

**Estudi citogenètic i molecular  
de pacients afectes de  
retinoblastoma esporàdic i  
familiar**

**Tesi doctoral**

**Emma Triviño Palomares**

**Juny de 2001**

# **Estudi citogenètic i molecular de pacients afectes de retinoblastoma esporàdic i familiar**

Memòria presentada per n'Emma Triviño i Palomares per a obtenir el grau de Doctora en Biologia per la Universitat Autònoma de Barcelona

Emma Triviño i Palomares

Juny de 2001

La Dra. M. Dolors Coll i Sandiumenge, Professora Titular d'Universitat, del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, i la Dra. Míriam Guitart i Feliubaladó, Cap de Secció de Genètica i Immunologia de la Corporació Parc Taulí,

CERTIFIQUEN:

Que n'Emma Triviño i Palomares ha realitzat sota la seva direcció, a la Unitat de Biologia Cel·lular de la Universitat Autònoma de Barcelona, el treball de Tesi Doctoral titulat:

**ESTUDI CITOGENÈTIC I MOLECULAR DE PACIENTS AFECTES DE RETINOBLASTOMA ESPORÀDIC I FAMILIAR**

I perquè consti, signen el present certificat

Bellaterra, juny de 2001

Dra. M. Dolors Coll i Sandiumenge

Dra. Míriam Guitart i Feliubaladó

**Al meu pare, a la meva mare, i al Carles,  
perquè el que tinc, i el que sóc, és vostre...**

## AGRAÏMENTS

Ha passat ja molt de temps des que vaig creuar per primera vegada la porta de la Unitat de Biologia Cel·lular, carregada de por, de dubtes i de ganes, i al darrere hi vaig trobar un petit mon, i no exagero si us dic que el meu petit mon va canviar, amb vosaltres

El Josep em va permetre l'entrada, i sempre m'ha donat la benvinguda després de les meves absències

La Maria Dolors em va acollir amb un somriure, un projecte, una pila d'articles, i dues grans virtuts: la de veure'm venir i deixar-me fer, i l'optimisme incombustible. La Míriam hi va afegir la seva ment oberta i tolerant, i uns quants pacients, i totes tres ens vam dir: endavant!

Seguint pel passadís vaig trobar-me el Leo, que va respectar el meu primer silenci i sempre més ha tingut una estona per mí. I sortint tímidament del seu despatx vaig sentir en el clatell una mirada penetrant i encuriosida, "si necessites qualsevol cosa, demana-li al Mark" em va dir algú, i el Mark em va escoltar, i em va explicar, i hem compartit silencis, xerrades, i moltes més mirades de comprensió

I quí m'havia de dir que aquell tal Litus, que apareixia de tant en tant, i reia de mí descaradament, acabaria esperant-me, pacientment, mimant-me, infinitament, tolerant el meu desordre, estimant-me i ensenyant-me...recordes allò de *la veritable essència...?*, doncs, ja ho he entès!!!

I amb ells hi era sovint l'Elena, que no ha deixat de sorprendre'm mai amb la seva barreja, tan impossible com real, d'ingenuïtat tendra, i domini de la situació. I la Paqui, que em va ensenyar a ballar "moderno" d'amagat, i casi ens vam morir de riure, que va estar amb mí al Karma, amb Lenny Kravitz, que ha compartit confidències, i ens ha contagiats d'entusiasme. I el Paquito, amb veu de tro que m'espantava, ment brillant que m'il·lumina, i cor enorme, que em commou. I l'Anna Borrell, maternal i guerrera, i com no, la Pilar, amb qui vaig veure per primera vegada el DNA (!!!), i és qui ha estat al meu costat, al principi, al final, i d'aquí en endavant...

En el meu inici en la recerca, la Carme Casadevall, em va permetre seguir-la com un pollet pel laboratori de citogenètica del IBF, i em va donar una injecció d'ànim quan més la necessitava. El Josep, la Fanny i la Carme han estat per mí

els professors titulars de l'aguda ironia, el saber fer i l'eficiència, i el Marc, la Maica i la Sílvia han acompanyat sempre l'eficàcia amb un somriure

En els últims anys he tingut la sort de conviure amb un grupet fantàstic de nous matxaques, he compartit pessimisme amb el Joan, l'esquerp més encantador, i consultes i confidències amb la Cris, que m'ha deixat fer-li de "mami", i ha confiat en mí, he sentit des del primer dia la curiositat de conèixer al Pep, l'aire fresc de l'Aurora i el neguit i la tendresa del Tomás

Durant el temps que ha durat aquest projecte he conegut a molts nens i nenes que han patit una malaltia greu, i ells i les seves famílies m'han donat una lliçó impagable de valentia, i he disfrutat de l'experiència del Juanjo Gil-Gibernau, un oftalmòleg genial, que va confiar en mí, i en la genètica

I pel camí, tot "buscant-me la vida" en el mon laboral, vaig tenir la fortuna d'aprendre citogenètica i molt més amb l'Esther, el Vicenç, la Manoli, la Sandra, la Montse, el Joan i l'Agustí, companys de Prenatal Genetics, i de trobar a CERBA a la Juani, la Mónica la Sílvia, el Jordi la Cris, la Desi i la Lídia, i a la Pili, que han patit el meu mal humor i m'han tornat a canvi un somriure. He conegut la Roser, que té efecte balsàmic sobre la meva ànima, que m'omple l'esperit de calma, i la panxa de conguitos, i l'Àngels, que m'ha ensenyat que tot és possible, i no s'ha de perdre mai l'ànim (endavant les atxes)

Les meves estimades Eli, Mireia i Cristina han estat al meu voltant, al meu darrere i al meu davant. Sense vosaltres tot hauria estat diferent, i m'agrada exactament així, com és

Abans, durant i després, he sentit el recolzament fidel dels meus pares, els que sempre hi són, el meu orgull més gran, i la preciosa companyia de la meva germana Esther, (te siento siempre a mi lado, por más lejos que te vayas), la valentia del Richard, l'esforç de la Sílvia, el regal de l'alegria de l'Àlex, i l'energia positiva que m'arriba sempre de Llaurí. En els últims anys he trobat la Luisa, i el José, el José Luís la Vicky i el Ricard, la Mariona, l'Arnau i l'Óscar, i amb ells em sento a casa

