RT) esterna poiché hanno il vantaggio di ridurre notevolmente l'area di irradiazione del bulbo e delle strutture vicine e di conseguenza gli effetti collaterali quali cheratite, cataratta, retinopatia, ipoplasia orbitaria, secondi tumori in sede d'irradiazione⁴⁸. Le placche oggi utilizzate impiegano ¹²⁵I (emissione raggi γ) e ¹⁰⁶Ru (emissione raggi β). Le attuali indicazioni sono: tumori di diametro inferiore a 15 mm e di spessore inferiore a 9 mm, non trattabili con le altre terapie focali; focolai residui dopo radioterapia esterna; recidive in seguito a terapia focale o RT esterna; focolai con modesto *seeding* vitreale epitumorale a localizzazione preferibilmente equatoriale; per focolai vicini al nervo ottico esistono placche conformate *ad hoc*. La dose consigliata è di 40 Gy all'apice del tumore. L'applicatore, suturato sulla sclera, viene rimosso dopo 1-4-7 giorni, quando sono stati distribuiti circa 3000-4000 rads.

E. Chemioterapia perioculare e intravitreale. La chemioterapia perioculare (sottocongiuntivale) e la chemioterapia intravitreale sono state in anni recenti sempre più oggetto di studi sperimentali atti a dimostrare la possibilità, con tale approccio, di incrementare la concentrazione oculare del chemioterapico riducendone l'esposizione a livello sistemico (nel trattamento del retinoblastoma intraoculare). Comunque, soltanto il carboplatino^{49,50} è stato largamente impiegato con tale modalità in bambini con Rb.

Recentemente Marr e coll.⁵⁰ hanno pubblicato i risultati di 12 anni di esperienza con tale trattamento: le indicazioni all'impiego erano presenza di *seeding* vitreale presumibilmente vitale (85%), recidive retiniche (6%), *seeding* subretinico avanzato (9%); laddove impiegato come parte di un trattamento

Box 2 - CHEMIOTERAPIA (MELPHALAN) INTRA-ARTERIOSA SUPERSELETTIVA NEL RETINOBLASTOMA AVANZATO

La chemioterapia sistemica per il Rb è stata introdotta da più di 40 anni, ma è stato negli ultimi 15-20 che si è posta maggiore attenzione agli effetti collaterali sistemici, ravvicinati e a distanza. Anche per tale motivo è cominciata la ricerca di nuove modalità di somministrazione degli antitumorali per incrementare la concentrazione locale laddove servono, cioè nella zona di vascolarizzazione dell'occhio.

Una nuova possibilità di trattamento locale è l'infusione di citostatici direttamente in arteria oftalmica, tramite la procedura di cateterismo arterioso "superselettivo".

I primi studi volti alla messa a punto di una tecnica per la somministrazione per via endoarteriosa di chemioterapici risalgono agli anni '50. Nel 1958 Reese descrisse per la prima volta la sua esperienza di trattamento del Rb attraverso l'infusione di un chemioterapico direttamente nell'arteria carotide, utilizzando la somministrazione intra-arteriosa di trietilene-melamina. Questi osservò una regressione delle lesioni retiniche attraverso l'impiego combinato di una dose inferiore di raggi X e l'infusione intra-arteriosa di trietilene-melamina⁶⁰. Kiribuchi nel 1966 dimostrò che risultati favorevoli potevano essere ottenuti attraverso l'infusione del 5-fluorouracile nell'arteria frontale o in quella sovraorbitaria di bambini con Rb⁶¹. Negli ultimi 15 anni Studiosi giapponesi hanno pubblicato la loro esperienza nel trattamento del Rb con l'utilizzo di una tecnica radiologica per l'infusione del Melphalan direttamente in carotide. La tecnica prevedeva l'uso di un catetere a palloncino che, inserito attraverso l'arteria femorale, veniva guidato fino alla carotide interna, appena al di là dell'ostio dell'arteria oftalmica. A questo punto il palloncino veniva gonfiato, per occludere la carotide interna e consentire la perfusione selettiva dei vasi dell'occhio, escludendo dalla perfusione il tessuto cerebrale. Suzuki e Kaneko hanno riportato una casistica di 563 procedure effettuate in 187 pazienti con risultati favorevoli^{62,63}.

