

3. RESULTATS

3.1. ESTUDI CITOGENÈTIC

Es va obtenir resultat de l'estudi citogenètic de 60 individus, a partir del cultiu de limfòcits de SP, i de un cas de detecció prenatal a partir del cultiu de vellositats corials. Dels cariotips obtinguts, 48 corresponen a pacients afectes de Rb, i 12 a individus normals, parents directes (taula 2, pàg 30).

3.1.1 Cariotip dels pacients afectes

Dels 48 pacients afectes estudiats, 46 van presentar un cariotip normal: 22 amb cariotip 46,XX, 23 amb cariotip 46,XY, i un amb cariotip 46,XY,14 ps+.

Dos pacients van presentar un cariotip alterat. Un d'ells (4Rb), amb un Rb UL, amb afectació de l'ull esquerre (UE) (4Rb), presenta a més els trets fenotípics de la síndrome de Noonan. És el segon fill d'una família sense antecedents previs de la malaltia, ni de la síndrome, i va mostrar un cariotip 46,XY,del(13)(q14.3). No va ser possible l'estudi dels pares ni del germà sa (fig 3).

L'altra pacient (33Rb) és l'única filla d'una parella sense antecedents de Rb, fruit d'un primer embarç de curs normal, a la qual se li va diagnosticar un Rb BL a l'edat de dos anys. Després d'un tractament rutinari de radioteràpia i quimioteràpia va presentar una recidiva tumoral al UE, pel que es va sotmetre a enucleació. El cariotip va resultar 46,XX,t(5;13)(q22;q14). Aquesta reorganització no implica aparentment pèrdua de material, però afecta la banda 13q14, on es localitza el gen RB1 (fig 4).

3.1.2 Cariotip dels parents sans

De les mostres procedents de 12 individus sans, dues corresponen als pares de la pacient 33Rb, que va presentar cariotip 46,XX,t(5;13)(q22;q14). El resultat va ser normal, pel que la translocació aparentment equilibrada ha estat *de novo*.

Es van estudiar les mostres dels 10 familiars sans 77P, 90P, 91M, 114P, 115M, 118G1, 118G2, 118G3, 118G4 i 119M. Els membres de la família AX 118G2 i 118G2.1 (taula 2 pàg 30) van sol·licitar un diagnòstic prenatal pel seu primer embaràs. Per tal de realitzar aquest estudi es va obtenir una mostra de vellositats corials, que es va utilitzar també per l'anàlisi citogenètica.

En tots els casos el cariotip va resultar ser normal.

3.1.3 Individus afectes no estudiats

12 pacients afectes no van ser estudiats (taula 2 pàg 30). Sis d'aquests pacients pertanyen a famílies amb al menys dues generacions d'afectes, de les que s'ha obtingut al menys el cariotip d'un dels malalts. Donat que aquests cariotips van ser normals, no es va procedir a l'estudi de la resta d'afectes. En 6 casos de pacients sense antecedents, la mostra de SP obtinguda va ser insuficient, i es va decidir sacrificar l'estudi citogenètic a favor del molecular.

Fig 3: cariotip del pacient 4Rb, amb una fletxa s'indica el cromosoma 13 amb la deleció