**A tots, que sou part de mí, de tot cor: GRÀCIES!!!!!!!!!!**

Emma

# ÍNDEX

<b>ABREVIATURES</b> .....	<b>V</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	
<b>1.1 DESCRIPCIÓ DE LA MALALTIA</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 FORMES DE PRESENTACIÓ .....	1
<b>1.2 HERÈNCIA</b> .....	<b>1</b>
<b>1.3 DIAGNÒSTIC CLÍNIC I TRACTAMENT</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4 LA CITOGENÈTICA EN L'ESTUDI DEL RETINOBLASTOMA</b> .....	<b>6</b>
<b>1.5 CARACTERÍSTIQUES DEL GEN RB1</b> .....	<b>8</b>
<b>1.6 MUTACIONS DEL GEN RB1</b> .....	<b>9</b>
<b>1.7 LA PROTEÏNA pRB</b> .....	<b>10</b>
<b>1.8 EL RB EN RELACIÓ AMB ALTRES FORMES DE CÀNCER HUMÀ</b> .....	<b>12</b>
<b>1.9 LA GENÈTICA MOLECULAR EN L'ESTUDI DEL RB</b> .....	<b>13</b>
1.9.1 ANÀLISI INDIRECTA.....	13
1.9.2 ANÀLISI DIRECTA .....	15
<b>1.10 PERSPECTIVES GENÈTIQUES DE FUTUR</b> .....	<b>17</b>
<b>1.11 OBJECTIUS</b> .....	<b>19</b>
<b>2. MATERIAL I MÈTODES</b>	
<b>2.1 MATERIAL BIOLÒGIC</b> .....	<b>21</b>
2.1.1 PACIENTS .....	21
2.1.2 MOSTRES DE SANG PERIFÈRICA.....	21
2.1.3 MOSTRES DE TEIXIT TUMORAL.....	21
2.1.4 MOSTRA DE VELLOSITATS CORIALS .....	21
<b>2.2 MATERIAL DE LABORATORI</b> .....	<b>34</b>
2.2.1 PRODUCTES UTILITZATS EN EL CULTIU DE LIMFÒCITS I VELLOSITATS CORIALS .....	34
2.2.2 PRODUCTES UTILITZATS EN L'EXTRACCIÓ DELS CULTIUS .....	35
2.2.3 PRODUCTES UTILITZATS PER L'OBTENCIÓ DE BANDES .....	35
2.2.4 PRODUCTES UTILITZATS PER LA TÈCNICA DE D'HIBRIDACIÓ <i>IN SITU FLUORESCENT</i> (FISH).....	35
2.2.5 PRODUCTES UTILITZATS EN L'EXTRACCIÓ DE DNA DE SP I DE TUMOR.....	35
2.2.6 PRODUCTES UTILITZATS EN L'ANÀLISI DE LLIGAMENT .....	36
2.2.7 PRODUCTES I SOLUCIONS UTILITZATS EN LA DETECCIÓ DE MUTACIONS .....	36
2.2.8 MATERIAL DE LABORATORI .....	37
2.2.9 APARELLS .....	37
<b>2.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>39</b>
2.3.1 CULTIU DE LIMFÒCITS DE SANG PERIFÈRICA .....	39
2.3.2 CULTIU DE VELLOSITATS CORIALS .....	39
2.3.3 TÈCNiques DE TINCIÓ I IDENTIFICACIÓ CROMOSÒMICA .....	40
2.3.3.1 <i>Bandes G</i> .....	40
2.3.3.2 <i>FISH</i> .....	40

2.3.3.3	<i>Observació i valoració</i> .....	41
2.3.4	EXTRACCIÓ DE DNA DE MOSTRES DE SANG PERIFÈRICA .....	42
2.3.5	EXTRACCIÓ DE DNA DE MOSTRES DE TEIXIT TUMORAL .....	43
2.3.6	ANÀLISI DE LLIGAMENT .....	43
2.3.6.1	<i>Polimorfismes de restricció</i> .....	44
2.3.6.2	<i>Polimorfismes de longitud</i> .....	44
2.3.6.3	<i>Condicions d'amplificació</i> .....	45
2.3.6.4	<i>Condicions de detecció dels diferents polimorfismes</i> .....	46
2.3.7	ANÀLISI DE MUTACIONS PER DIGESTIÓ AMB ENZIMS DE RESTRICCIÓ .....	47
2.3.7.1	<i>Detecció de mutacions a l'exó 8</i> .....	47
2.3.7.2	<i>Detecció de mutacions a l'exó 18</i> .....	48
2.3.8	CRIBATGE DE MUTACIONS PER SSCP I POSTERIOR SEQÜENCIACIÓ .....	50
2.3.8.1	<i>Condicions d'amplificació</i> .....	50
2.3.8.2	<i>Condicions de detecció i digestió</i> .....	53
2.3.8.3	<i>Preparació dels gels per l'anàlisi de SSCP</i> .....	54
2.3.8.4	<i>Condicions electroforètiques</i> .....	55
2.3.8.5	<i>Detecció per tinció amb nitrat de plata</i> .....	56
2.3.8.6	<i>Detecció del marcatge radioactiu</i> .....	56
2.3.8.7	<i>Valoració dels patrons de bandes</i> .....	57
2.3.8.8	<i>Seqüenciació</i> .....	57
<b>3.</b>	<b>RESULTATS</b>	
<b>3.1.</b>	<b>ESTUDI CITOGENÈTIC</b> .....	<b>59</b>
3.1.1	CARIOTIP DELS PACIENTS AFECTES .....	59
3.1.2	CARIOTIP DELS PARENTS SANS .....	59
3.1.3	INDIVIDUS AFECTES NO ESTUDIATS .....	60
<b>3.2.</b>	<b>ESTUDI PER FISH</b> .....	<b>63</b>
<b>3.3</b>	<b>ESTUDI MOLECULAR</b> .....	<b>65</b>
3.3.1	ANÀLISI DE LLIGAMENT.....	67
3.3.1.1	<i>Anàlisi de lligament utilitzant el marcador polimòrfic de restricció BamHI</i> .....	67
3.3.1.2	<i>Anàlisi de lligament utilitzant el marcador polimòrfic de restricció XbaI</i> .....	71
3.3.1.3	<i>Anàlisi de lligament utilitzant el marcador polimòrfic de restricció Tth 111 I</i> .....	75
3.3.1.4	<i>Anàlisi de lligament utilitzant el marcador polimòrfic de longitud Rb1.20</i> .....	79
3.3.1.5	<i>Anàlisi de lligament utilitzant el marcador polimòrfic de longitud VNTR16</i> .....	82
3.3.2.	ANÀLISI DE MUTACIONS PER DIGESTIÓ AMB ENZIMS DE RESTRICCIÓ I POSTERIOR SEQÜENCIACIÓ	85
3.3.2.1	<i>Detecció de mutacions a l'exó 8</i> .....	90
3.3.2.2	<i>Detecció de mutacions a l'exó 18</i> .....	90
3.3.2.3	<i>Seqüenciació</i> .....	91
3.3.3.	ANÀLISI DE MUTACIONS PER SSCP I POSTERIOR SEQÜENCIACIÓ.....	100
3.3.3.1	<i>Anàlisi de l'exó 2</i> .....	100
3.3.3.2	<i>Anàlisi dels exons 15 i 16</i> .....	107



3.3.3.3 Anàlisi de l'exó 19.....	113
3.3.3.4 Anàlisi de l'exó 20.....	113
3.3.3.5 Anàlisi de l'exó 23.....	119
<b>4. DISCUSSIÓ</b>	
<b>4.1 ESTUDI CITOGENÈTIC .....</b>	<b>121</b>
<b>4.2 ESTUDI PER FISH.....</b>	<b>122</b>
<b>4.3 ANÀLISI DE L·LIGAMENT.....</b>	<b>123</b>
4.3.1 CONSIDERACIONS TÈCNIQUES .....	124
4.3.2 ANÀLISI DE L·LIGAMENT DE LA FAMÍLIA G .....	125
4.3.3 ANÀLISI DE L·LIGAMENT DE LA FAMÍLIA Q .....	125
4.3.4 ANÀLISI DE L·LIGAMENT DE LA FAMÍLIA S.....	126
4.3.5 ANÀLISI DE L·LIGAMENT DE LA FAMÍLIA Z.....	126
4.3.6 ANÀLISI DE L·LIGAMENT DE LA FAMÍLIA AN .....	127
4.3.7 ANÀLISI DE L·LIGAMENT DE LA FAMÍLIA AV .....	127
4.3.8 ANÀLISI DE L·LIGAMENT DE LA FAMÍLIA AX .....	128
4.3.9 VALORACIÓ GLOBAL D'INFORMATIVITAT .....	128
<b>4.4 DETECCIÓ DE MUTACIONS PER DIGESTIÓ AMB ENZIMS DE RESTRICCIÓ I POSTERIOR SEQÜENCIACIÓ.....</b>	<b>134</b>
4.4.1 ESTUDI DE L'EXÓ 8.....	134
4.4.2 ESTUDI DE L'EXÓ 18.....	135
4.4.3 VALORACIÓ GLOBAL.....	135
<b>4.5 ANÀLISI DE MUTACIONS PER SSCP I SEQÜENCIACIÓ.....</b>	<b>136</b>
4.5.1 CONSIDERACIONS TÈCNIQUES .....	137
4.5.2 VALORACIÓ DE LES ALTERACIONS DETECTADES.....	138
4.5.2.1 Exó 2 .....	138
4.5.2.2 Exons 15 i 16 .....	139
4.5.2.3 Exó 20.....	129
4.5.2.4 Valoració global.....	120
<b>4.6 CONSELL GENÈTIC .....</b>	<b>142</b>
<b>4.7 PROTOCOL D'ESTUDI GENÈTIC .....</b>	<b>145</b>
<b>5. CONCLUSIONS .....</b>	<b>149</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>151</b>
<b>DE AHORA EN ADELANTE. ....</b>	<b>169</b>

