

3.3.3.2 Anàlisi dels exons 15 i 16

Dels 60 individus afectes dels que es va obtenir mostra per a l'estudi molecular (taula 2, pàg 30) van ser analitzats un total de 48, a partir de mostres de SP (taula 12 pàg 66) corresponents a:

- 26 individus sense antecedents familiars de la malaltia, dels quals 13 presentaven Rb BL, i 13 Rb UL
- 18 pacients procedents de famílies amb al menys dos membres afectes, dels quals 15 presentaven afectació BL, i 3 afectació UL
- 4 individus normals (35M, 45G, 74P i 77P), mare, germana i pares de nens amb Rb

També van ser analitzades 9 mostres procedents de biòpsies tumorals.

La mostra 17Rb va presentar, després de la detecció de l'amplificació, i posterior digestió amb l'enzim de restricció NdeI, una banda extra (fig 36). Per descartar que aquesta banda fos producte d'una amplificació inespecífica, es va digerir el fragment amplificat amb l'enzim HaeIII, que presenta una diana única. La digestió va confirmar l'especificitat del producte, així com l'existència de la deleció (fig 37).

Fig 36: electroforesi mostres 110Rb (com a control) i 17Rb, que presenta un fragment addicional entre 200 i 194 pb, compatible amb una deleció

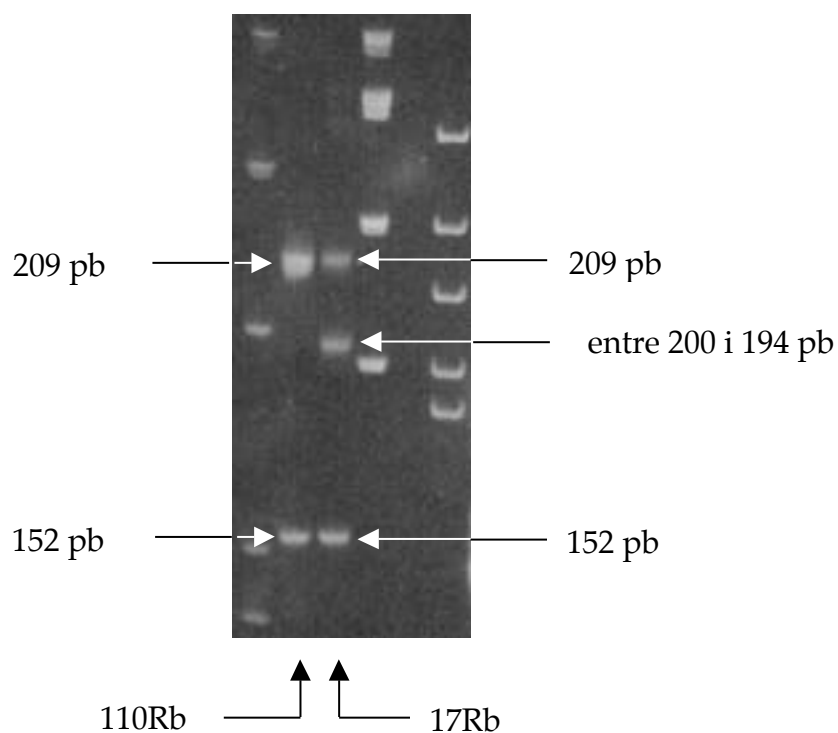
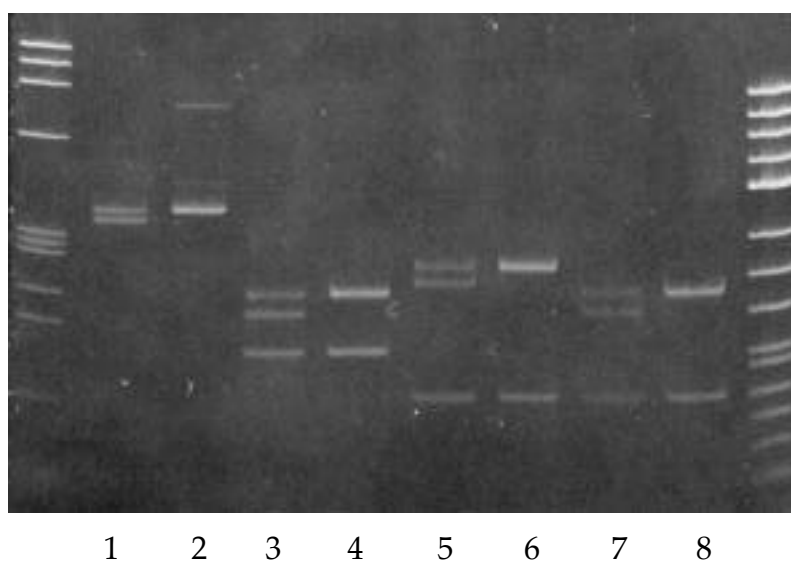