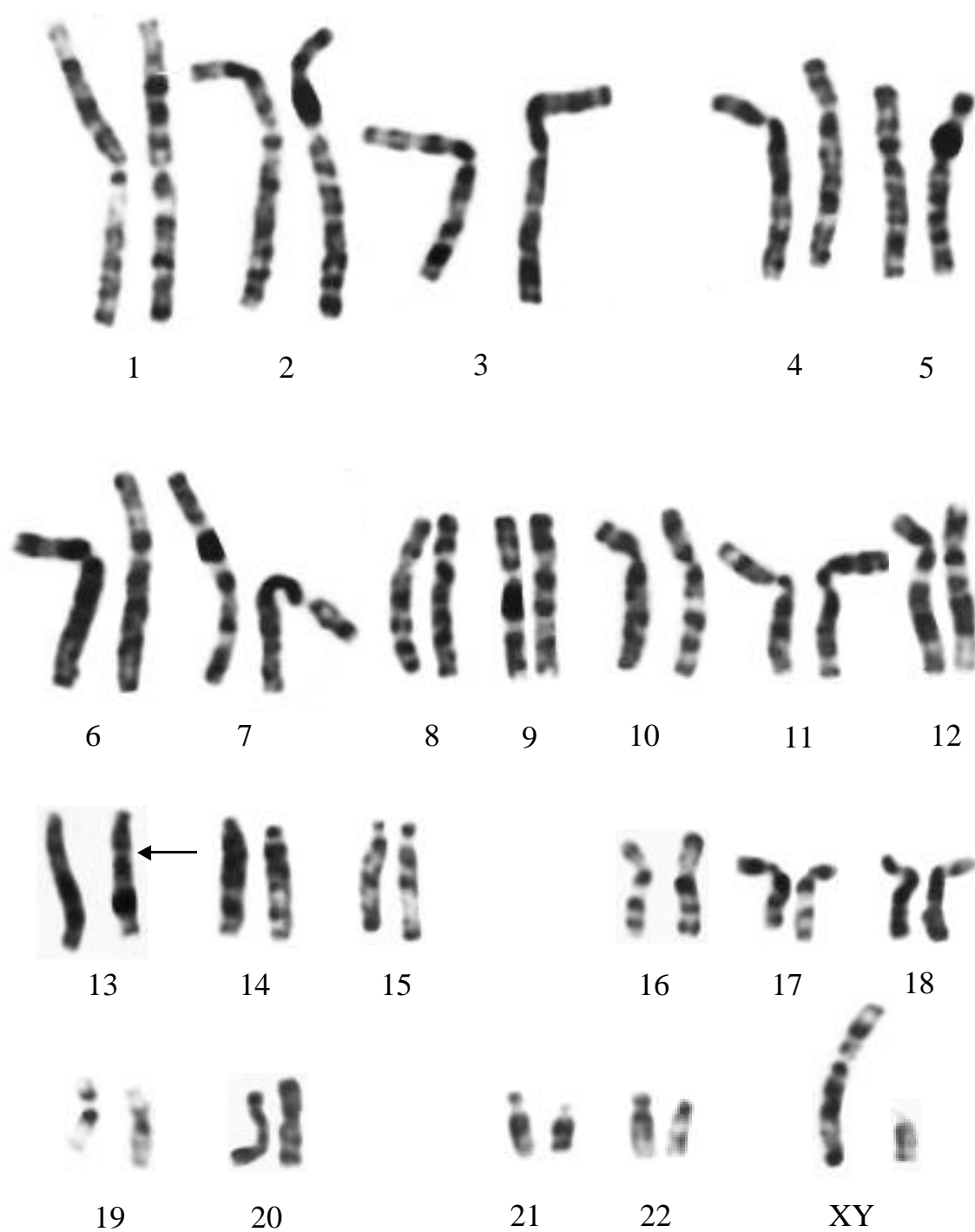
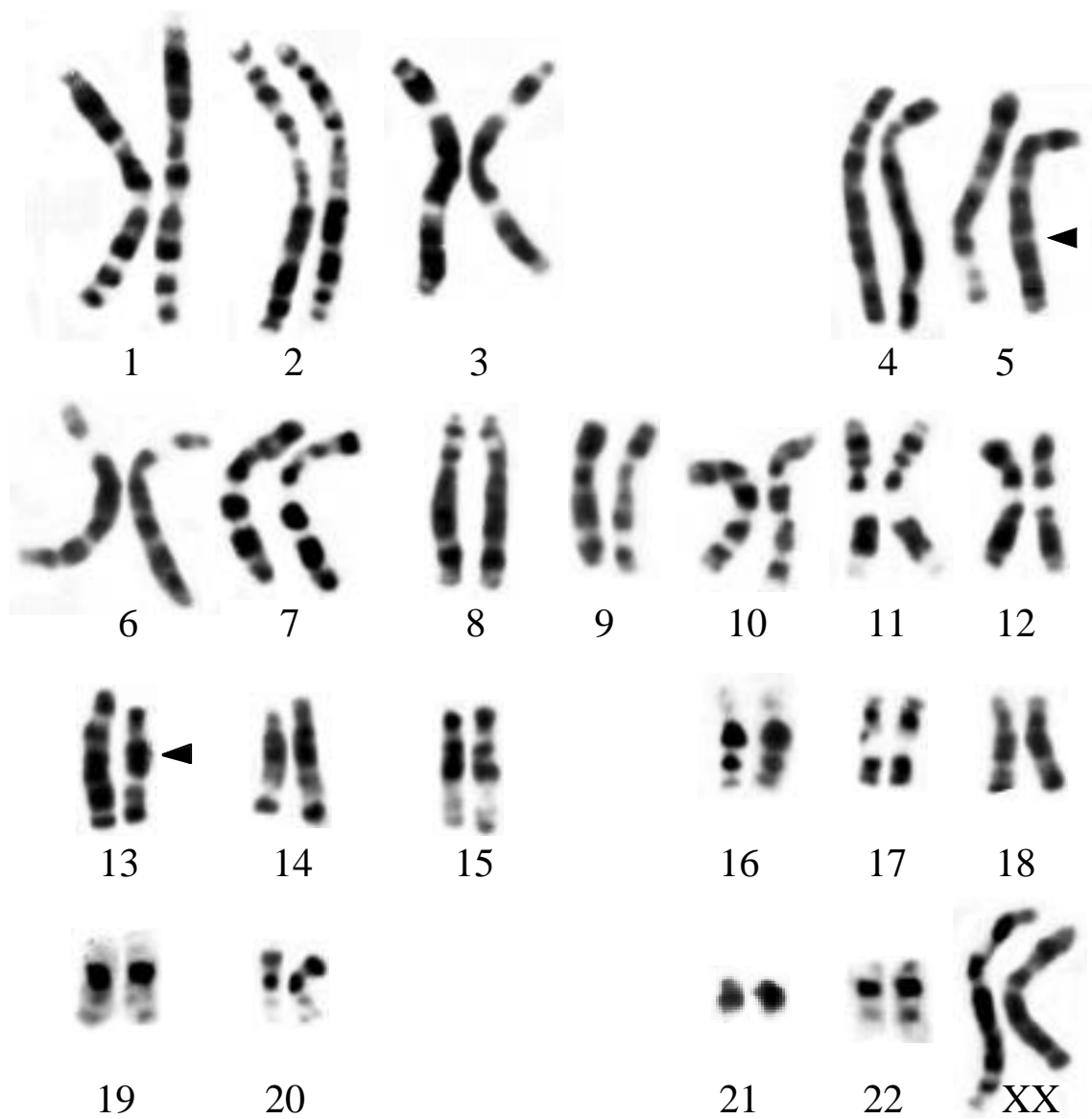


Fig 4: cariotip de la pacient 33Rb, amb puntes de fletxa s'indiquen els punts de tall dels cromosomes implicats en la translocació.



3.2. ESTUDI PER FISH

Dels 48 individus afectes dels que es va obtenir resultat citogenètic, es va aplicar la tècnica d'hibridació *in situ* a 22, i es va obtenir resultat en 15 casos. Paral·lelament van ser estudiats 5 individus control.

A partir de l'anàlisi dels individus control es va establir un valor llindar, amb una confiança del 99%, per tal de descartar falsos positius. Per a calcular aquest llindar es va aplicar la fórmula:

Mitjana nuclis o metafases amb un senyal d'hibridació + 2.33 x desviació estàndard = valor llindar

El valor llindar, o límit superior de l'interval de confiança obtingut per les metafases analitzades, va ser de 0,026 (taula 9), i pels nuclis interfàsics de 0,034 (taula 10), de forma que els pacients amb valors del límit inferior de l'interval de confiança superiors al llindar serien portadors d'una deleció.

Taula 9: valors obtinguts de l'estudi de metafases en la població control

	METAFASES		
	analitzades	amb dos senyals	amb un senyal
C1	151	150	1
C2	85	84	1
C3	73	72	1
C4	35	34	1