Nonostante la bassa incidenza di complicanze, gli Autori hanno però osservato che le infusioni non erano realmente selettive perché il torrente vascolare intracranico riceveva alte concentrazioni di chemioterapico attraverso altri rami della carotide interna. Lo studio ha comunque dimostrato che il **Melphalan, agente alchilante** soprattutto impiegato con altre finalità in pazienti adulti da più di 50 anni, **è il farmaco più promettente per la CHT selettiva del Rb**. L'esperienza di impiego del Melphalan, in genere in associazione con altri farmaci o procedure, in pazienti pediatrici è limitata alla induzione di profonda aplasia midollare prima del TMO, autologo ed eterologo.

Partendo dall'esperienza giapponese, dal maggio 2006 presso il Memorial Sloan-Kettering Cancer Center e il New York Presbyterian Hospital a New York (USA), sui pazienti del dott. **Abramson** affetti da Rb è stata messa a punto una **tecnica di infusione del Melphalan in arteria oftalmica, definita "Super-selective Chemo-surgery"**^{64,66}.

L'esperienza di 3 anni di trattamento con terapia endoarteriosa ha consentito ad Abramson di concludere che **tale tecnica è gravata da una minima tossicità locale, minima tossicità sistemica e può essere ripetuta in assenza di rischi sostanziali sullo stesso paziente**.

I risultati estremamente incoraggianti (per numero di bulbi oculari risparmiati all'enucleazione) lo hanno indotto ad estendere il trattamento a pazienti con stadi meno avanzati di malattia, con la prospettiva di soppiantare in questi ultimi (stadi IV della classificazione di Reese-Ellsworth) la CHT sistemica o l'applicazione di placche radioemittenti per radioterapia.

Alla luce dei dati pubblicati in letteratura, nel giugno 2008 presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria Senese è stato avviato uno studio pilota di fase II in aperto (non controllato, non randomizzato) che prevede la somministrazione superselettiva di Melphalan in arteria oftalmica.

Il progetto di un nuovo approccio terapeutico al Rb si avvale della collaborazione tra le Unità Operative di Neuroradiologia interventistica, Neuroanestesia, Oftalmologia (Centro di riferimento nazionale del Rb), Pediatria, Genetica e Patologia Umana dell'A.O.U.S. Anche i dati derivanti dall'esperienza senese⁶⁷ confermano che:

- **La procedura è ragionevolmente sicura**, quando praticata da interventisti neuro-endovascolari esperti nella diagnostica angiografica e nel trattamento delle patologie vascolari intracraniche.
- **Il Melphalan** rilasciato super-selettivamente nell'arteria oftalmica **può risparmiare all'enucleazione molti bulbi oculari**, per lo più con minimi effetti collaterali in termini di tossicità locale e sistemica.
- **I migliori risultati** si sono ottenuti **negli occhi trattati per remissione parziale e/o recidiva dopo trattamenti conservativi "classici"**, piuttosto che negli occhi trattati alla diagnosi in stadio avanzato. Questi ultimi dovrebbero beneficiare dell'aggiunta di altri chemioterapici da somministrarsi insieme al Melphalan per via endoarteriosa, come riportato in letteratura⁶⁶.
- Concordiamo che **la CHT endoarteriosa superselettiva dovrebbe aggiungersi all'elenco delle terapie locali per il Rb avanzato e potrebbe risultare utile anche per stadi di malattia meno avanzati**.
- **Sarà tuttavia necessario un più lungo follow-up** per confermare le potenzialità di questa tecnica, stabilire le modalità con cui associarla agli altri trattamenti locali e sistemici e in caso possano insorgere successive complicazioni.
- Si sottolinea inoltre l'assoluta necessità di collaborare costantemente con oculisti esperti di oncologia oculare in grado di selezionare in maniera corretta l'eleggibilità dei pazienti ai trattamenti oggi disponibili.