Fig 37: digestió amb els enzims NdeI i HaeIII, de les mostres 17Rb i 105Rb (com a control) per a comprovar l'especificitat del fragment addicional



1-2 mostres 17Rb (1) i 105Rb sense digerir; 3-4: mostres 17Rb (3) i 105Rb digerides amb NdeI; 5-6: mostres 17Rb (5) i 105Rb (6) digerides amb HaeIII; 7-8: mostres 17Rb (7) i 105Rb (8) digerides amb NdeI i HaeIII

De totes les mostres analitzades, sis van presentar patró de SSCP anòmal. Cinc corresponien a SP dels pacients 17Rb (fig 38), 36Rb, 37Rb, 38Rb, i 76Rb, i una a biòpsia tumoral (111T) del pacient 111Rb. El resultat de la seqüenciació va ser normal en tots els casos, excepte el de la mostra 17Rb, corresponent a un individu amb Rb BL, sense antecedents de la malaltia. El cromatograma obtingut és compatible amb una deleció d'aproximadament 14 pb a l'intró 15 en heterozigosi (figs 39 i 40). Les figures 41 i 42 corresponen a cromatogrames de la seqüència normal.

Fig 38: gel de SSCP en el que s'observa la migració anòmala de la mostra 17Rb



17Rb

Fig 39: cromatograma obtingut de la seqüenciació *forward* dels exons 15 i 16 de la mostra de SP 17Rb. En detall s'observa com el cromatograma normal s'altera a partir del punt en que es troba la deleció en heterozigosi. La seqüenciació en els dos sentits, *forward* i *reverse*, permet acotar aproximadament la deleció