Freqüència mitja (\bar{X}) de metafases amb un senyal = 0,015

Límit superior de confiança (99%) = 0,026

Taula 10: : valors obtinguts de l'estudi de nuclis en la població control

	NUCLIS		
	analitzats	amb dos senyals	amb un senyal
C1	317	310	7
C2	500	498	2

Freqüència mitja (\bar{X}) de nuclis amb un senyal = 0,013

Límit superior de confiança (99%) = 0,034

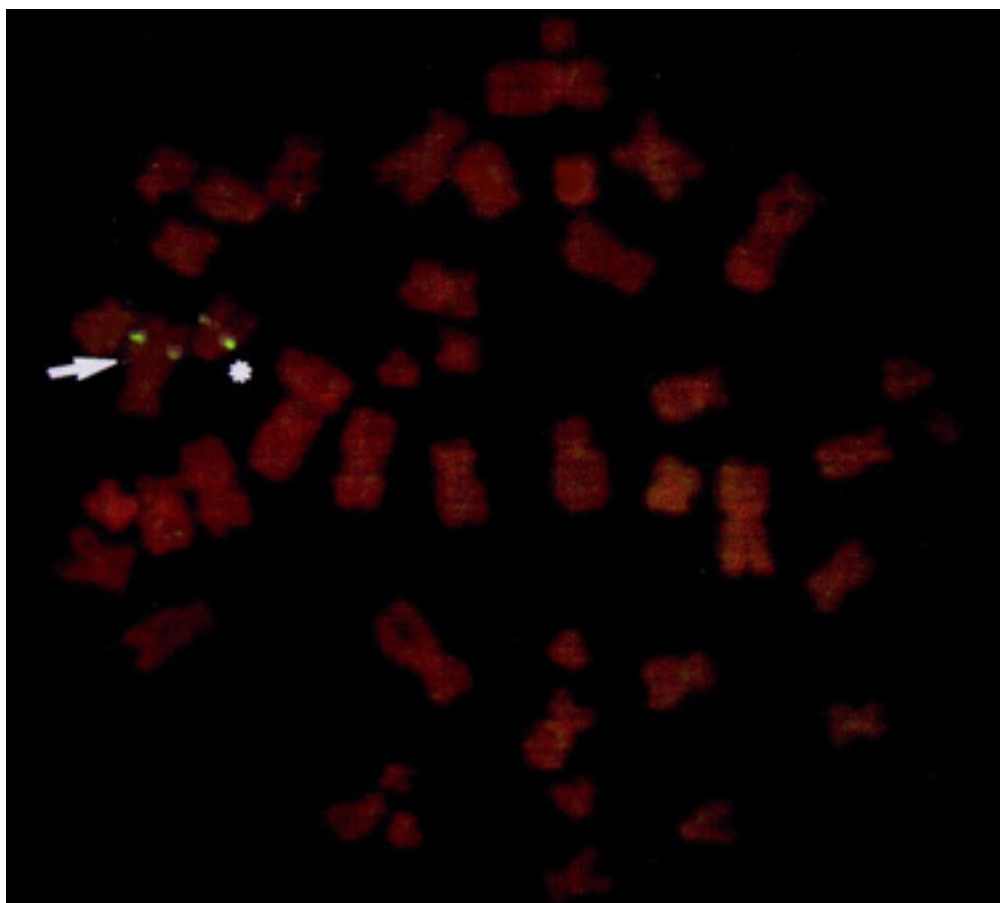
Tan sols el pacient 111Rb, amb Rb UL, i sense antecedents familiars, va mostrar diferències significatives amb el grup control (taula 11). El límit inferior de l'interval de confiança ($p < 0,001$) de metafases amb un senyal va ser 0,040, superior al llindar (0,026), pel que presentaria una deleció en mosaic. Dos individus (14Rb i 102Rb) van presentar una freqüència de metafases amb un senyal (0,08 i 0,07 respectivament), per sobre de la mitjana de tots els pacients (0,04, taula 11), però el seu límit d'interval de confiança es solapa amb el de la població control, pel que no podem diferenciar-los d'aquesta. D'altra banda, la tècnica de FISH va confirmar que el locus RB1 es veu afectat en la translocació detectada per citogenètica en la pacient 33Rb (fig 5).

Taula 11: resultats de la hibridació *in situ* aplicada en pacients

mostra	Nre n	Nre m	nre n 2X	nre m 2X	nre n 1X	nre m 1X	n	m	LIIC n	LIIC m
11Rb	508		504		4		0,01	-	0	-
14Rb		26		24		2	-	0,08	-	0
29Rb	507		505		2		0	-	0	-
33Rb		25		25			-	0	-	0
36Rb		11		11			-	0	-	0
51Rb	440		437		3		0,01	-	0	-
61Rb	500		498		2		0	-	0	-
73Rb	509	12	502	12	7		0,01	0	0,002	0
78MRb		35		34		1	-	0,03	-	0
79Rb		4		4			-	0	-	0
102Rb		14		13		1	-	0,07	-	0
106Rb		49		47		2	-	0,04	-	0
107Rb		49		47		2	-	0,04	-	0
108Rb	524	31	511	30	13	1	0,02	0,03	0,009	0
111Rb		78		68		10	-	0,13*	-	0,040#

X: senyals d'hibridació; n: nuclis; m: metafases; : freqüència de cèl·lules amb un senyal LIIC: límit inferior de l'interval de confiança; * significativament diferent a la dels controls ($p < 0,01$) # LIIC per sobre del valor llindar; La mitjana de la població per les metafases va ser de 0,04, i pels nuclis de 0,01.

Fig 5: FISH de la mostra 33Rb, amb cariotip 46,XX,t(5;13)(q22;q14). Amb una fletxa s'indica el senyal d'hibridació en el cromosoma 5 implicat en la translocació, i amb un asterisc l'altre senyal d'hibridació en el cromosoma 13 normal



3.3 ESTUDI MOLECULAR

S'ha realitzat l'estudi de lligament en 7 famílies, l'anàlisi de mutacions mitjançant digestió amb enzims de restricció en 42 individus, i el cribatge de mutacions per SSCP en 46 individus (taula 12).

Taula12: tècniques moleculars utilitzades

familia	individu	ALL	ER	SSCP				
				a	b	c	d	e
A	4Rb		+	+	+		+	
B	7Rb		+	+	+		+	
	8Rb		+	+	+		+	
C	11Rb		+	+	+		+	
D	14Rb		+	+	+		+	
E	17Rb		+	+	+		+	
G	21PRb	+			+	+		
	22M	+						
	23Rb	+	+	+	+	+	+	+
	23G	+						
H	26Rb		+	+	+		+	
I	29Rb		+	+	+		+	
J	30Rb		+	+	+		+	
K	33Rb		+	+	+		+	
L	35M					+		
	36Rb		+	+	+		+	
	37Rb		+	+	+		+	
	38Rb		+	+	+		+	
M	41Rb		+	+	+		+	
N	45Rb					+	+	
	45G					+	+	
O	48Rb		+	+	+		+	
P	51Rb		+	+	+		+	
Q	52P	+						
	53MRb	+			+	+		
	55Rb	+	+	+	+		+	+
R	58Rb*		+	+	+	+	+	+
S	59P	+						
	60MRb	+	+	+	+	+	+	+
	61Rb	+			+	+		
T	64Rb		+	+	+		+	
U	68Rb		+	+	+		+	
V	71Rb		+	+	+		+	
Y	74P		+	+	+		+	
	76Rb						+	+
Z	77P		+				+	+
	78MRb		+				+	+
	79Rb		+	+	+	+	+	+
AA	82Rb*					+	+	
AE	89Rb						+	+
AF	93Rb*						+	+
AM	102Rb*						+	+
AN	103PRb		+				+	+
	104M		+					
	105Rb		+				+	+
	106Rb		+	+	+	+	+	+
AO	107Rb*					+	+	
AP	108Rb*						+	+
AQ	109Rb*						+	+
AR	110Rb*						+	+
AS	111Rb*						+	+
AT	112Rb						+	+
AV	114P		+					
	115M		+					
	115TRb		+				+	
	116Rb		+					
	117		+					
AX	118PRb		+	+				
	119M		+	+				
	120Rb		+	+				
	121Rb		+	+				
	118G1		+	+				
	118G2		+	+				
	118G2.1		+					
	118G2.2		+					
118G3		+	+					
118G4		+	+					
	CPCRb						+	+

ALL: anàlisi de lligament; ER: anàlisi de mutacions per digestió amb enzims de restricció; *estudi realitzat en mostres de SP i tumor (a la resta, s'ha realitzat en mostres de SP); a: SSCP exó 2, b: SSCP exons 15 i 16, c: SSCP exó 19, d: SSCP exó 20, e: SSCP exó 23.