## ABREVIATURES

BL: bilateral

DGGE: (*denaturant gradient gel electrophoresis*) electroforesi en gels amb gradient desnaturalitzant

ESD: Esterasa-D

FISH (*fluorescence in situ hybridization*) hibridació *in situ* fluorescent

LOH: (*loss of heterozygosity*) pèrdua d'heterozigositat

MF: multifocal

pb: parells de bases

PCR: (*polymerase chain reaction*) reacció en cadena de la polimerasa

RFLP: (*restriction fragment length polymorphism*) fragment de restricció de longitud polimòrfica

Rb: retinoblastoma

SP: sang perifèrica

SSCP: (*single strand conformation polymorphism*) polimorfisme de conformació de cadena simple

TA: temperatura ambient

UD: ull dret

UE: ull esquerre

UF: unifocal

UL: unilateral

# 1. INTRODUCCIÓ

---

## 1.1 DESCRIPCIÓ DE LA MALALTIA

El Retinoblastoma (Rb) és el tumor intraocular maligne més freqüent en l'edat pediàtrica, i afecta a 1/16.000 – 1/23.000 nascuts vius (McLean, 1996). Es desenvolupa en cèl·lules immadures de la retina i és considerat una neoplàsia embrionària.

### 1.1.1 Formes de presentació

Es manifesta, en estadi inicial, en forma de tumoració sòlida o translúcida blanquinosa, arrodonida, i lleugerament elevada, visible en una exploració de fons d'ull mitjançant oftalmoscòpia indirecta. Pot aparèixer en qualsevol zona de la retina, i pot afectar un o ambdós ulls, amb focus tumorals únics o múltiples. Tradicionalment s'ha considerat que els tumors únics unilaterals són la manifestació de la forma no hereditària de la malaltia, i els bilaterals o multifocals representen la forma hereditària, no obstant, els estudis genètics no sempre corroboren aquest fet.

Excepcionalment, el Rb pot patir una regressió espontània (Gallie *et al*, 1982), que es manifesta en forma de cicatrius a la retina, similars a les observades quan els tumors són tractats amb èxit, i es coneix com a Retinoma.

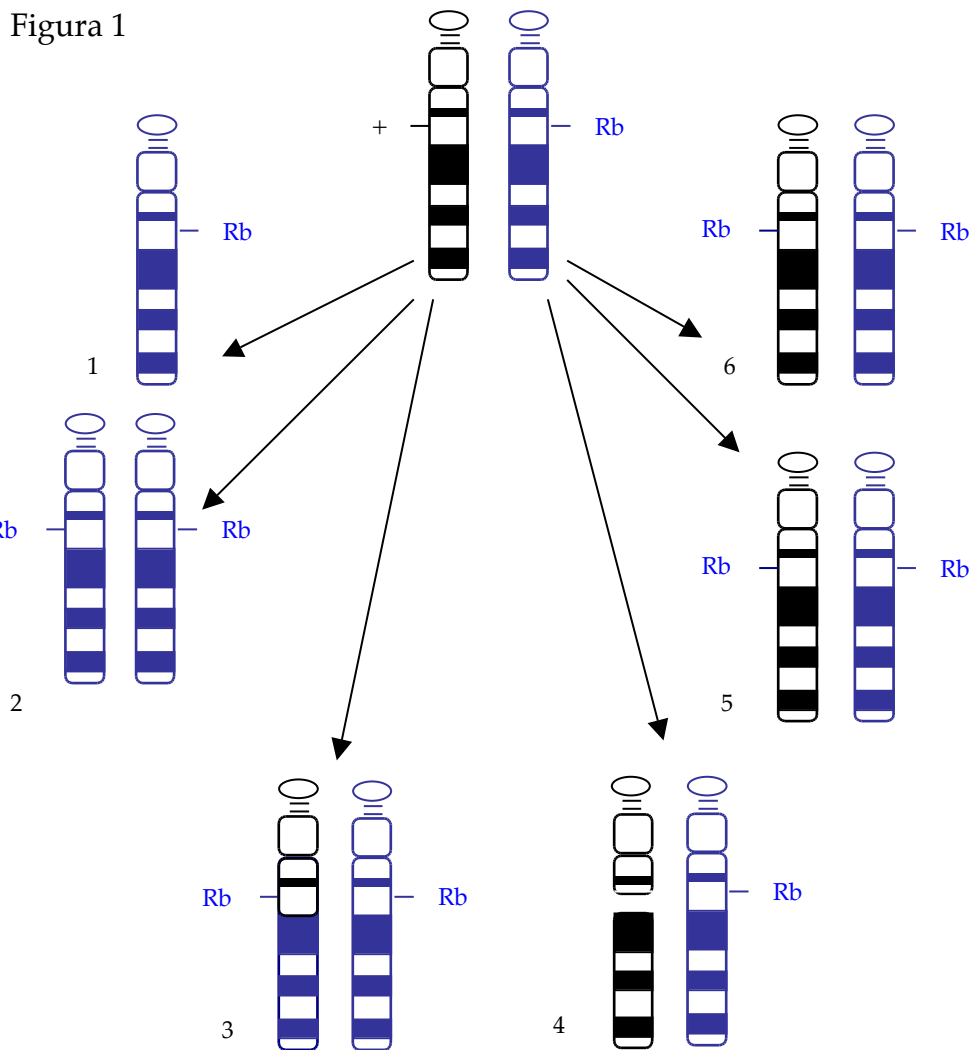
## 1.2 HERÈNCIA

La utilització de l'oftalmoscopi per a l'estudi del fons d'ull, i la introducció de la tècnica quirúrgica d'enucleació com a tractament dels pacients amb Rb, van incrementar espectacularment la taxa de supervivència d'aquests pacients, permetent que assolissin l'edat reproductiva.

Al 1958, Smith i Sorsby van concloure que els casos amb Rb bilateral (BL) eren amb més freqüència hereditaris, i al 1971, Knudson, basant-se en un estudi estadístic, va proposar la seva teoria de la doble mutació. Segons aquesta hipòtesi, són necessàries dues mutacions en una mateixa cèl·lula, que inactivarien ambdós al·lels d'un gen. En els casos hereditaris, la primera d'aquestes mutacions seria germinal, transmesa per un dels progenitors, o es donaria *de novo*, éssent, en qualsevol cas, constitucional, i la segona mutació, somàtica, afectaria a una o varies cèl·lules retinianes immadures. En els casos no

hereditaris les dues mutacions serien somàtiques, i es donarien en una mateixa cèl·lula precursora retiniana.

En la majoria dels casos, la pèrdua d'heterozigositat (LOH, *loss of heterozygosity*) es dona per recombinació mitòtica, no disjunció mitòtica, pèrdua cromosòmica i reduplicació, conversió gènica o per deleció (Cavenee *et al*, 1983, Godbout *et al*, 1983, Dryja *et al*, 1984) (Fig 1). La pèrdua del segon al·lel funcional també pot ser deguda a una mutació somàtica independent, en aproximadament un 30% dels tumors (Kato *et al*, 1993), o a hipermetilació en un petit percentatge dels casos (Greger *et al*, 1994, Ohtani-Fujita *et al*, 1997).



Mecanismes de mutació més freqüents: 1-Pèrdua cromosòmica per no disjunció, 2-pèrdua cromosòmica i reduplicació, 3-recombinació mitòtica, 4-deleció, 5-mutació somàtica individual, 6-conversió gènica.

Donat que són necessàries dues mutacions per l'expressió de la malaltia, podem parlar d'una herència recessiva. La segregació de la malaltia en un arbre genealògic es comporta, però, seguint una herència dominant, ja que la mutació inicial que s'hereda *predisposa* a una segona mutació, causant el Rb.