multimodale, il 39% degli occhi veniva risparmiati all'enucleazione (quasi tutti stadio D secondo classificazione internazionale). Non sono stati riscontrati effetti avversi sistemici sia a breve che a lungo termine e la maggior parte delle complicanze oculari erano di tipo acuto non ritardato. La letteratura attribuisce invece a Kaneko e Suzuki^{51,52} il ruolo di pionieri nella CHT intravitreale, per la pubblicazione della più vasta serie di tali trattamenti, con il più lungo follow-up di oltre 7 anni. Recentemente

Munier e coll.⁵³ hanno descritto una tecnica modificata per l'iniezione intravitreale di citostatici con molteplici accorgimenti di sicurezza per limitare la possibilità di diffusione extraoculare di cellule tumorali lungo la traiettoria dell'iniezione. I risultati, seppur solo a 13,5 mesi di follow-up, confermano la sicurezza di tale strategia che trova indicazione, quale alternativa all'enucleazione o alla radioterapia esterna, per il trattamento del seeding vitreale diffuso.

Chemioterapia sistemica

La CHT ha assunto negli ultimi anni un ruolo sempre più rilevante grazie anche alla dimostrata efficacia di vecchi e nuovi antitumorali; essa concorre alla possibilità di conservare l'occhio e la visione.

Il fine della CHT è:

- **ottenere un debulking del tumore** (chemioriduzione), aumentando le possibilità di successivo o contemporaneo trattamento focale;
- **ridurre l'estensione della cicatrice**

retinica, secondaria ai trattamenti focali;

- evitare l'enucleazione.

I principali farmaci efficaci nel trattamento del Rb intraoculare sono: carboplatino, etoposide, vincristina, ciclofosfamide, ifosfamide, antraciclinici, topotecan. In particolare, vari *trials* hanno dimostrato che l'associazione etoposide e carboplatino (eventualmente associati alla vincristina) è efficace nella riduzione dei focolai retinici, con tossicità accettabile⁵⁴⁻⁵⁹. Molti lavori riportati in letteratura hanno evidenziato che la CHT è molto efficace nel provocare un *debulking* tumorale molte volte "drammatico", si ritiene diffusamente però che da sola non "curi" il Rb; per tale motivo è in genere associata ad un trattamento focale. Discusso è anche quale ordine di attivazione delle procedure (CHT - terapia focale) migliori i risultati nel controllo della malattia retinica. Un "compromesso" accettabile può essere la successione ravvicinata tra CHT (2-3 cicli) e terapia focale.

Si possono quindi riassumere le indicazioni alla terapia chemio-antiblastica:

- chemioriduzione nelle forme intraoculari unilaterali o bilaterali;
- chemioterapia adiuvante per ridurre il rischio di metastasi loco-regionali o a distanza nei pazienti enucleati e con fattori istoprognostici sfavorevoli;
- megaterapia seguita da TMO autologo per Rb metastatico o trilateral.

I principali schemi terapeutici utilizzati e i farmaci che li compongono sono:

- I. Schema EC o VEC:** prevede la combinazione di carboplatino ed etoposide +/- vincristina.
- II. Schema IVAd:** i farmaci utilizzati sono ifosfamide (associato al mesna, come protettore dell'urotelio), vincristina, doxorubicina.
- III. Schema ICE:** prevede l'impiego di ifosfamide (associato al mesna), carboplatino ed etoposide.

Radioterapia esterna stereotassica

La radioterapia esterna (*local field*) viene limitata ai casi di malattia meta-

statica loco-regionale (orbita, cono orbitario) o agli insuccessi terapeutici dopo trattamento conservativo (*involved field*). Lo scopo della radioterapia esterna è assicurare una dose tumoricida, rispettando le dosi di tolleranza dei tessuti sani adiacenti. Le tecniche attuali di radioterapia consentono di ridurre in modo estremamente significativo la dose fuori bersaglio. Le dosi sono comprese tra 30 e 50 Gy.