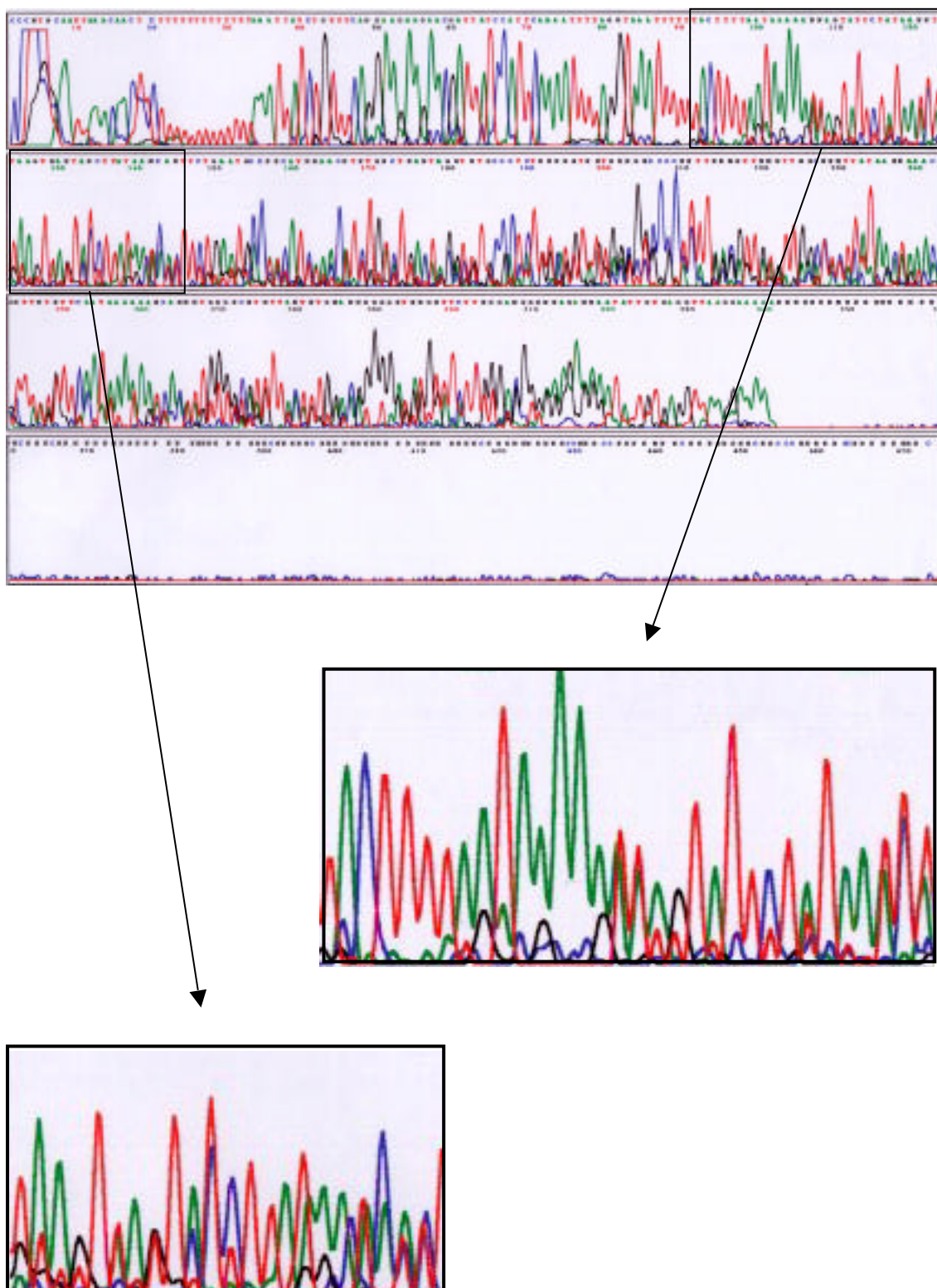


Fig 40: cromatograma obtingut de la seqüenciació *reverse* dels exons 15 i 16 de la mostra de SP 17Rb. En detall s'observa com el cromatograma normal s'altera a partir del punt en que es troba la deleció en heterozigosi. La seqüenciació en els dos sentits, *forward* i *reverse*, permet acotar aproximadament la deleció