Aproximadament un 10-15% dels pacients presenten Rb familiar, amb membres afectes en al menys dues generacions. La resta es classifiquen com retinoblastomes esporàdics, que poden ser hereditaris, com a conseqüència d'una mutació en la línia germinal dels progenitors. Aquests casos esporàdics hereditaris, sumats als familiars, representen un 40% del total, i es manifesten preferentment de forma bilateral (BL) o multifocal (MF), amb una mitjana de focus tumorals entre 3 i 5 (Horsthemke, 1992). Val a dir, però, que aproximadament el 12% de retinoblastomes unilaterals (UL) unifocals (UF) poden ser també hereditaris (Vogel, 1979). L'edat mitjana de presentació dels casos hereditaris és de 12 mesos. Per últim, existeixen casos esporàdics no hereditaris, en els que ambdues mutacions esdevenen en cèl·lules de la retina, i que suposarien el 60% del total. Es manifesten preferentment de forma UL i UF, i amb aparició més tardana, amb una mitjana de 18 mesos.

Donat que la retina assoleix la maduresa completa a l'edat de 2-3 anys, el Rb no es desenvolupa en nens més grans, o en adults. Es descriuen però a la literatura una sèrie de casos, rars per l'avançada edat d'aparició (Mehra *and* Hamid, 1961, Makely, 1963, Shields *et al*, 1975), encara que només en un d'ells, diagnosticat a l'edat de 18 anys, s'utilitzaren mètodes clínics moderns per a la detecció de tumors intraoculars (Shields *et al*, 1975).

Excepcionalment s'han descrit arbres genealògics familiars que destaquen per la presència de membres no afectes que són portadors obligats, o be de membres amb manifestacions moderades de la malaltia, com poden ser tumors UL, o regressions espontànies, en famílies amb més d'una generació d'afectes (Sakai *et al*, 1991, Onadim *et al*, 1992b, Dryja *et al*, 1993, Otterson *et al*, 1997). Aquest fet posa de manifest que la penetrància del Rb és incompleta, tot i que elevada (90%).

### 1.3 DIAGNÒSTIC CLÍNIC I TRACTAMENT

El Rb en els estadis inicials de desenvolupament no presenta habitualment signes externs, i el diagnòstic precoç sol quedar restringit per tant als familiars de pacients afectes, que es sotmeten a revisions oftalmològiques freqüents.

Quan el Rb és *de novo*, el que sol cridar l'atenció de la família o del pediatra és la leucocòria, que és el símptoma més freqüent, donant-se en el 70% dels casos, o l'estrabisme, que afecta a un 20% dels pacients (Gil-Gibernau, 1997). Els tumors poden localitzar-se en qualsevol punt de la retina, i únicament tenen efecte sobre la visió si afecten les màcules d'ambdós ulls. Habitualment, quan es presenten aquestes primeres manifestacions clíniques, els tumors estan confinats a la retina i el cos vitri. El creixement invasiu cap al nervi òptic, l'escleròtica i l'òrbita, o la metàstasi, es donen només en estadis molt avançats. El pronòstic dels pacients amb metàstasi es advers, amb una mitjana de supervivència de 5 mesos després del diagnòstic (Horsthemke, 1992).

Com a mètodes de diagnòstic clínic, es recomana realitzar una anamnesi i un examen ocular extern, un estudi mitjançant oftalmoscòpia indirecta, així com una ecografia ocular i una tomografia axial computeritzada (TAC) (Gil-Gibernau, 1997).

Amb l'anamnesi i l'examen ocular extern s'obté una primera orientació diagnòstica, però és l'oftalmoscòpia indirecta la que proporciona més informació. Aquesta es realitza sota anestèsia general, i permet analitzar la totalitat de la retina, de forma que és possible visualitzar la localització, la mida i l'estadi evolutiu de la massa tumoral. Aquests paràmetres tenen gran valor a l'hora de decidir la pauta terapèutica, i avaluar l'efectivitat d'aquesta. L'ecografia permet, en combinació amb l'oftalmoscòpia, el control de la mida tumoral i com aquesta evoluciona amb el tractament, i d'altra banda permet la detecció de calcificacions que, en nens menors de dos o tres anys afectats de leucocòria, són indicatives de Rb. La TAC permet controlar el contorn de l'escleròtica, el cristal·lí, els músculs extraoculars, estructures del sistema nerviós central, i el nervi òptic, de forma que l'observació d'un engruiximent del nervi òptic és indicativa d'invasió tumoral. Existeixen altres mètodes de diagnòstic globalment menys informatius, però aplicables en casos concrets, com són la ressonància magnètica nuclear, l'examen angi fluoresceínic, l'estudi

enzimàtic i citològic de l'humor aquós, i la biòpsia-aspiració. En els casos avançats en que hi ha sospita d'invasió extraocular, aquesta pot valorar-se mitjançant punció lumbar, medul·lar, i gammagrafia òssia. Per últim, quan es decideix l'enucleació com a mètode terapèutic, l'estudi histopatològic és útil en la confirmació del diagnòstic, i en l'avaluació de la diferenciació tumoral i la possible invasió extraocular (Gil-Gibernau, 1997).

Pel que fa a la freqüència dels controls oftalmològics, tant del pacient, com dels seus germans sans, dependrà de l'existència o no d'antecedents familiars, de l'edat d'aparició del primer tumor diagnosticat, i del tipus d'afectació. Així, quan la història familiar és positiva, o la malaltia es diagnostica en un lactant, o quan es detecta més d'un tumor, tant el pacient com els seus germans, si és que estan en edat de risc, són sotmesos a control oftalmològic cada tres mesos, durant al menys un any. Aquests controls inclouen sempre una revisió oftalmoscòpica. Si el Rb es diagnostica en un nen de més de dos anys, sense antecedents familiars, i l'afectació és UL i UF és possible programar les revisions cada sis mesos. La freqüència dels controls pot augmentar segons la resposta dels tumors a la pauta terapèutica triada en cada cas. És necessari aplicar anestèsia general per les revisions oftalmoscòpiques fins a l'edat de 6 anys, i posteriorment el seguiment es realitza de forma ambulatoria, amb controls anuals.

En quant a l'elecció dels mètodes terapèutics, aquesta dependrà també de factors com són el tipus d'afectació, la mida i la localització dels tumors, l'edat d'aparició, l'existència o no d'antecedents familiars, i la sospita d'invasió extraocular. Els mètodes conservadors disponibles són: la fotocoagulació i la criocoagulació en tumors petits, la braquiteràpia amb plaques radioactives, principalment per tumors únics i de mida superior, i la radioteràpia externa en tumors grans o múltiples. Quan els mètodes conservadors no són efectius, o hi ha invasió massiva del globus, o del nervi òptic, es fa necessària l'enucleació. Per evitar en alguns casos greus enucleacions bilaterals, o quan es detecta metastasi, el mètode terapèutic triat és la quimioteràpia (Gil-Gibernau, 1997).



## 1.4 LA CITOGENÈTICA EN L'ESTUDI DEL RETINOBLASTOMA

La localització física del gen del Rb es va determinar a partir de l'estudi citogenètic d'alguns pacients que, a més de presentar trets dismòrfics i retard mental en grau variable, patien la neoplàsia ocular. Aquests pacients tenien en comú un cariotip anòmal, en el que un dels cromosomes del grup D apareixia delecionat. D'altra banda, aquesta delecio en un cromosoma del grup D va ser la primera anomalia detectada en l'estudi citogenètic d'un tumor sòlid (Stallard, 1962). Amb el desenvolupament de les tècniques de bandeig cromosòmic, aquest cromosoma del grup D va poder ser identificat com el 13, i la regió que sempre es perdia en els pacients portadors de delecions va resultar la banda 13q14 (Franke, 1976). La freqüència de reorganitzacions detectades es va incrementar en tres vegades amb l'ús de tècniques citogenètiques d'alta resolució, i es va inferir que aproximadament un 10% dels pacients amb Rb presenten alteracions citogenètiques que afecten la regió 13q14 (Turleau *et al*, 1985), éssent les més freqüents les delecions intersticials (80%-90%). S'han descrit també translocacions *de novo* aparentment equilibrades entre el cromosoma 13 i els cromosomes 1, 2, 5, 18, 20 i X, així com diferents alteracions d'origen parental, com insercions de diferents regions dels cromosomes 2, 3, 5, 12, 16 o 20 en el cromosoma 13, inversions paracèntriques, i translocacions recíproques (Salamanca-Gómez *et al*, 1984, Turleau *et al*, 1985, Blanquet *et al*, 1987, Triviño *et al*, 1997).