STRATEGIE TERAPEUTICHE

Una volta posta la diagnosi di Rb, una possibile strategia terapeutica prevista è la seguente:

- 1. Forme intraoculari eleggibili** trattamento conservativo: si prevede un trattamento consistente in terapia focale associata o non a CHT.
- 2. Forme avanzate intraoculari**, senza evidente possibilità di mantenere un visus utile e gravate da un rischio inaccettabile di diffusione metastatica della neoplasia: si prevede l'enucleazione, associata o non a CHT e/o radioterapia, disposta in base ad eventuali fattori istoprognostici sfavorevoli.

Nel caso di Rb eleggibile per trattamento conservativo la terapia sarà decisa in base alle dimensioni della/e massa/e presenti.

Più recentemente alle terapie conservative "classiche" riportate sopra (CHT ev + terapia focale) si è aggiunto (nell'ambito di un protocollo sperimentale presso il Centro Rb dell'A.O.U.S.) il trattamento endoarterioso superselettivo, tramite cateterismo dell'arteria femorale (fino all'oftalmica), con infusione locale di melphalan e topotecan (*Box 2*)⁶⁰⁻⁶⁷. Ovviamente quest'ultimo può essere (in genere lo è) associato ai trattamenti focali.

IL FOLLOW-UP

Il follow-up del Rb trattato con modalità conservativa deve prevedere uno stretto e attento controllo oftalmoscopico. La caratteristica frequente dei nuovi focolai è quella di comparire in

MESSAGGI CHIAVE

❑ Il Retinoblastoma (Rb) rappresenta il 3% di tutti i tumori maligni in età pediatrica. L'incidenza della neoplasia è di 1 caso ogni 15-20.000 nati vivi/anno. Per l'Italia è stimata un'incidenza di 32 casi/anno.

❑ L'età media alla diagnosi varia tra 6 e 12 mesi nei casi bilaterali e tra 18 e 24 mesi nei casi unilaterali.

❑ Il pediatra può avere un ruolo decisivo per la diagnosi precoce, ricercando la leucocoria o lo strabismo e gli altri segni e sintomi. La ricerca del riflesso rosso pupillare è fortemente consigliata ai neonatologi e ai pediatri di famiglia in occasione dei "bilanci di salute".

❑ Il Rb rappresenta il modello per eccellenza di tumore ereditario nell'uomo. Esso può essere sporadico o familiare. La predisposizione a tale neoplasia maligna della retina è legata ad alleli mutanti ad alta penetranza, mappati su un singolo locus (RB1) della banda q14 del cromosoma 13.

❑ Caratteristica della malattia ereditaria è la bilateralità e/o la multifocalità. Si considerano ereditari tutti i Rb bilaterali. Il 10-15% dei pazienti con Rb unilaterale ha una malattia multifocale ed è a rischio per la trasmissione dell'allele mutato alla prole.

❑ Il gene RB1 gioca inoltre un ruolo anche nella genesi di altre neoplasie (soprattutto osteosarcomi). Esiste pertanto un rischio elevato di sviluppo di secondo tumore nei pazienti con Rb ereditario lungo-sopravvissuti.

❑ Nuove strategie terapeutiche quali la chemioterapia intra-arteriosa superselettiva e la chemioterapia perioculare/intravitreal, si affiancano oggi alle terapie conservative di consolidata efficacia.

❑ Tali progressi si traducono in incrementati tassi di salvaguardia dei bulbi oculari e migliori outcomes visivi, fermo restando l'obiettivo prioritario di salvaguardia della vita dei bambini affetti.

estrema periferia retinica a livello dei festoni dell'ora serrata. Una particolare attenzione va ovviamente posta ai pazienti con familiarità positiva, in quanto in tali pazienti la comparsa di focolai multipli è più frequente. Gli intervalli

di tali controlli dallo *stop-therapy* devono avere la seguente periodicità:

- ogni 1-2 mesi fino a 2 anni;
- ogni 3 mesi fino a 3 anni;
- ogni 6 mesi fino a 5 anni;
- ogni anno oltre i 5 anni.

La tempestività di diagnosi, di conseguenza le dimensioni ridotte dei nuovi eventuali focolai rilevati, permette un trattamento focale precoce su lesioni per ciò stesso piccole, quindi più facilmente definitivo, mediante criocoagulazione.