3.3.1 ANÀLISI DE LLIGAMENT

Es va seguir de forma indirecta la segregació de l'al·lel mutat del gen RB1, utilitzant 5 marcadors polimòrfics de DNA, en les famílies G, Q, S, AN, AV, AX, amb al menys dues generacions d'individus afectes (taula 12, pàg 66 i fig 2, pàg 27). Els resultats obtinguts per cada marcador s'expressen gràficament mitjançant l'arbre genealògic de cada família (fig 6 pàg 68, fig 8 pàg 72, fig 11 pàg 76, fig 13 pàg 80, fig 15 pàg 83). Els arbres genealògics s'han elaborat segons les recomanacions de Bennet i col·laboradors (1995).

En els arbres genealògics referents als marcadors de seqüència, l'al·lel anomenat **1** és aquell que no conté diana polimòrfica per a l'enzim de restricció corresponent en cada cas, i l'al·lel **2** és aquell que sí conté la diana. Pel que fa als polimorfismes de longitud, els al·lells s'anomenen per ordre alfabètic, de forma que l'al·lel **a** serà el de mida més gran dels detectats en cada família, el **b** el de mida immediatament inferior, i així successivament.

S'indica amb una fletxa l'al·lel del marcador que es segrega lligat al l'al·lel mutat de RB1.

3.3.1.1 Anàlisi de lligament utilitzant el marcador polimòrfic de restricció BamHI

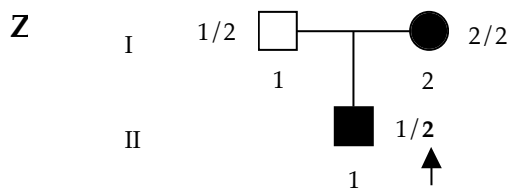
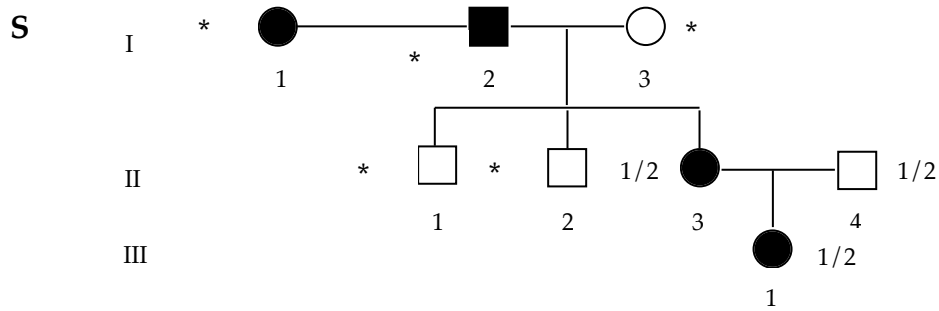
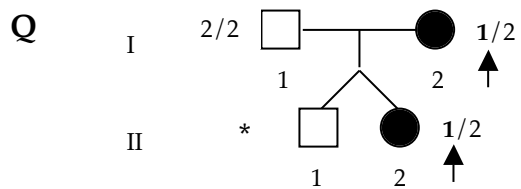
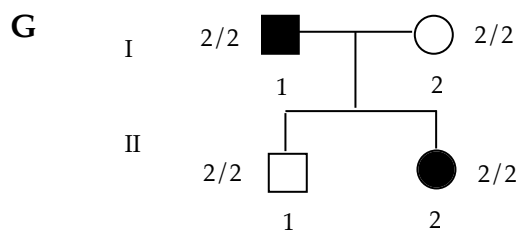
Aquest marcador intragènic presenta dos al·lells, amb una freqüència del 41% per l'al·lel 1 (diana absent) i del 59% per l'al·lel 2 (diana present) (Bookstein *et al*, 1990a). La freqüència d'homozigots ha estat del 53,3%, la d'heterozigots del 46,6% (n=30). La freqüència de l'al·lel 2 ha estat del 76,6% i la de l'al·lel 1 del 23,3% (n=60).

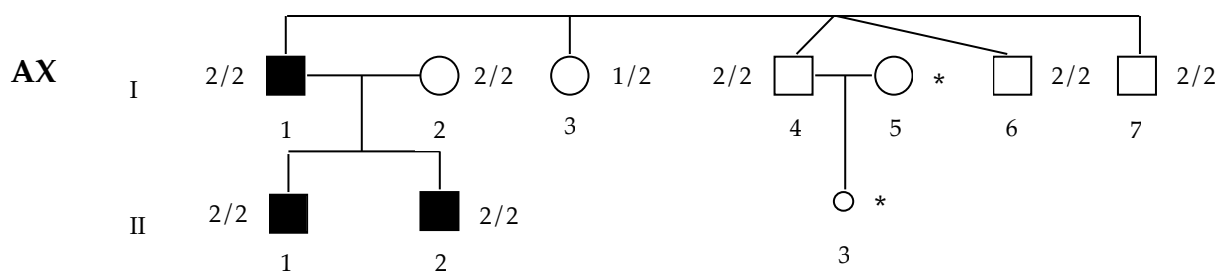
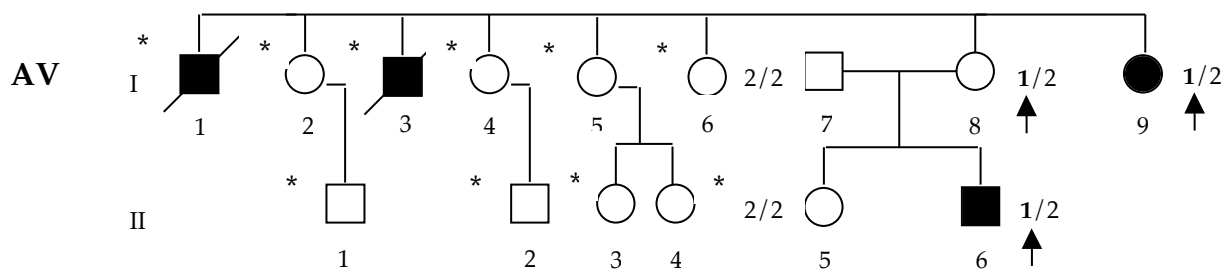
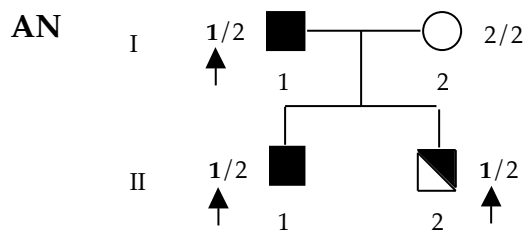
La figura 6 mostra els resultats obtinguts a l'utilitzar aquest marcador.