Malgrat que el fenomen de mosaïcisme pot tenir importants implicacions en el consell genètic en famílies amb malalties hereditàries, només existeix informació respecte a la incidència d'aquest mosaïcisme sobre unes poques malalties genètiques. L'estudi citogenètic de pacients amb Rb va permetre detectar la presència de delecions de 13q14 en mosaïcisme constitucional (Motegi, 1982, Motegui *and* Minoda, 1984, Munier *et al*, 1989). Estudis recents, utilitzant tècniques de biologia molecular per a la detecció de mutacions, han confirmat que el mosaïcisme en les famílies amb Rb no és un fenomen rar (Sippel *et al*, 1998). Aquest fet s'ha de tenir en consideració tant en la classificació dels pacients amb Rb, com en el seu seguiment clínic i en el consell genètic.

L'anàlisi citogenètica dels tumors, va permetre determinar que, després de les delecions del cromosoma 13, les alteracions més freqüents són l'isocromosoma 6p, la trisomia parcial o total de 1q, la monosomia 16, i els add(1p) (Potluri *et al*, 1986, Cowell *and* Hogg, 1992, Oliveros *and* Yunis, 1995). A més a més, s'ha descrit en alguns tumors la presència de regions tenyides homogèniament i de *double-minutes*, relacionats amb l'amplificació dels oncogens MYCN i ANTI (Lee *et al*, 1984, Sakai *et al*, 1985, Arheden *et al*, 1988, Seshadri *et al*, 1988, Godbout *and* Squire, 1993). La comparació dels canvis estructurals detectats en tumors, amb aquells trobats en sang perifèrica (SP) va donar la primera prova de suport a la hipòtesi de Knudson.

Recentment, alguns autors han intentat correlacionar els resultats obtinguts de l'estudi citogenètic de les mostres tumorals, amb l'examen histopatològic, per tal de treure conclusions sobre la progressió tumoral i el pronòstic. S'ha descrit al respecte la utilitat d'algun marcador citogenètic, així, Cano i col·laboradors (1994) proposen l'existència de dues categories de Rb, segons l'absència o la presència de còpies addicionals de 6p. El i(6p) és una reorganització gairebé exclusiva del Rb, (Kusnetsova *et al*, 1982, Murphree *and* Benedict, 1984, Squire *et al*, 1984, Squire *et al*, 1985, Potluri *et al*, 1986, Gallie *et al*, 1991), i sembla que la presència de còpies addicionals de 6p va associada a tumors indiferenciats, amb elevada malignitat i invasió del nervi òptic. D'altra banda, Mairal i col·laboradors (2000) no han observat cap associació entre les anomalies detectades i la diferenciació tumoral i el risc histopronòstic.

L'estudi citogenètic de tumors ha permès, en alguns casos, la discriminació entre les formes esporàdiques UL hereditàries o no hereditàries, que és molt difícil si es disposa únicament de dades clíniques. Un 15% dels pacients amb afectació UL presenten en realitat múltiples clons no relacionats (Tien *et al*, 1989).

En qualsevol cas, donat que es tendeix, sempre que és possible, a aplicar teràpies conservadores, no sempre es disposa de mostres tumorals pel seu estudi citogenètic, i quan aquestes estan a l'abast, habitualment es troben en un estat àltament necròtic com a conseqüència d'aquests tractaments conservadors, de forma que es dificulta l'èxit de l'estudi.

Cal ser molt prudent en la determinació de petites delecions utilitzant tècniques citogenètiques. La condensació a l'atzar dels cromosomes pot donar lloc a

resultats artefactuals, especialment en la detecció d'aquestes delecions en mosaic, (Lemieux *and* Richer, 1990), pel que s'ha proposat la utilització de tècniques menys subjectives, com la hibridació *in situ* amb sondes marcades amb fluorocroms, per tal d'augmentar l'eficiència en la detecció i la caracterització de reorganitzacions cromosòmiques en pacients amb Rb (Kallionemi *et al*, 1992, Triviño *et al*, 1997).

## 1.5 CARACTERÍSTIQUES DEL GEN RB1

Friend i col·laboradors (1986) van aconseguir aïllar un segment de cDNA de 4,7 Kb corresponent al mRNA d'un gen que, presumiblement, corresponia al del Rb. En treballs posteriors (Fung *et al*, 1987, Lee *et al*, 1987a), es detectaren delecions en homozigosi que afectaven aquesta seqüència en mostres tumorals de pacients amb Rb i en osteosarcomes. Els tumors sense canvis cromosòmics estructurals presentaven absència o expressió anòmala del mRNA corresponent, i la comparació dels canvis cromosòmics estructurals entre cèl·lules tumorals i fibroblasts d'alguns pacients, proporcionaren la confirmació molecular de la hipòtesi de Knudson, així com la demostració de que la seqüència aïllada per Friend i col·laboradors (1986), corresponia al gen que predisposa al Rb i al osteosarcoma. Aquest gen es va anomenar RB1, i a partir del coneixement de la seqüència del cDNA, McGee i col·laboradors (1989) van descriure l'organització genòmica del locus Rb, mapant la posició dels diferents exons, i les posicions dels llocs de reconeixement de sis enzims de restricció. Presentaren d'altra banda la seqüència del 9,2% del gen RB1, incloent-hi aproximadament 200 pb de les seqüències intròniques flanquejants de cada exó. No va ser fins l'any 1993, que Toguchida i col·laboradors van aconseguir seqüenciar la totalitat dels 180.833 pb del gen, que comprèn 27 exons, de mides entre 31 pb i 1873 pb, i 26 introns, de entre 80 pb i 70 500 pb.

El coneixement de la seqüència del gen RB1 publicada per McGee i col·laboradors va obrir la porta a la utilització de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR *polymerase chain reaction*) per l'amplificació de fragments del gen RB1, i la seva posterior seqüenciació per tal de detectar mutacions puntuals (Horowitz *et al*, 1989, Yandell *and* Dryja, 1989a). D'altra banda, la possibilitat d'utilitzar la tècnica de PCR havia de mostrar-se útil en la detecció de polimorfismes aplicada al diagnòstic, que fins el moment estava limitada a

l'anàlisi de fragments de restricció de longitud polimòrfica (RFLP *restriction fragment length polymorphism*), detectats per *Southern blot*.

Tot i les amplíssimes possibilitats d'estudi molecular del gen RB1, obertes a partir del coneixement de la seva seqüència, no resulta fàcil establir un protocol senzill de cribatge i caracterització de mutacions. Aquest fet és degut a la mida relativament gran del gen, a la seva complexitat, donat que està compost per un gran nombre d'exons, agrupats en tres dominis, separats per dos llargs introns, i a l'heterogeneïtat mutacional. S'han proposat diferents estratègies, encaminades tant a assolir un protocol viable pel diagnòstic genètic rutinari, com a la caracterització de l'espectre de mutacions que afecten al gen RB1.

## 1.6 MUTACIONS DEL GEN RB1

Existeixen diferents estudis de llargues sèries de pacients amb Rb que, utilitzant diferents estratègies, i amb un percentatge d'èxit variable pel que fa a la detecció de mutacions, han aconseguit caracteritzar l'espectre de mutacions del gen RB1. Lohmann i col·laboradors (1996), analitzaren mostres de DNA obtingudes de SP de 119 pacients amb Rb familiar o BL esporàdic, i detectaren mutacions en un 83% dels casos, utilitzant les tècniques de *Southern blot*, anàlisi de longitud de fragments amplificats per PCR, anàlisi d'heterodúplex, anàlisi de conformació de cadenes simples de DNA (SSCP *single strand conformation polymorphism*), i seqüenciació. A partir d'aquest treball determinaren que un 15% dels seus pacients presentaven deleccions de gran mida, un 26% petites alteracions de longitud, i un 42% substitucions de bases. Les mutacions puntuals més habituals són les de tipus *frameshift* i *nonsense*, mentre que les *missense* i *inframe* semblen ser menys comuns (Blanquet *et al*, 1995, Lohmann *et al*, 1996, Mateu *et al*, 1997, Lohmann, 1999).