Anche i pazienti sottoposti a radioterapia devono essere periodicamente controllati (almeno una volta l'anno) allo scopo di monitorare l'eventuale insorgenza di possibile secondo tumore radio-indotto.

Conflitto di interesse: nessuno

Indirizzo per corrispondenza:

Alfonso D'Ambrosio
e-mail: dambrosio@unisi.it

Bibliografia

1. Shields CL, Shields JA. Diagnosis and management of retinoblastoma. *Cancer Control* 2004;11:317-27.
2. Magnani C. Stima del numero di casi incidenti di tumore maligno in età pediatrica in Italia, per regione. *Riv Ital Pediatr* 1992;18:203-7.
3. Lohmann R, Gallie B. Revisiting the Model prototype of inherited cancer. *American Journal of Medical Genetics, Part C. Semin Med Genet* 2004;129:23-8.
4. Jakocić FA, Tso MOM, Zimmerman LE, Danis P. Retinoblastoma and intracranial malignancy. *Cancer* 1977;39:2048-58.
5. Bader JL, Miller RW, Meadows AT, Zimmerman LE, Champion AA, Voute PA. Trilateral retinoblastoma. *Lancet* 1980;2:582-3.
6. Provenzale JM, Goururangan S, Klintworth G. Trilateral retinoblastoma: clinical and radiologic progression. *Am J Roentg* 2004;183:505-11.
7. Acquaviva A. La diagnosi precoce di retinoblastoma: il ruolo del pediatra. *Area Pediatrica* 2003;7:51-4.
8. American Academy of Ophthalmology. Eye examination in infants, children and young adults by pediatricians. *Ophthalmol* 2003;110:860-5.
9. Nelson LB. Dilemma for pediatrician in detecting retinoblastoma. *J of Pediatr Ophthalmol and Strabismus* 2004;41:142.
10. Shields CL, Gorry T, Shields JA. Outcome of eyes with unilateral sporadic retinoblastoma based on the initial external findings by the family and the pediatrician. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2004;41:143-9.
11. Newsham I, Hadjistilianou T, Cavenne WK. Retinoblastoma, in: "The metabolic and molecular bases of inherited disease". Chapter 11, 613 - 642, vol I, McGraw - Hill Editor, 1995.
12. Hadjistilianou T. Retinoblastoma e Rhabdomyosarcoma, in: *Oncologia Oculare. Monografie della Società Oftalmologica Italiana*. I.N.C Editore. Anno XI - N. 1. 115, 136. 1999.
13. Ramzi C, Vinay K, Tucker-Robbins C. *Pathologic Basis of disease*. Saunders Philadelphia, USA, 1999.
14. Acquaviva A, Capolongo A, Hadjistilianou T, Rondelli R, Pession A. Risk and influence factors for metastases as well as for second non-ocular tumors in retinoblastoma patients. *Tumors of the Eye*, pp. 145-7. *Proceeding of the International Symposium on Tumor of the Eye*. Essen FRG, Sept 21-23, 1989. Edited by Bornfeld N, Gragoudas ES, Hopping W, Lommatzsch PK, Wessing A, Zografos L. Amsterdam/New York: Kugler Publications, 1991.
15. Hadjistilianou T, Martone G, De Francesco S, Caporossi A. A RET-CAM imaging study of macular retinoblastoma pre- and post-treatment. *Ophthalmic Resear* 2004;36(S1):212.
16. Abramson DH, Ronner HJ, Ellsworth RM. Second tumor in non irradiated bilateral retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 1979;87:625-7.
17. Sant M, Capocaccia R, Badioni V and the EURO CARE Workinggroup. Survival for retinoblastoma in Europe. *Eur J Cancer* 2001;37:730-5.
18. Hungerford JL, Kingston J, Plowman N. Orbital recurrence of retinoblastoma. *Ophthalmic Paediatr Genet* 1987;8:63-8.
19. Lennox EL, Draper GJ, Sanders BM. Retinoblastoma: A study of natural history and prognosis of 268 cases. *Br Med J* 1975;3:731-4.
20. Abramson DH, Ellsworth RM, Zimmerman LE. Non ocular cancer in retinoblastoma survivors. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1976;81:545.