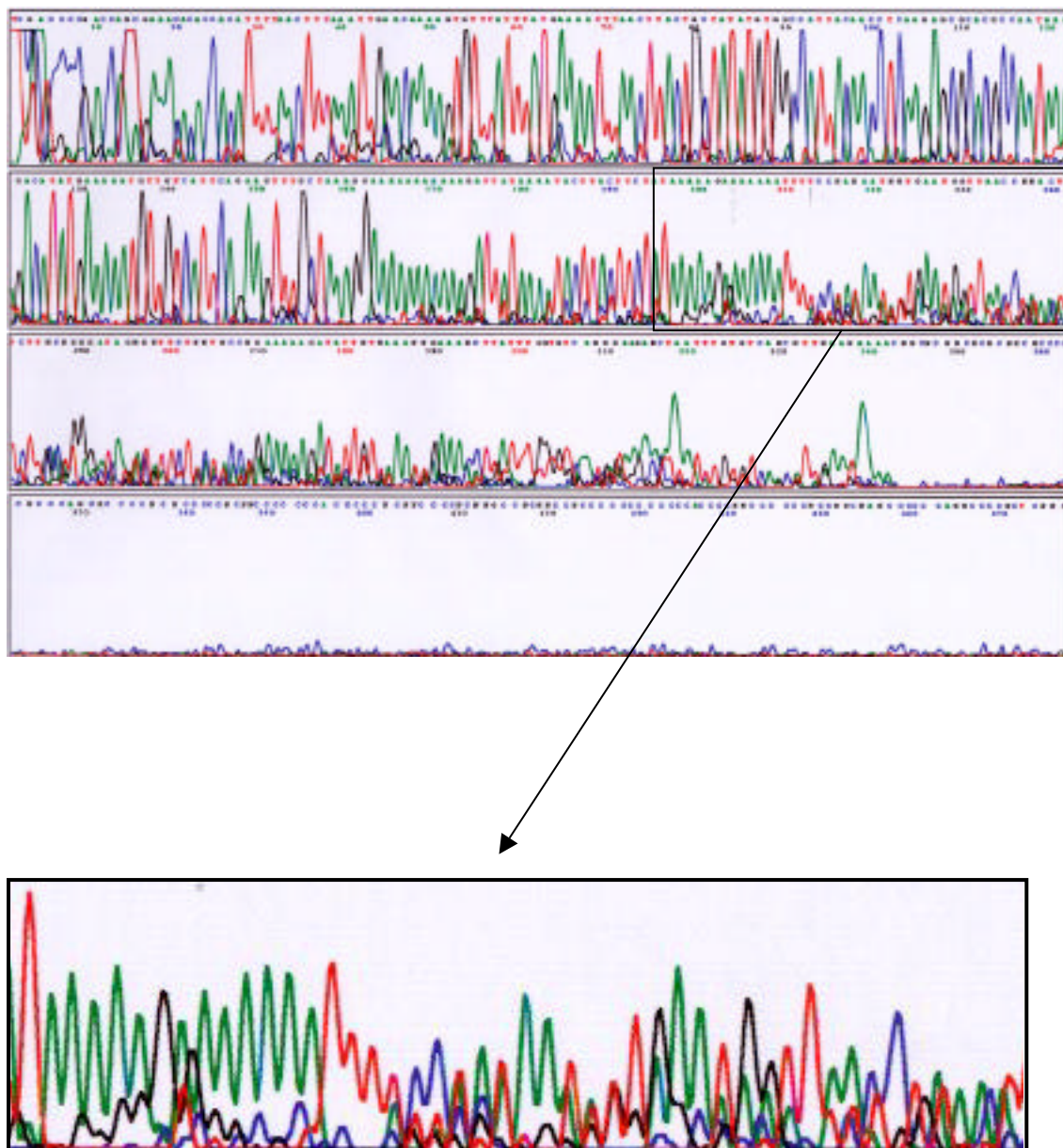


Fig 41: cromatograma obtingut de la seqüenciació *forward* dels exons 15 i 16 de la mostra de SP 37Rb. La seqüència obtinguda és normal