Tot i que sembla no existir cap punt preferent de mutació, les mutacions puntuals més freqüentment descrites en tumors, consisteixen en transicions de C a T, majoritàriament en codons arginina codificats pel triplet CGA (Hogg *et al*, 1993) que, en cas de produir-se aquestes transicions, passen a ser codons de *stop* TGA. Existeixen 14 codons CGA<sub>arg</sub> en el gen RB1, distribuïts en 10 exons, i alguns autors (Cowell *et al*, 1994, Lohmann, 1999) han descrit la utilitat de fer un estudi preferencial dels mateixos per cercar mutacions.

Blanquet i col·laboradors (1994) van descriure els primers casos de mutacions constitucionals recurrents del gen RB1 en individus no relacionats. Aquestes mutacions, consistien en una transició de C a T en codons CGA<sub>arg</sub> localitzats en els exons 8 i 18, i en una transició de G a A en el intró 16. L'aparició d'una mutació pot, en alguns casos, provocar la creació de dianes per enzims de restricció que no trobariem en una seqüència normal, o bé destruir algunes que són pròpies d'aquesta seqüència salvatge, fet que pot ser d'utilitat en el diagnòstic de mutacions. Mai no s'han trobat mutacions puntuals en els exons 25-27, tot i que contenen dos codons CGA<sub>arg</sub> (Lohmann *et al*, 1996).

A banda de l'alteració preferencial dels codons CGA<sub>arg</sub>, és generalment acceptat que no existeixen *hot spot* o regions preferencials de mutació evidents. Blanquet i col·laboradors van concloure, però, després de l'estudi de 232 pacients, que les mutacions detectades no es distribuïen de forma equitativa, éssent els exons 3, 8, 18, i 19 els preferentment alterats.

Les mutacions puntuals més comuns de tipus *frameshift* o *nonsense*, impliquen la creació d'un codó de *stop* prematur, i per tant la síntesi d'una proteïna truncada. S'ha tractat d'establir una correlació entre la localització d'aquests codons *stop*, i el fenotip dels pacients. En aquest sentit, Lohmann i col·laboradors (1996) van tenir en consideració l'edat al diagnòstic, el nombre de focus tumorals, i la manifestació i el tipus d'altres neoplàsies, i no van trobar cap mena d'associació. D'altra banda, així com les mutacions constitucionals *frameshift* o *nonsense* s'associen generalment a afectació BL, les de tipus *missense* o *inframe*, que principalment afecten a la conformació proteica, van lligades amb freqüència a afectació moderada o a penetrància incompleta (Lohmann, 1999).

## 1.7 LA PROTEÏNA pRB

El gen RB1 codifica per la proteïna pRB, que s'expressa en tots els tipus cel·lulars normals. Aquesta proteïna nuclear, de 110 kd, actúa sobre la regulació del cicle cel·lular (Cooper *and* White, 1989), inhibint la progressió de la fase G<sub>1</sub> a la S (Goodrich *et al*, 1991).

La comprensió del paper de la proteïna pRB es va veure afavorida per l'observació de la seva unió específica a oncoproteïnes virals com l'antigen gran T del virus SV40, l'adenovirus E1A, i la proteïna E7 del papil·lomavirus humà (De Caprio *et al*, 1988, Whyte *et al*, 1988, Dyson *et al*, 1989a, Nevins, 1994). La

unió a proteïnes es dóna en un domini compost per dos subdominis, compresos entre els aminoàcids 393-572, i entre els 646-772, que coincideixen amb regions afectades per mutacions, suggerint que aquests dominis proteics són importants per la funció de pRB. D'altra banda, s'han descrit dues proteïnes (p107 i p130) amb característiques estructurals i funcionals similars a les de la pRB (Dyson *et al*, 1989b, Ewen *et al*, 1989, Whyte *et al*, 1989, Mulligan and Jacks, 1998) que formen part del que s'anomena *família pRB*, i que presenten aquests dominis d'unió a oncoproteïnes virals altament conservats.

La unió a oncoproteïnes virals impedeix la interacció de la família pRB amb proteïnes cel·lulars. Entre les proteïnes que s'uneixen i són regulades per pRB hi ha els factors de transcripció E2F (Zhang *et al*, 1999), composts per al menys 6 proteïnes que condicionen l'expressió de diferents gens implicats en la progressió del cicle cel·lular (Weinberg, 1995). La sobre-expressió dels E2F indueix a les cèl·lules quiescents a entrar en la fase S, i l'activitat dels E2F es veu suprimida amb la co-expressió de les proteïnes de la família pRB. D'altra banda, la sobre-expressió de pRB pot aturar el creixement de línies cel·lulars específiques i mantenir-les en G<sub>1</sub>, i aquesta inhibició és superada gràcies als factors de transcripció E2F (Qin *et al*, 1995, Lukas *et al*, 1996). Aquests fets s'han observat en línies cel·lulars transformades, però estan recolzats per l'anàlisi de la progressió del cicle cel·lular en línies cel·lulars normals, i en teixits primaris (Mudryj *et al*, 1991, Shirodkar *et al*, 1992, Schwarz *et al*, 1993, Chittenden *et al*, 1993, Vairo *et al*, 1995, Moberg *et al*, 1996).

S'ha comprovat d'altra banda que la pRB interactua amb una altra proteïna supressora tumoral, la p53, en la regulació del cicle cel·lular (Whyte, 1994), i es suggereix que seria necessari que s'alterés la funcionalitat d'ambdues proteïnes, per la immortalització de les cèl·lules tumorals en el Rb (Schlamp *et al*, 1997).

L'activitat de la pRB depèn del seu grau de fosforil·lació, i aquest del cicle cel·lular, de forma que es troba no fosforil·lada en les fases G<sub>0</sub> i G<sub>1</sub>, i àltament fosforil·lada en S i G<sub>2</sub>. La fosforil·lació de pRB està mediada per les ciclina quinases E-CDK2 i D-CDK4. La ciclina D-CDK4 està regulada per l'inhibidor p16<sup>INK4A</sup>. En diferents tipus de cancers humans són freqüents les mutacions en els gens tant d'aquest inhibidor, com de les CDK4, així com del gen RB1, i es parla de la ruta pRB-p16-ciclina, com a controladora del cicle cel·lular (De Caprio *et al*, 1988, Buchkovich *et al*, 1989, Mihara *et al*, 1989).

## 1.8 EL RB EN RELACIÓ AMB ALTRES FORMES DE CÀNCER HUMÀ

Els pacients amb Rb hereditari tenen un risc superior al de la població normal de desenvolupar altres tipus de tumors (Draper *et al*, 1986), preferentment osteosarcomes, i sarcomes de teixits tous (Abramson *et al*, 1976). Els tumors no oculars en pacients amb Rb suposen un problema considerable, de forma que és superior la mortalitat com a conseqüència d'aquests tumors que del propi Rb.

La incidència d'altres tumors primaris en aquests pacients, suggereix que el gen RB1 té un paper clau en l'etiologia d'altres neoplàsies diferents al Rb. Per altra part, els pacients amb Rb són susceptibles als efectes carcinogènics de les radiacions i dels agents alquilants (Bayar *et al*, 1998), pel que també presenten elevada predisposició a patir tumors primaris, relacionats amb el tractament a que són sotmesos per pal·liar el Rb. Aquestes neoplàsies consisteixen principalment en osteosarcoma d'òrbita en pacients tractats amb radioteràpia, i, menys freqüentment, malalties hematològiques (Draper *et al*, 1986, Kingston *et al*, 1987, Bayar *et al*, 1998).