Pel que fa a la **família G**, formada per quatre membres, amb dues generacions d'afectes de Rb BL (I-1:21PRb, II-2:23Rb), el polimorfisme BamHI no va resultar informatiu, al ser tots els individus homozigots 2/2.

La **família Q** és la formada per quatre membres en la que la mare i la filla menor són afectes de Rb BL (I-2:53MRb, II-2:55Rb). L'al·lel mutat del gen RB1, es segrega juntament amb l'al·lel 1 del marcador. No va ser possible l'estudi de l'individu II-1, al no disposar-se de mostra.

Fig.6: marcador polimòrfic Bam HI





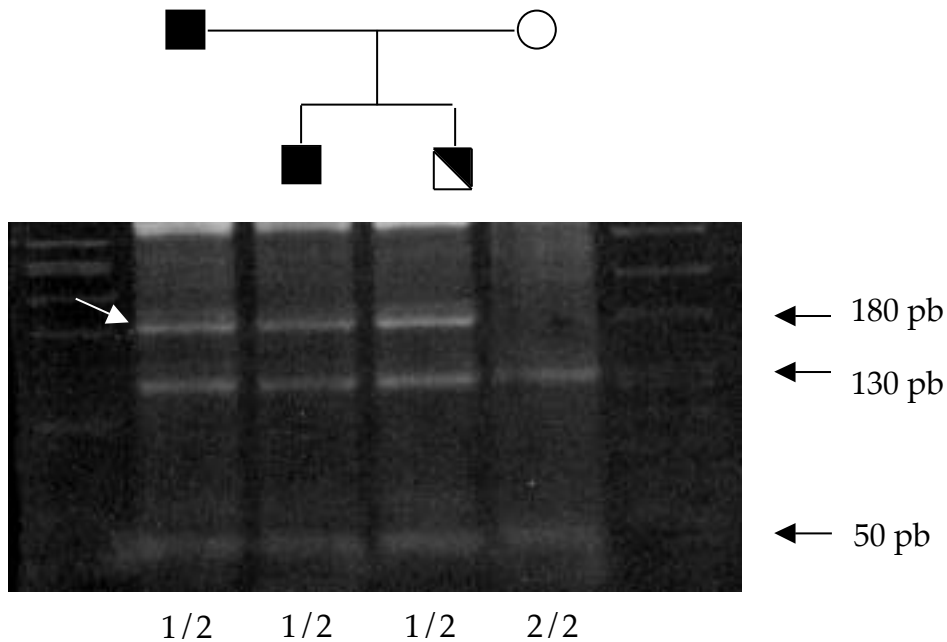
* No determinat

La **família S** presenta membres afectes de Rb BL en tres generacions (I-1, I-2, II-3:60MRb i III-1:61Rb). Només va ser possible l'estudi dels individus II-3, II-4 (afecte de Retinitis pigmentosa), i III-4. Donat que tots van presentar un haplotip 1/2, el marcador va resultar no informatiu.

A la **família Z**, amb dues generacions afectes de Rb BL (I-2:78MRb, II-1:79Rb), l'al·lel mutat de RB1 segrega amb l'al·lel 2 matern.

A la **família AN**, amb dues generacions d'afectes, I-1 (103PRb) i II-1 (106Rb) pateixen un Rb BL, i II-2 (105Rb) Rb UL. La predisposició a la malaltia s'hereda lligada a l'al·lel 1 (fig 7).

Fig 7: anàlisi de lligament de la família AN, utilitzant el marcador BamHI



Amb una fletxa s'indica l'al·lel del marcador al que va lligada l'herència de la malaltia.

A la **família AV**, dels 8 germans de la primera generació d'afectes, tres van presentar un Rb BL. Dos d'ells van morir, I-1 als tres anys d'edat, a conseqüència del Rb, i I-3 als vint i cinc anys, després d'una neoplàsia al sistema nerviós central. La pacient I-9 (115TRb) va ser diagnosticada de Rb BL als cinc anys, i I-8 es va manifestar com a portadora no afectada, al tenir un fill fruit d'un segon embaràs, diagnosticat de Rb BL a l'edat de dos mesos. En aquesta família, l'al·lel mutat de RB1 segrega amb l'al·lel 1. Són portadors d'aquest al·lel

els individus afectes I-9 i II-6, i la no afecta I-8. Els individus sans I-7 i II-5 van presentar un haplotip 2/2.

A la **família AX**, amb dues generacions d'individus afectes de Rb BL, tots els individus clau per lligar l'herència de la malaltia amb la del marcador van presentar un haplotip homozigot 2/2, pel que el polimorfisme no va ser informatiu.

3.3.1.2 Anàlisi de lligament utilitzant el marcador polimòrfic de restricció XbaI

Aquest marcador intragènic presenta dos al·lells, amb una freqüència del 55% per l'al·lel 1 (diana absent) i del 45% per l'al·lel 2 (diana present) (McGee *et al*, 1990). La freqüència d'homozigots ha estat del 40%, la d'heterozigots del 60% (n=30). La freqüència de l'al·lel 1 ha estat del 40% i la de l'al·lel 2 del 60% (n=60).