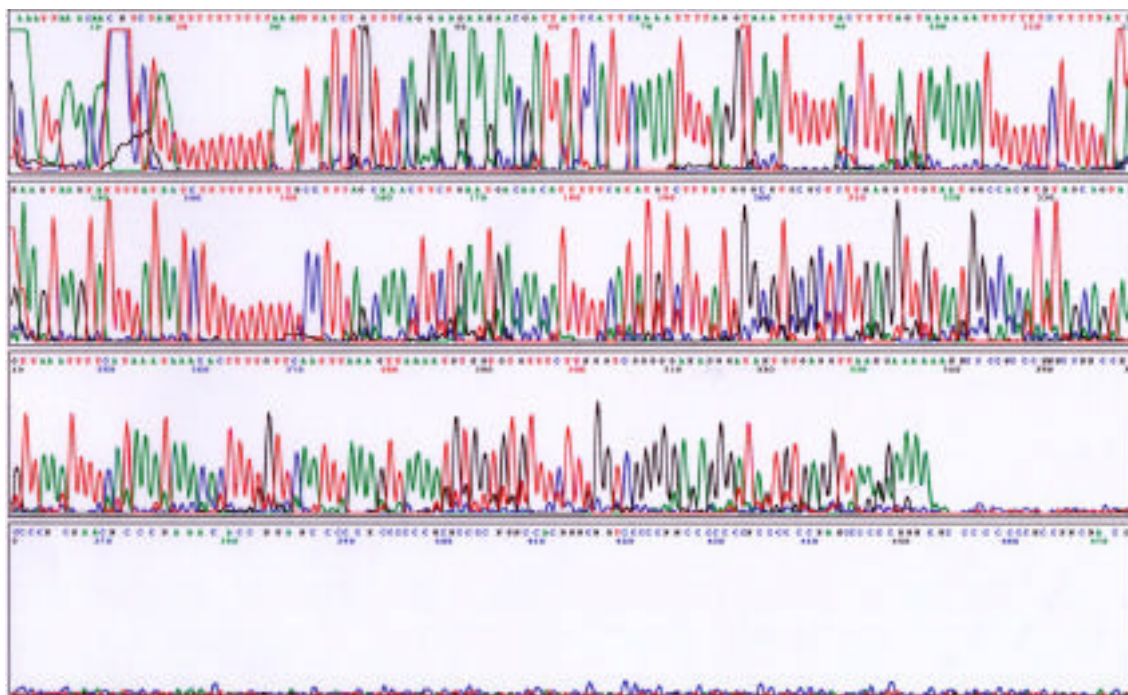
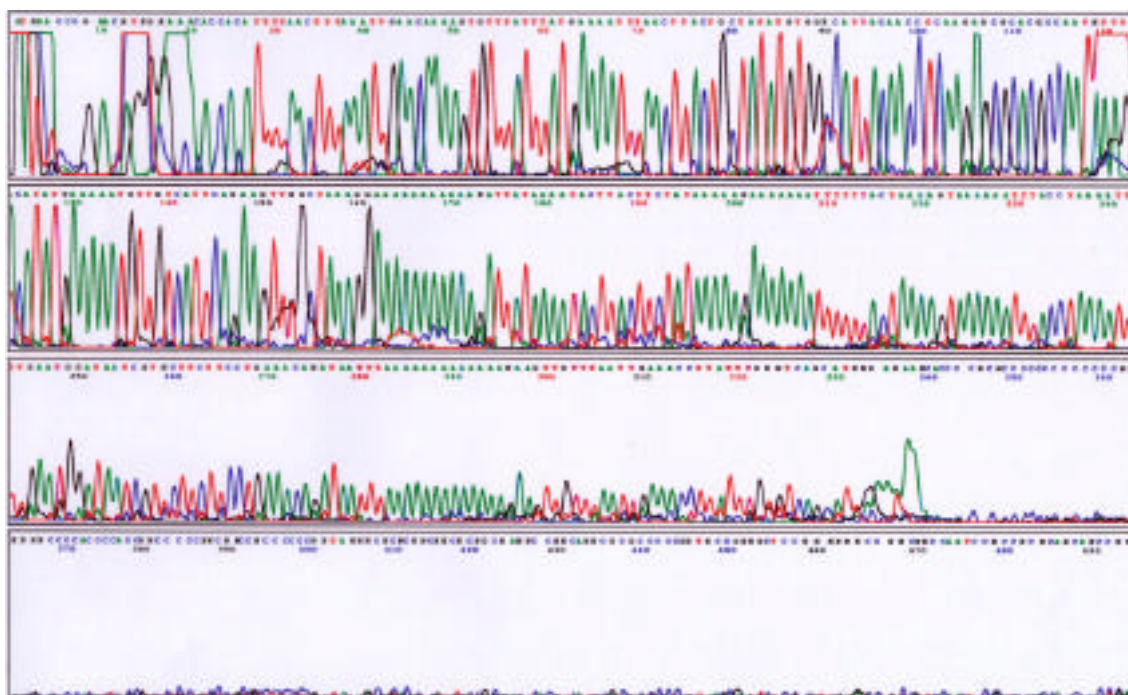


Fig 42: cromatograma obtingut de la seqüenciació *reverse* dels exons 15 i 16 de la mostra de SP 37Rb. La seqüència obtinguda és normal



3.3.3.3 Anàlisi de l'exó 19

Dels 60 pacients dels que es va obtenir mostra per a l'estudi molecular (taula 2, pàg 30), van ser analitzats 13 (taula 12, pàg 66), a partir de mostres de SP, de les quals 4 corresponen a pacients amb Rb BL i antecedents familiars positius de la malaltia, 2 corresponen a individus amb Rb BL i sense antecedents, i 7 a pacients enucleats dels que es disposava de mostra tumoral.

En tots els casos els patrons electroforètics obtinguts van ser normals.