El gen supressor tumoral RB1 s'expressa en una àmplia varietat de teixits, però el paper iniciador de la tumorogènesi d'aquest gen està restringit al Rb. El perquè d'aquesta predilecció podria explicar-se pel fet que, en altres tipus cel·lulars, la inactivació de RB1 produïria únicament una lesió benigna, i que serien necessaris altres esdeveniments. A mida que augmenten el nombre de mutacions necessàries per la tumorogènesi, disminueix l'impacte de la mutació germinal. El nombre de mutacions necessàries seria mínim en els tumors embrionaris, i relativament petit per alguns sarcomes (Knudson, 1996).

S'han observat alteracions del gen RB1 en altres neoplàsies, en les que sembla que la inactivació del gen tindria un paper clau, si no en l'inici, sí en la progressió tumoral. Així, sembla que en tots els tumors neuroendocrins de cèl·lules petites de pulmó, existeixen anomalies en la ruta pRB-p16 (Dosaka-Akita *et al*, 2000). D'altra banda, la LOH de RB1 és un factor de mal pronòstic en pacients amb osteosarcoma (Feugeas *et al*, 1996), i les alteracions en aquest gen es troben amb més freqüència en adenocarcinomes de pròstata d'alt grau o d'estadi avançat (Tricoli *et al*, 1996). A l'igual que en l'adenocarcinoma de pròstata, el gen RB1 té un paper determinant en la progressió del càncer de

bufeta, demostrat mitjançant transfecció amb RB1 de línies cel·lulars en les que es suprimia la tumorogènesi (Bookstein *et al*, 1990b, Takahashi *et al*, 1991, Goodrich *et al*, 1992). Existeix evidència que el gen RB1 s'inactiva durant la tumorogènesi esporàdica de mama en, al menys, un subgrup de tumors (Hamann *et al*, 1996), i sembla que la baixa expressió d'aquest gen estaria correlacionada amb una elevada agressivitat de la malaltia (Bieche *and* Lidereau, 2000). Per últim, un cas especial seria el dels tumors cervicals, en que la pèrdua d'activitat de RB1 implicada en la carcinogènesi podria ser conseqüència tant de mutacions en el gen com de interaccions de la pRB amb oncoproteïnes virals del papil·lomavirus humà (Scheffner *et al*, 1991).

Donat que la proteïna p110Rb actúa en la regulació de la transcripció de diferents gens, els seus efectes teixit-específics podrien estar determinats per l'expressió també específica de teixit d'aquests gens diana (Partridge *and* La Thangue, 1991, Sopta *et al*, 1992).

## 1.9 LA GENÈTICA MOLECULAR EN L'ESTUDI DEL RB

La identificació del gen RB1 i la caracterització de diferents mutacions en pacients amb Rb i altres tumors han permès un gran avenç en el coneixement d'alguns aspectes de la proliferació cel·lular normal, així com de la gènesi i progressió tumorals. D'altra banda ha estat possible aplicar els coneixements adquirits, en el diagnòstic molecular de la malaltia. Les estratègies de diagnòstic utilitzades per diferents autors es basen tant en l'anàlisi indirecta com directa del gen RB1.

### 1.9.1 Anàlisi indirecta

Coneixem com a seqüències polimòrfiques de DNA, aquelles que presenten petites variacions innòcues de longitud, o bé de seqüència, que poden servir per "etiquetar" els dos al·lels d'un gen. Si un d'aquests dos al·lels conté una mutació, es pot seguir l'herència d'aquesta, lligada amb la del polimorfisme amb qui cosegrega, mitjançant el que coneixem com a anàlisi de lligament. Per tant, en famílies amb al menys dues generacions d'individus afectes de Rb (que representen aproximadament un 15% del total), es pot determinar quíns han heretat una mutació predisposant, i quíns no. Encara que aquests estudis no



permeten caracteritzar la natura d'aquestes mutacions, sí fan possible excloure de revisions oftalmològiques als no portadors, detectar a portadors de forma prenatal, i, a aquells membres que, no presentant manifestacions clíniques de la malaltia, han heretat la mutació i són, per tant, potencials transmissors.

Les primeres anàlisis de lligament en famílies amb Rb es van realitzar utilitzant com a marcador el gen de l'esterasa-D (ESD) (Cowell *et al*, 1987a). Aquest gen, localitzat al cromosoma 13, es troba estretament lligat al locus Rb (Sparkes *et al*, 1983), i la seva proteïna presenta diferents variants electroforètiques, éssent les més freqüents la ESD1 i la ESD2 (Hopkinson *et al*, 1973). La limitació de l'ús d'aquest marcador va venir donada per la baixa incidència de l'al·lel ESD2, de forma que la freqüència d'heterozigots, i per tant la informativitat resultaven molt baixes (Cowell *et al*, 1987a).

Posteriorment, Wiggs i col·laboradors (1988) van identificar cinc marcadors polimòrfics intragènics, i van demostrar la seva utilitat en l'anàlisi de lligament en 20 famílies. El mètode emprat en la detecció d'aquests RFLPs, va ser el de *Southern blot*, utilitzant sondes marcades radioactivament.

Amb la introducció de la tècnica de PCR (Mullis *et al*, 1986, Mullis and Faloona, 1987), i una vegada coneguda la seqüència del gen RB1 (McGee *et al*, 1989), es va facilitar l'anàlisi de lligament, donat que la PCR és més ràpida, requereix menys manipulacions, la quantitat de mostra necessària per l'estudi és inferior, i pot fins i tot trobar-se parcialment degradada, com és el cas de les mostres obtingudes de teixits inclosos en parafina (Onadim *and* Cowell, 1991). D'altra banda no és necessari el marcatge radiactiu. És per tot això que es van publicar una sèrie de protocols per a la detecció de diferents polimorfismes utilitzant aquesta tècnica (Yandell *and* Dryja, 1989b, Vaughn *et al*, 1990, McGee *et al*, 1990, Bookstein *et al*, 1990a, Brandt *et al*, 1992, Scharf *et al*, 1992).

L'estudi de marcadors polimòrfics de DNA a partir de mostres tumorals pot portar-se a terme tant en pacients amb Rb familiar com esporàdic, per tal de verificar si ha esdevingut la LOH que sol donar-se en un 70% dels tumors. Per altra part l'estudi d'aquests polimorfismes en SP pot ser útil en la determinació de l'origen parental dels al·lells que han patit una mutació *de novo*.

## 1.9.2 Anàlisi directa

El conjunt de marcadors polimòrfics disponibles poden ser no informatius per algunes famílies, i d'altra banda la majoria de Rb hereditaris s'originen com a conseqüència de mutacions *de novo*, per la qual cosa no és possible realitzar estudis de lligament. Tampoc no es pot descartar, en base únicament de les dades clíniques, que un pacient amb Rb UL sense història familiar de la malaltia sigui portador d'una mutació constitucional. En tots aquests casos, per oferir un diagnòstic genètic, es fa necessària una anàlisi directa del gen, per tal de caracteritzar les mutacions predisposants.

L'aïllament del cDNA corresponent al mRNA del gen del Rb (Friend *et al*, 1986, Lee *et al*, 1987a) va permetre l'aplicació de la tècnica de *Southern blot* utilitzant sondes de cDNA, per la detecció de reorganitzacions i delecions en el gen RB1 (Fung *et al*, 1987), protocol que ha seguit utilitzant-se posteriorment (Blanquet *et al*, 1995, Lohmann *et al*, 1996, Mateu *et al*, 1997), i que permet la detecció de delecions en un 15% dels pacients portadors de mutacions constitucionals (Horsthemke, 1992).

L'obtenció de part de la seqüència del gen RB1 (McGee *et al*, 1989), afegida a la disponibilitat de la tècnica de PCR van permetre el veritable pas endavant, donat que va ser possible amplificar i seqüenciar posteriorment cadascun dels 27 exons del gen, i es va comprovar l'eficàcia d'aquest protocol en la identificació de mutacions (Yandell *and* Dryja, 1989a Yandell *et al*, 1989c).