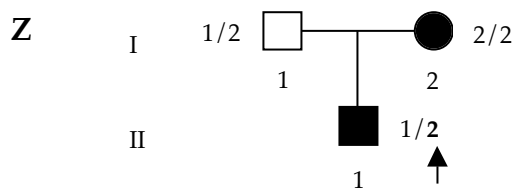
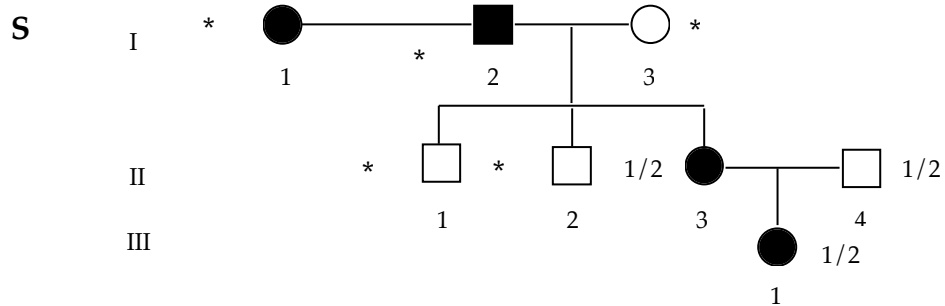
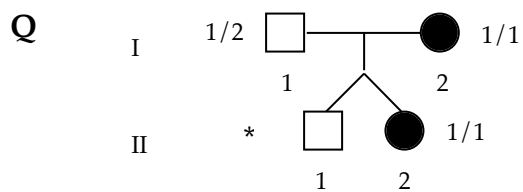
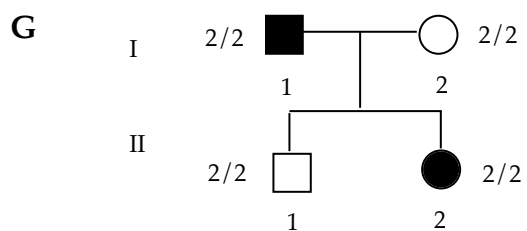
La figura 8 mostra els resultats obtinguts a l'utilitzar aquest marcador.

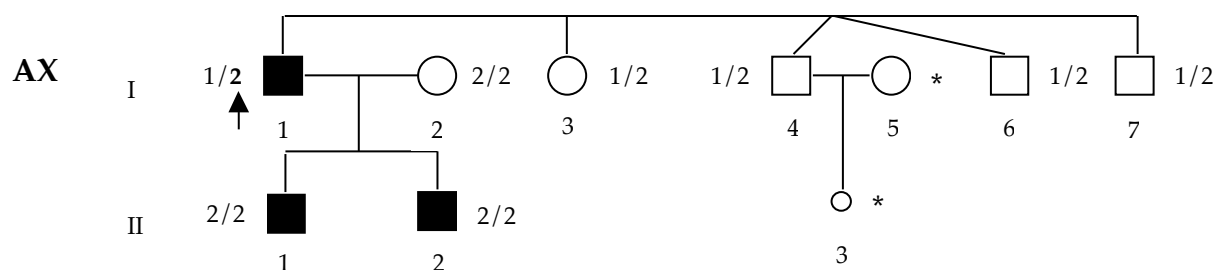
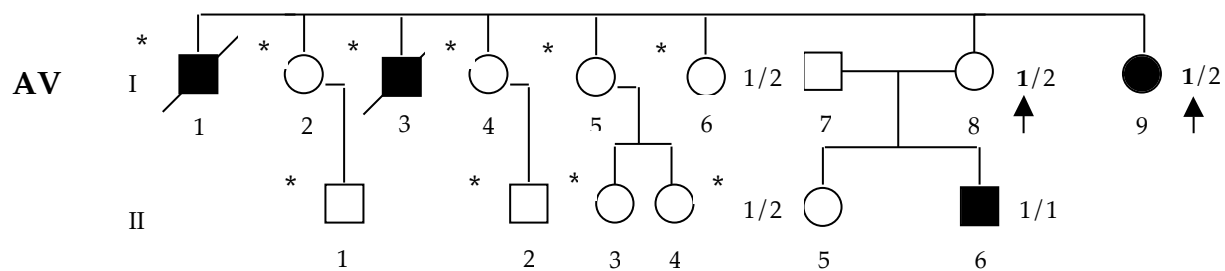
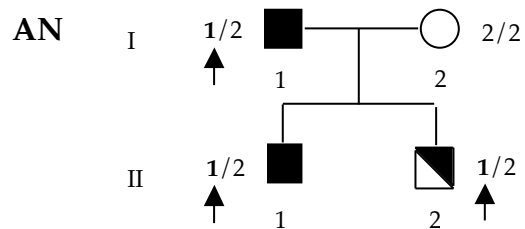
A les **famílies G i Q** aquest marcador no va resultar informatiu, ja que els membres afectes van presentar un haplotip homozigot 2/2 i 1/1 respectivament.

A la **família S**, amb tres generacions de membres afectes, únicament van ser estudiats II-3 (60MRb), II-4 (50P) i III-1 (61Rb), i tots tres van resultar heterozigots 1/2, pel que el marcador no va ser informatiu.

A la **família Z** no pot utilitzar-se XbaI en el diagnòstic de la descendència de I-1 i I-2, donat que no és possible distingir entre els possibles haplotips resultants 1/2 o 2/2, que poden correspondre a portadors o normals.

Fig. 8: marcador polimòrfic XbaI





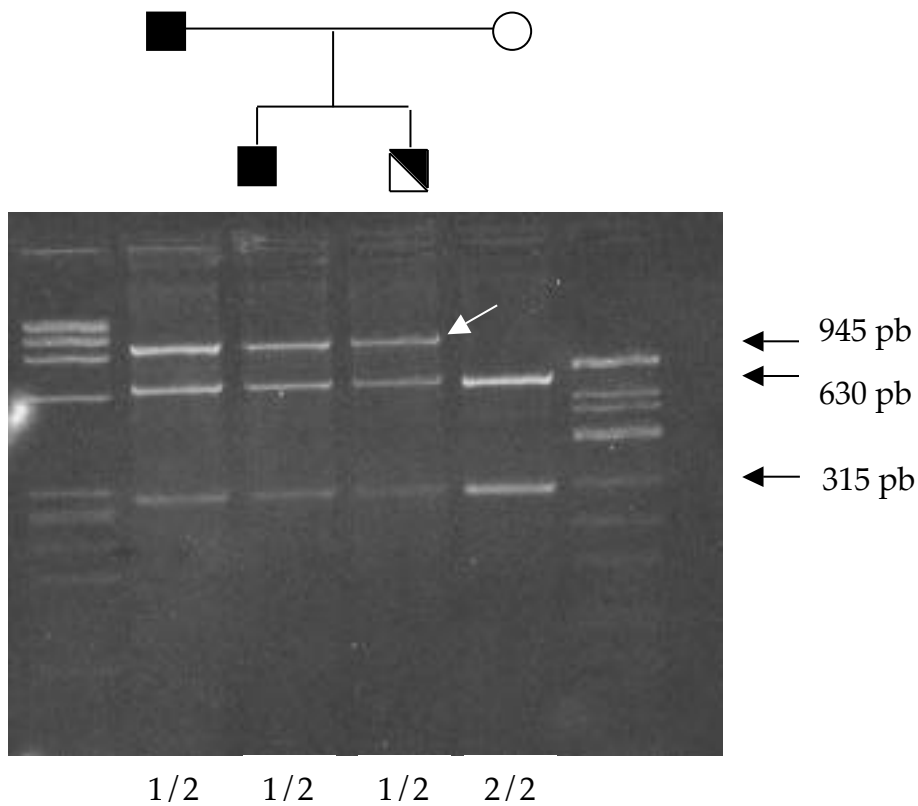
* No determinat

A la **família AN**, l'al·lel mutat de RB s'hereta amb l'al·lel **1** del marcador, de procedència paterna (fig 9).