3.3.3.4 Anàlisi de l'exó 20

Dels 60 individus afectes dels que es va obtenir mostra per a l'estudi molecular (taula 2, pàg 30) van ser analitzats un total de 39, a partir de mostres de SP (taula 12, pàg 66) corresponents a:

- 26 individus sense antecedents familiars de la malaltia, dels quals 13 presentaven Rb BL, i 13 Rb UL
- 11 pacients procedents de famílies amb al menys dos membres afectes, dels quals 9 presentaven afectació BL, i 2 afectació UL
- 2 individus normals (45G, i 74P), germana i pare de nens amb Rb

D'altra banda es van analitzar 9 mostres procedents de biòpsies tumorals.

Les mostres de SP i biòpsia tumoral del pacient 109Rb, amb Rb UL sense antecedents familiars, presentaren una migració anòmala en gels de SSCP detectats amb radioactivitat (fig 43), i normal en els gels detectats amb tinció amb nitrat de plata. La mostra de SP del pacient 64Rb, amb Rb BL, sense antecedents familiars va presentar migració anòmala en gel de SSCP detectat amb nitrat de plata (fig 44). Mitjançant seqüenciació es va detectar en aquests pacients la presència d'una variant intrònica en heterozigosi, consistent en una transició de A a G a l'intró 19, en posició -77 (figs 45 i 46). Es va seqüenciar també la mostra 33Rb, amb patró electroforètic normal, i no va presentar la transició (figs 47 i 48).

Fig 43: gel de SSCP en el que s'observa la migració anòmala de la mostra de SP del pacient 109Rb



↑
109Rb

Fig 44: gel de SSCP en el que s'observa la migració anòmala de la mostra de SP del pacient 64Rb



↑
64Rb

Figura 45: cromatograma obtingut de la seqüenciació *forward* de l'exó 20 de la mostra de SP 109Rb. En detall s'observa la transició en heterozigosi