21. Abramson DH, Ronner HJ, Ellsworth RM. Second tumor in non irradiated bilateral retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 1979;87:625-7.
22. Abramson DH, Ellsworth RM, Kitchin FD. Osteogenic sarcoma of the humerus after cobalt plaque treatment for retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 1980;90:374-6.
23. Jakocić FA, Tso MOM, Zimmerman LE, Danis P. Retinoblastoma and intracranial malignancy. *Cancer* 1977;39:2048-58.
24. Draper GJ, Sanders BM, Kingston JE. Retinoblastoma and second primary tumors. *Br J Cancer* 1986;53:661-71.
25. Lueder GT, Judisch F, O'Gorman TW. Second non-ocular tumors in survivors of heritable retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1986;104:372-3.
26. Lohmann DR. RB1 gene mutations in retinoblastoma. *Hum Mutat* 1999;14:283-8.
27. 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;66:46-53.
28. Oliveros O, Yunis E. Chromosome evolution in retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;82:155-60.
29. Sivakumaran TA, Ghose S, Kumar H, Singha U, Kucheria K. Absence of pericentromeric heterochromatin (9qh-) in a patient with bilateral retinoblastoma. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* 1997;46:193-8.
30. Pogozianz HE, Kuznetsova LE. Nonrandom chromosomal changes in retinoblastomas. *Arch Geschwulstforsch* 1986;56:135-43.
31. Huang Q, Choy KW, Cheung KF, Lam DS, Fu WL, Pang CP. Genetic alterations on chromosome 19, 20, 21, 22, and X detected by loss of heterozygosity analysis in retinoblastoma. *Mol Vis* 2003;9:502-7.
32. Knudson AG. Mutations and Cancer: statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68:820.
33. Di Ciommo D, Gallie BL, Bremner R. Retinoblastoma: the disease, gene and protein provide critical leads to understand cancer. *Seminars in Cancer Biology* 2000;10:255-69.
34. Mulligan G, Jacks T. The retinoblastoma gene family: cousins overlapping interests. *Trends Genet* 1998;14:223-9.
35. Friend S, Dryia T, Weinberg R. Oncongenes and tumor-suppressing genes. *N Engl J Med* 1988;318:618-22.
36. Abramson DH. The focal treatment of retinoblastoma with emphasis on xenon arc photocoagulation. *Acta Ophthalmol Suppl* 1989;194:3-63.
37. De Falco G, Giordano A. pRb2/p130: a new candidate for retinoblastoma tumor focation. *Oncogene* 2006;25:5333-40.
38. Nenadov-Beck M, 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.
39. Shields CL, Shields JA. Basic understanding of current classification and management of retinoblastoma. *Curr Opin Ophthalmol* 2006;17:228-34.
40. DePotter P, Shields CL, Shields JA. Clinical variations of trilateral retinoblastoma: a report of 13 cases. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1994;31:26-31.
41. Shields CL, Meadows AT, Shields JA, et al. Chemoreduction for retinoblastoma may prevent intracranial neuroblastic malignancy (trilateral retinoblastoma). *Arch Ophthalmol* 2001;119:1269-72.
42. Moll AC, Imhof SM, Schouten-Van Meeteren AY, et al. Chemoreduction for retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2003;121:1513.
43. Hamel P, Heon E, Gallie BL, Budning AS. Focal therapy in the management of retinoblastoma: when to start and when to stop. *J AAPOS* 2000;4:334-7.
44. Shields CL, Santos M, Diniz W, et al. Thermotherapy for retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1999;117:885-93.
45. Abramson DH, Scheffer AC. Transpupillary thermotherapy as initial treatment for small intraocular retinoblastoma: technique and predictor of success. *Ophthalmology* 2004;111:984-91.