A la **família AV**, de l'haplotip 1/1 del membre afecte II-6, es va inferir que la predisposició al Rb s'hereda conjuntament amb l'al·lel **1** de procedència materna.

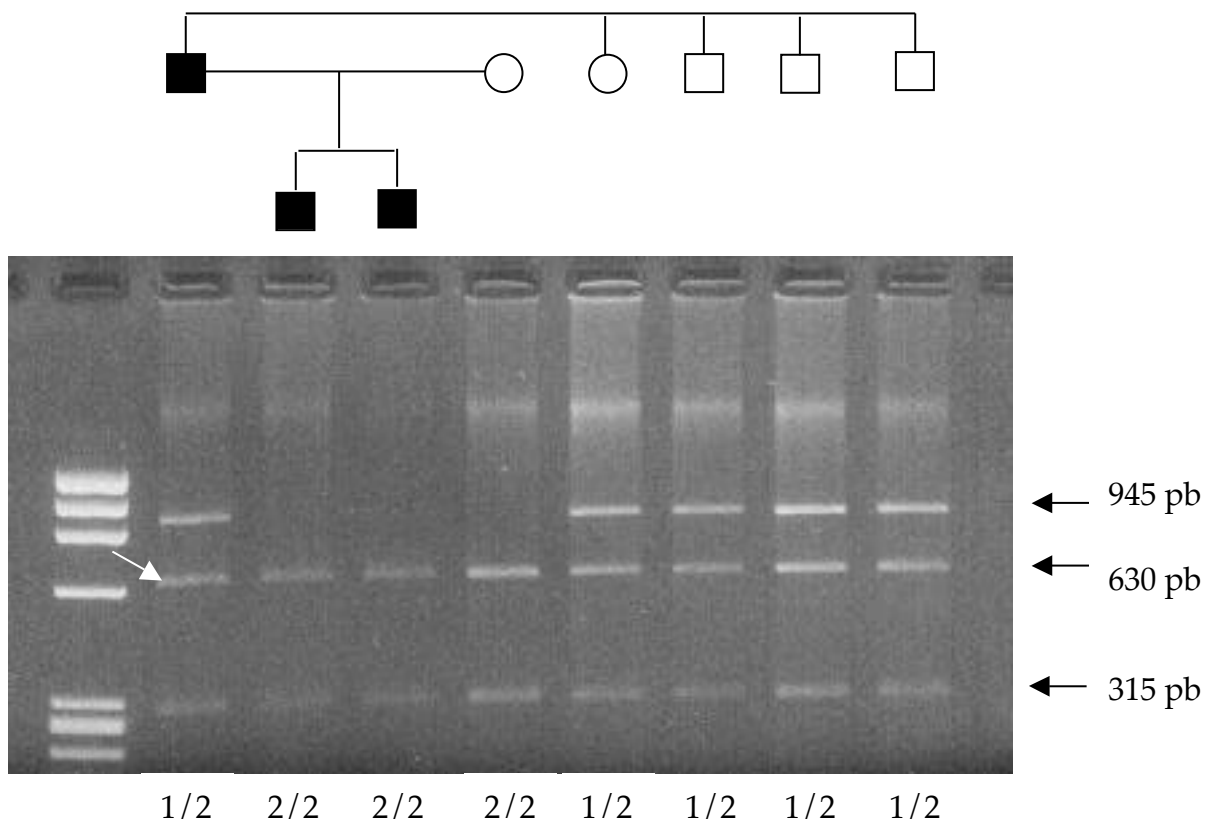
A la **família AX**, la predisposició a la malaltia s'hereta amb l'al·lel **2** patern (fig 10).

Fig 9: anàlisi de lligament de la família AN, utilitzant el marcador XbaI



Amb una fletxa s'indica l'al·lel del marcador al que va lligada l'herència de la malaltia.

Fig 10: anàlisi de lligament de la família AX, utilitzant el marcador XbaI



Amb una fletxa s'indica l'al·lel del marcador al que va lligada l'herència de la malaltia.

3.3.1.3 Anàlisi de lligament utilitzant el marcador polimòrfic de restricció Tth 111 I

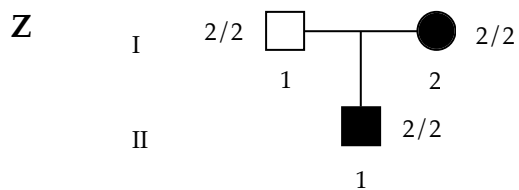
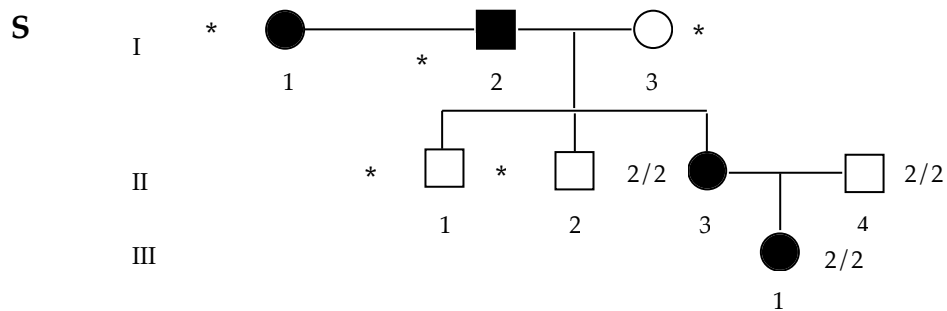
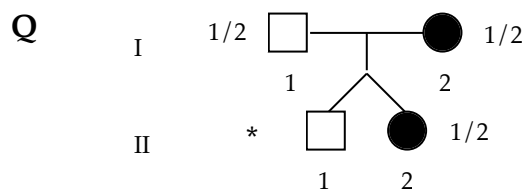
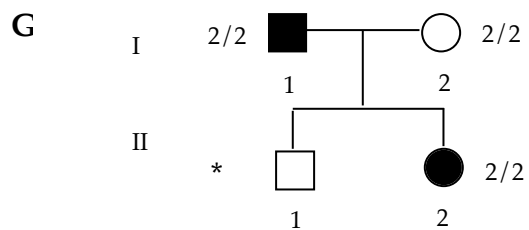
Aquest polimorfisme intragènic presenta dos al·lells, amb una freqüència del 12% per l'al·lel 1 (diana absent) i del 88% per l'al·lel 2 (diana present) (Vaughn *et al*, 1990). La freqüència d'homozigots ha estat del 65,5%, la d'heterozigots del 34,5% (n=29). La freqüència de l'al·lel 1 ha estat del 17,3% i la de l'al·lel 2 del 82,7% (n=58).