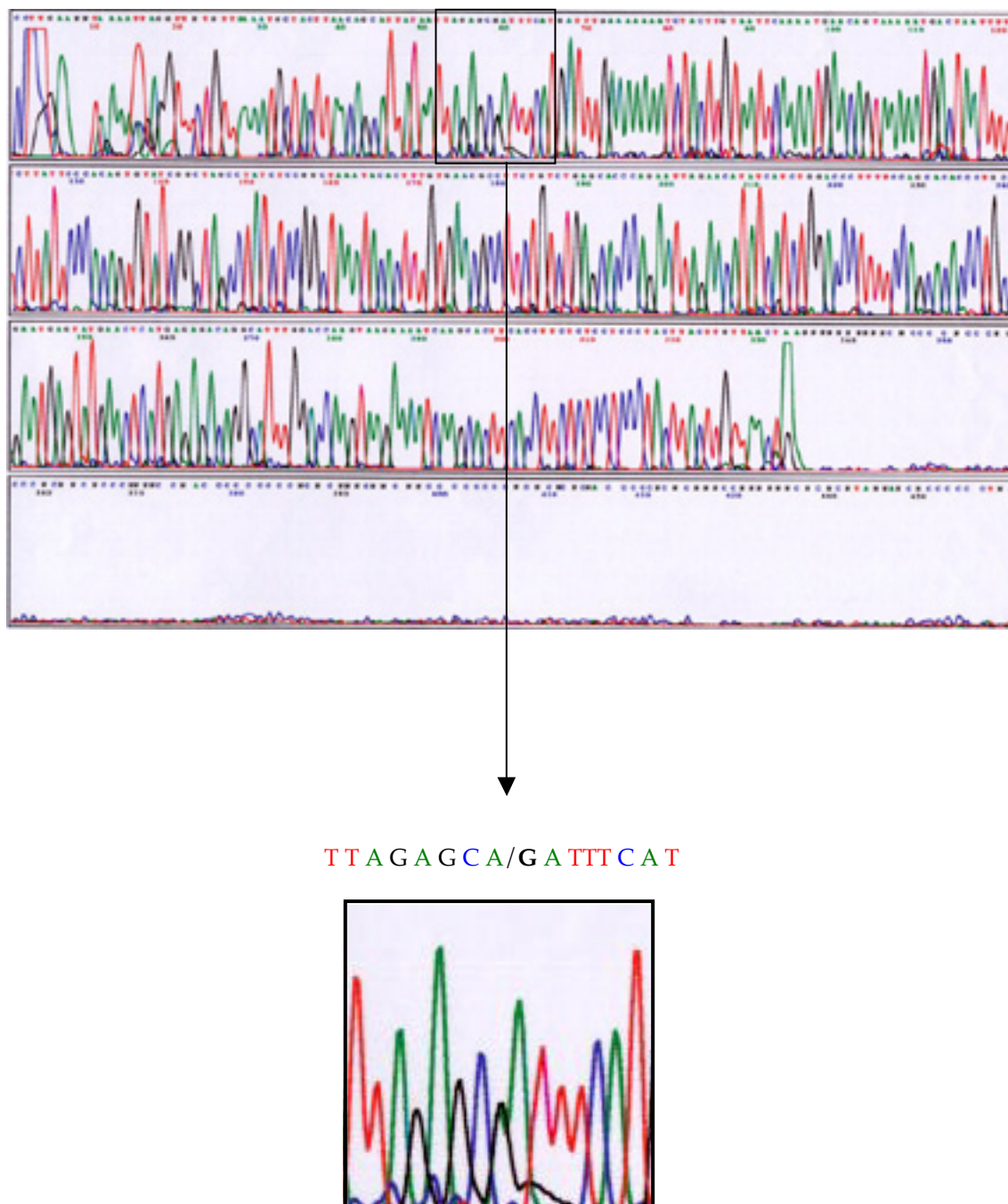
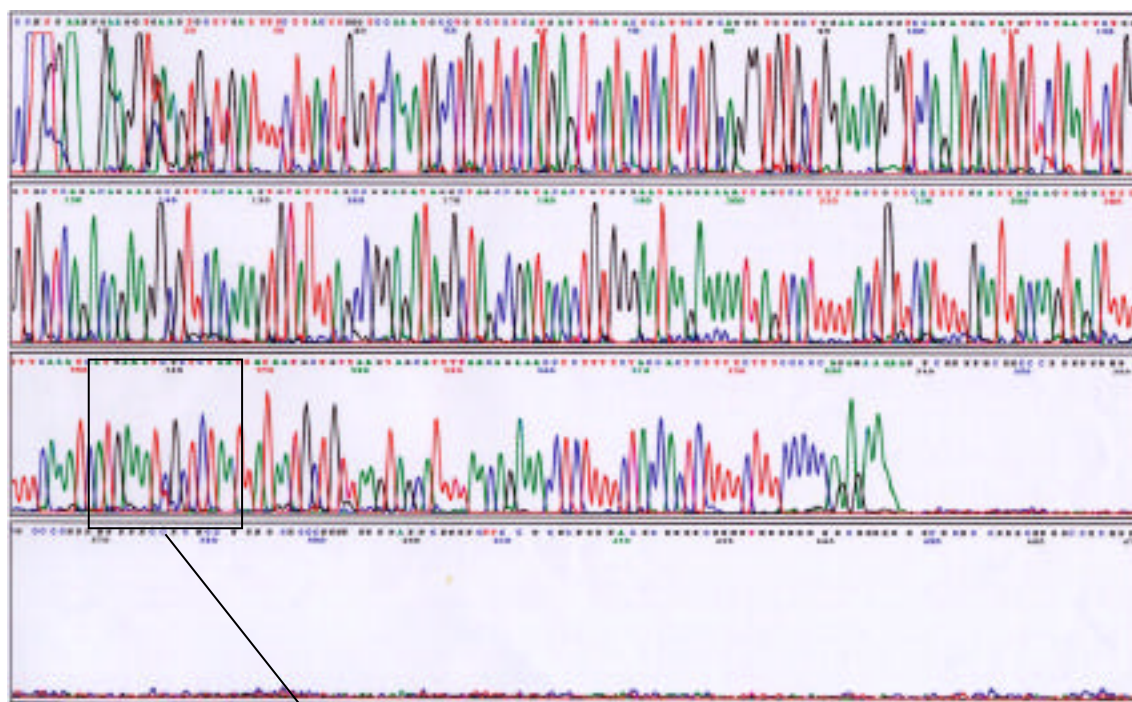