46. Schuler AO, Jurkles C, Heimann H, Wieland R, Hawers W, Bornfeld N. Thermochemotherapy in hereditary retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* 2003;87:90-5.
47. Hadjistilianou T, Martone G, De Francesco S, Mazzotta C. TTT e TCT nel retinoblastoma. *Atti Congresso annuale SILO*, 2004.
48. Abramson DH, Ellsworth RM, Rozakis GW. Cryotherapy for retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1982;100:1253-6.
49. Abramson DH, Frank CM, Dunkel IJ. A phase I/II study of subconjunctival carboplatin for intraocular retinoblastoma. *Ophthalmology* 1999;106:1947-50.
50. Marr BP, Dunkel IJ, Linker A, Abramson DH. Periocular carboplatin for retinoblastoma: long-term report (12 years) on efficacy and toxicity. *Br J Ophthalmol* 2012;96:881-3.
51. Kaneko A, Suzuki S. Eye-preservation treatment of retinoblastoma with vitreous seeding. *Jpn J Clin Oncol* 2003;33:601e7.
52. Suzuki S, Kaneko A. Management of intraocular retinoblastoma and ocular prognosis. *Int J Clin Oncol* 2004;9:1e6.
53. Munier FL, Soliman S, Moulin AP, Gaillard MC, Balmer A, Beck-Popovic M. Profiling safety of intravitreal injections for retinoblastoma using an anti-reflux procedure and sterilisation of the needle track. *Br J Ophthalmol* 2012;96:1084-7.
54. Shields JA, Shields CL, De Potter. Cryotherapy for retinoblastoma. *Int Ophthalmol Clin* 1993;33:101-5.
55. Merchant TE, Gould CJ, Wilson MW, Hilton NE, Rodriguez-Galindo C, Haik BG. Episcleral plaque brachytherapy for retinoblastoma. *Ped Blood Cancer* 2004;43: 134-9.
56. Shields CL, de Potter P, Himmelstein BP, Shields JA, Meadows AT, Maris MJ. Chemoreduction in the initial management of intraocular retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1996; 114:1330-8.
57. 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;87:80-3.
58. Shields CL, Mashayekhi A, Cater J, Shelli A, Meadows AT, Shields JA. Chemoreduction for retinoblastoma. Analysis of tumor control and risks for recurrence in 457 tumors. *Am J Ophthalmol* 2004;138:329-37.
59. Greenwald MJ, Strauss LC. Treatment of intraocular retinoblastoma with carboplatin and etoposide chemotherapy. *Ophthalmology* 1996;3:1989-97.
60. Reese AB, Hyman G, Tapley N, Forrest AW. The treatment of Retinoblastoma by X-ray and triethylene melamine. *AMA Arch Ophthalmol* 1958;60:897-906.
61. Kiribuchi M. Retrograde infusion of anticancer drugs to ophthalmic artery for intraocular malignant tumors. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1966;70:1829-33.
62. Kaneko A, Suzuki S. Eye. Preservation treatment of retinoblastoma with vitreous seeding. *Jpn J Clin Oncol* 2003;33:601-7.
63. Suzuki S, Kaneko A. Management of intraocular retinoblastoma and ocular prognosis. *Int J Clin Oncol* 2004;9:1-6.
64. Abramson DH, Dunkel IJ, Brodie SE, et al. A phase I/II study of direct intraarterial (ophthalmic artery) chemotherapy with melphalan for intraocular retinoblastoma: initial results. *Ophthalmology* 2008;115:1398-404.
65. Abramson DH, Dunkel IJ, Brodie SE, et al. Superselective Ophthalmic Artery Chemotherapy as Primary Treatment for Retinoblastoma (Chemosurgery). *Ophthalmology* 2010; 117:1623-9.
66. Gobin YP, Dunkel IJ, Marr BP, Brodie SE, Abramson DH. Intra-arterial chemotherapy for the management of retinoblastoma: four-year experience. *Arch Ophthalmol* 2011;129: 732-7.
67. Venturi C, Bracco S, Cerase A, et al. Superselective ophthalmic artery infusion of melphalan for intraocular retinoblastoma: preliminary results from 140 treatments. *Acta Ophthalmol* 2012 [Epub ahead of print].