La figura 11 mostra els resultats obtinguts a l'utilitzar aquest marcador.

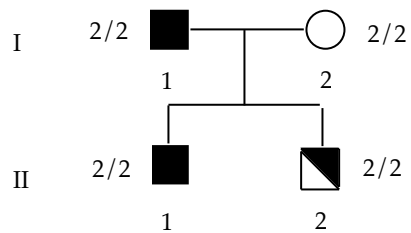
L'estudi de la segregació d'aquest marcador a la **família G** no va resultar informatiu, al ser tots els individus homozigots 2/2.

A la **família Q** tots els membres estudiats van presentar un haplotip heterozigot 1/2, éssent el marcador no informatiu.

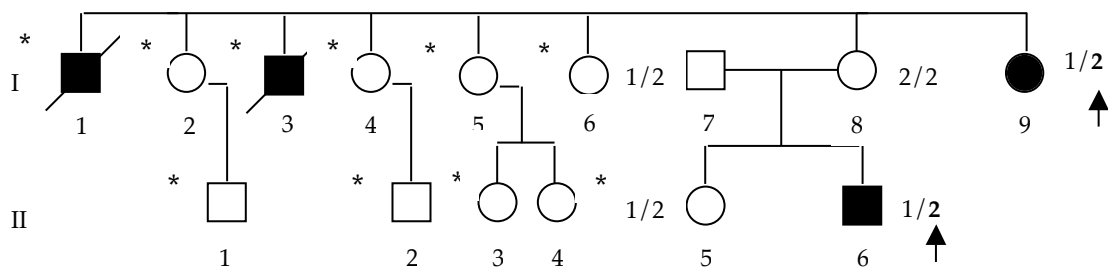
Fig. 11: marcador polimòrfic Tth 111I



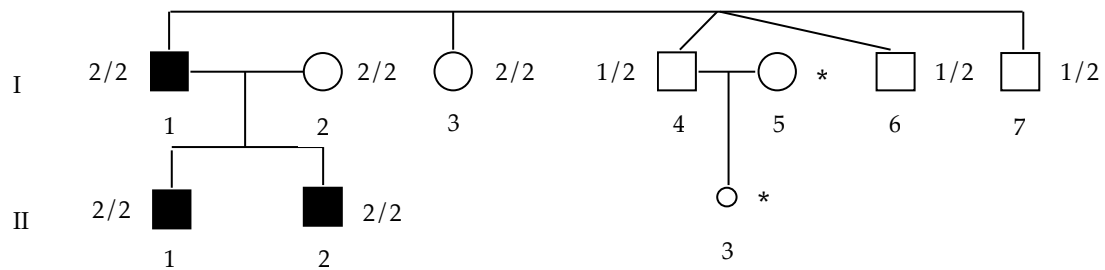
AN



AV



AX

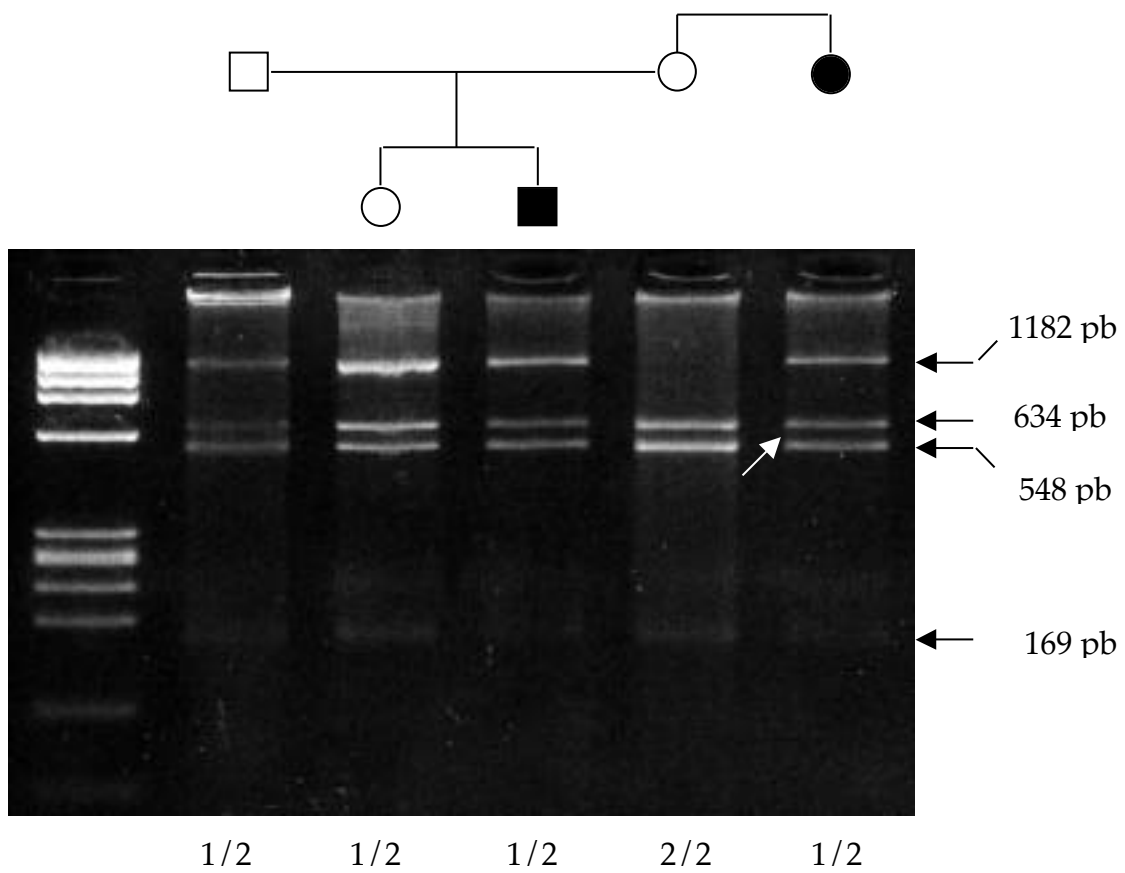


* No determinat

Tots els membres afectes de les **famílies S, Z, AN, i AX**, presentaren un haplotip homozigot 2/2, i per tant no informatiu.

A la **família AV**, i a partir dels haplotips dels membres I-9 (115TRb) i II-6 (116Rb) s'infereix que la predisposició al Rb s'hereta juntament amb l'al·lel 2, present en els individus afectes estudiats (fig 12).

Fig 12: anàlisi de lligament de la família AV, utilitzant el marcador Tth 111 I



Amb una fletxa s'indica l'al·lel del marcador al que va lligada l'herència de la malaltia.