El mètode d'amplificació i seqüenciació no es va estendre però àmpliament, degut a que la seqüenciació no automatitzada disponible en aquells moments resultava poc aplicable a la rutina clínica, pel que es va pensar en la necessitat d'utilitzar alguna tècnica que permetés el cribatge previ del gen. Dunn i col·laboradors (1988) utilitzaren la tècnica de protecció de RNasa per posar de manifest mutacions tan subtils com els canvis d'una base. Aquesta metodologia presentava però una limitació inherent, ja que la capacitat de les ribonucleases per tallar desaparellaments en els híbrids RNA:RNA o DNA:RNA està afectada pel tipus de desaparellament i per les seqüències que el flanquegen, de forma que només es detecten el 50% dels canvis d'un parell de bases (pb) (Dunn *et al*, 1988). Per altra part, si bé l'estudi de RNA tumoral, no ja pel mètode de protecció de la RNasa, si no pel d'amplificació per PCR podria ser la forma més

directa de detecció de mutacions, existeixen una sèrie de factors que el restringeixen, com són el fet de que no sempre es té disponibilitat de mostres tumorals, i que, quan s'obtenen, sovint presenten aspecte necròtic com a conseqüència dels tractaments, i, per últim, s'ha comprovat que en aproximadament el 40% dels tumors no es sintetitza RNA a partir del gen RB1 (Friend *et al*, 1986, Fung *et al*, 1987, Lee *et al*, 1987b, Goddard *et al*, 1988). Pel que fa a la detecció de mutacions constitucionals, tampoc no és possible fer una anàlisi de RNA, ja que sembla que l'al·lel normal suprimeix l'expressió del transcrit mutats, o bé que aquest és inestable (Dunn *et al*, 1988, Zhu *et al*, 1989, Murakami *et al*, 1991). Per tot això va ser necessari establir un protocol eficient per la identificació de mutacions constitucionals en heterozigosi.

Diferents autors han estudiat la viabilitat de diferents mètodes de cribatge per a la detecció de mutacions constitucionals, precedits per l'amplificació dels fragments a estudiar per PCR. Entre les tècniques disponibles destaquen les de digestió química de fragments desparellats (CCM, *chemical cleavage mismatch method*) (Cotton *et al*, 1988), electroforesi en gel amb gradient desnaturalitzant (DGGE, *denaturing gradient gel electrophoresis*) (Fischer and Lerman, 1983, Blanquet *et al*, 1993) o de temperatura (TGGE, *temperature gradient gel electrophoresis*) (Wartell *et al*, 1990), i anàlisi de conformació de cadenes senzilles de DNA (SSCP) (Orita *et al*, 1989). De totes elles, la que ha comptat amb una més àmplia acceptació, probablement per ser la que requereix menys manipulacions, ha estat la de SSCP (Hogg *et al*, 1992, Shimizu *et al*, 1994, Blanquet *et al*, 1995, Lohmann *et al*, 1996, Mateu *et al*, 1997, Munier *et al*, 1998, Sütterlin *et al*, 1999).

Les diferents tècniques de cribatge esmentades permeten seleccionar aquells fragments que es comporten de forma anòmala i seqüenciar-los, per tal de caracteritzar mutacions i realitzar el diagnòstic genètic. S'han proposat encara mètodes de pre-cribatge que farien possible evitar aplicar en alguns casos tècniques com la de SSCP. Un possible protocol seria el d'amplificació per PCR dels diferents exons, i l'aplicació de tècniques electroforètiques d'alta resolució als fragments obtinguts, per a detectar variacions de longitud de fins i tot una única base (Horsthemke, 1992, Lohmann *et al*, 1992, Lohmann *et al*, 1996).

## 1.10 PERSPECTIVES GENÈTIQUES DE FUTUR

La recerca científica de les malalties genètiques té l'ànim d'entendre els mecanismes que originen aquestes malalties, així com els esdeveniments implicats en la seva progressió. D'altra banda es tracta, sempre que és possible, d'establir una correlació genotip-fenotip amb valor pronòstic. Però a on van dirigits una bona part dels esforços és a predir la malaltia abans de que aquesta es desenvolupi, fent possible utilitzar els recursos a l'abast per mantenir la salut, abans que per tractar la malaltia. La metodologia necessària per aquests tests predictius es troba estandaritzada per algunes malalties i no tant per altres, però en qualsevol cas, el que no és encara generalitzat és la seva aplicació en el protocol clínic rutinari, i aquest és un dels reptes de futur (Gallie, 1997).

L'aplicació de tècniques de diagnòstic genètic amb caràcter predictiu suposa un indiscutible avantatge pels pacients, concretament en el cas del Rb per preservar la vida i la visió, però d'altra banda pot constituir una forma d'estalvi econòmic, ja que permet l'exclusió de seguiment oftalmològic dels familiars de pacients amb Rb, si es demostra genèticament que no són portadors (Noorani *et al*, 1996), i un benefici social i personal.

En els últims anys, s'han aplicat amb èxit diferents metodologies de diagnòstic genètic preimplantacional, tècnica que consisteix en la detecció de malalties genètiques a partir d'una cèl·lula, obtinguda d'un embrió. Recentment, s'ha aconseguit la detecció de la mutació predisposant al Rb en una família, utilitzant aquesta metodologia (Sütterlin *et al*, 1999). El protocol utilitzat pot ser útil, no només pel diagnòstic genètic preimplantacional, si no també en el diagnòstic prenatal realitzat a partir de poques cèl·lules fetals, com poden ser les circulants en sang materna, o les recuperades del canal endocervical, metodologies que són pel moment experimentals.

L'estudi genètic del Rb ha permès conèixer mecanismes desencadenants de la tumorigènesi que han demostrat ser comuns a d'altres malalties, així, la LOH com a mecanisme inductor en molts cancers humans es va descriure per primera vegada en el Rb (Cavenee *et al*, 1983, Godbout *et al*, 1983). L'estudi de la proteïna pRB ha permès millorar la comprensió de la regulació del cicle cel·lular, i actualment la major part de la literatura relacionada amb el Rb fa referència a nous descobriments sobre el seu paper en el Rb i altres tipus de

càncer. Tot i que el diagnòstic genètic predictiu suposi un avenç important, la prevenció, o la supressió del creixement tumoral, suposarien un èxit superior. Potser nous coneixements sobre la pRB permetran assolir la capacitat d'aplicar algun mètode de teràpia, que ara per ara és únicament especulatiu (Horsthemke, 1992).

Per últim, i de cara a un futur segurament més immediat, s'ha proposat la utilitat d'introduir i consultar a través de *internet* totes aquelles mutacions individuals detectades en pacients amb Rb (Gallie, 1997). L'augment del nombre de dades facilitaria l'establiment d'un ordre en l'elecció de les regions del gen RB1 a estudiar, optimitzant-se els protocols de diagnòstic.

## 1.11 OBJECTIUS

El Retinoblastoma és un dels pocs tumors que es desenvolupen com a conseqüència de la inactivació d'un únic gen. Els signes clínics diferencials no permeten realitzar un diagnòstic inequívoc de quins casos són hereditaris, i quins no ho són. D'altra banda existeixen casos de penetrància incompleta i expressivitat variable que dificulten la valoració del caràcter hereditari de la malaltia. En base a aquests fets, el nostre objectiu principal va ser:

1.- Diagnosticar genèticament a pacients afectes de Retinoblastoma, i detectar a portadors asimptomàtics.

Per tal d'assolir aquest objectiu, ens vam plantejar:

1.1- Realitzar un estudi citogenètic per a la detecció de delecions i reorganitzacions que afecten la regió cromosòmica 13q14

1.2- Utilitzar la tècnica de FISH per a la detecció de microdelecions que afecten al gen RB1

1.3- Realitzar una anàlisi de lligament utilitzant diferents marcadors intragènics, per seguir la segregació de l'al·lel mutat del gen RB1, en famílies amb al menys dues generacions amb individus afectes

1.4- Fer un cribatge de mutacions per digestió enzimàtica i anàlisi de SSCP, i una caracterització de les mateixes per seqüenciació

Per últim, i una vegada assolits els anteriors:

2.- Oferir consell genètic a les famílies estudiades