Figura 46: cromatograma obtingut de la seqüenciació *reverse* de l'exó 20 de la mostra de SP 109Rb. En detall s'observa la transició en heterozigosi



ATGAAA T T / C G CTCTCC

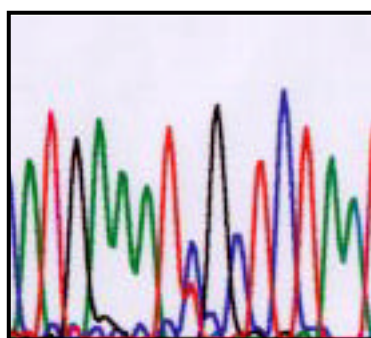
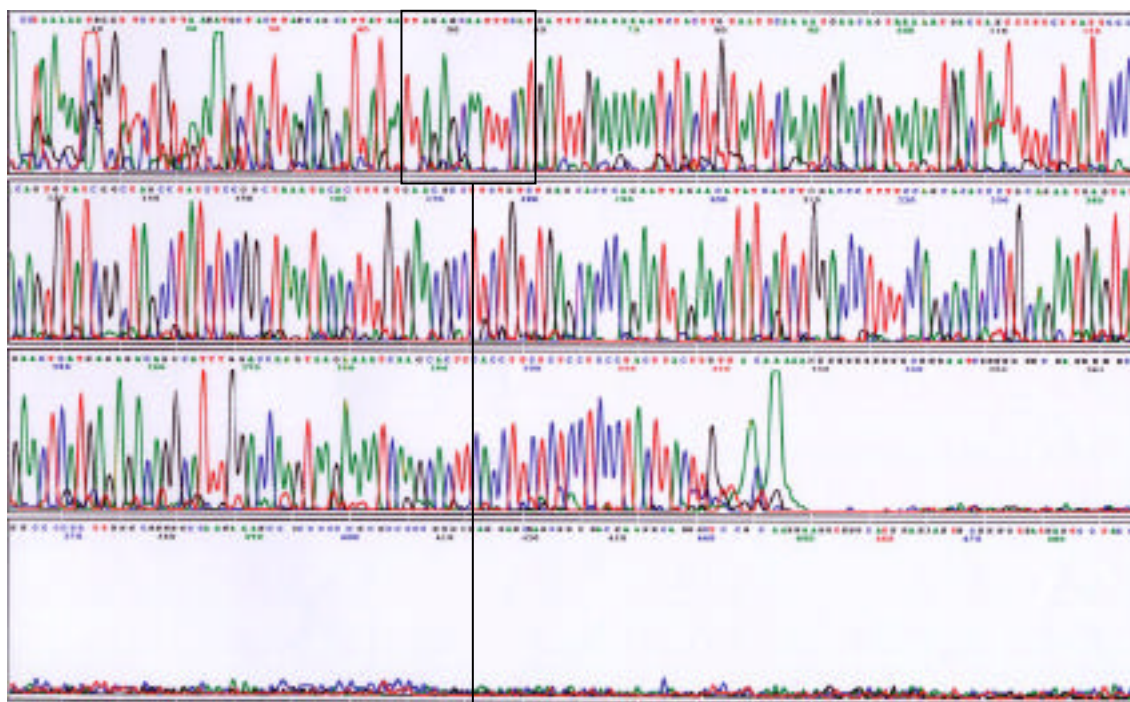


Figura 47: cromatograma obtingut de la seqüenciació *forward* de l'exó 20 de la mostra de SP 33Rb. En detall s'observa que no s'ha produït la transició



TTAGAGC AA TTTCAT

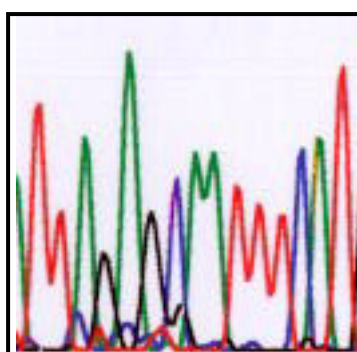
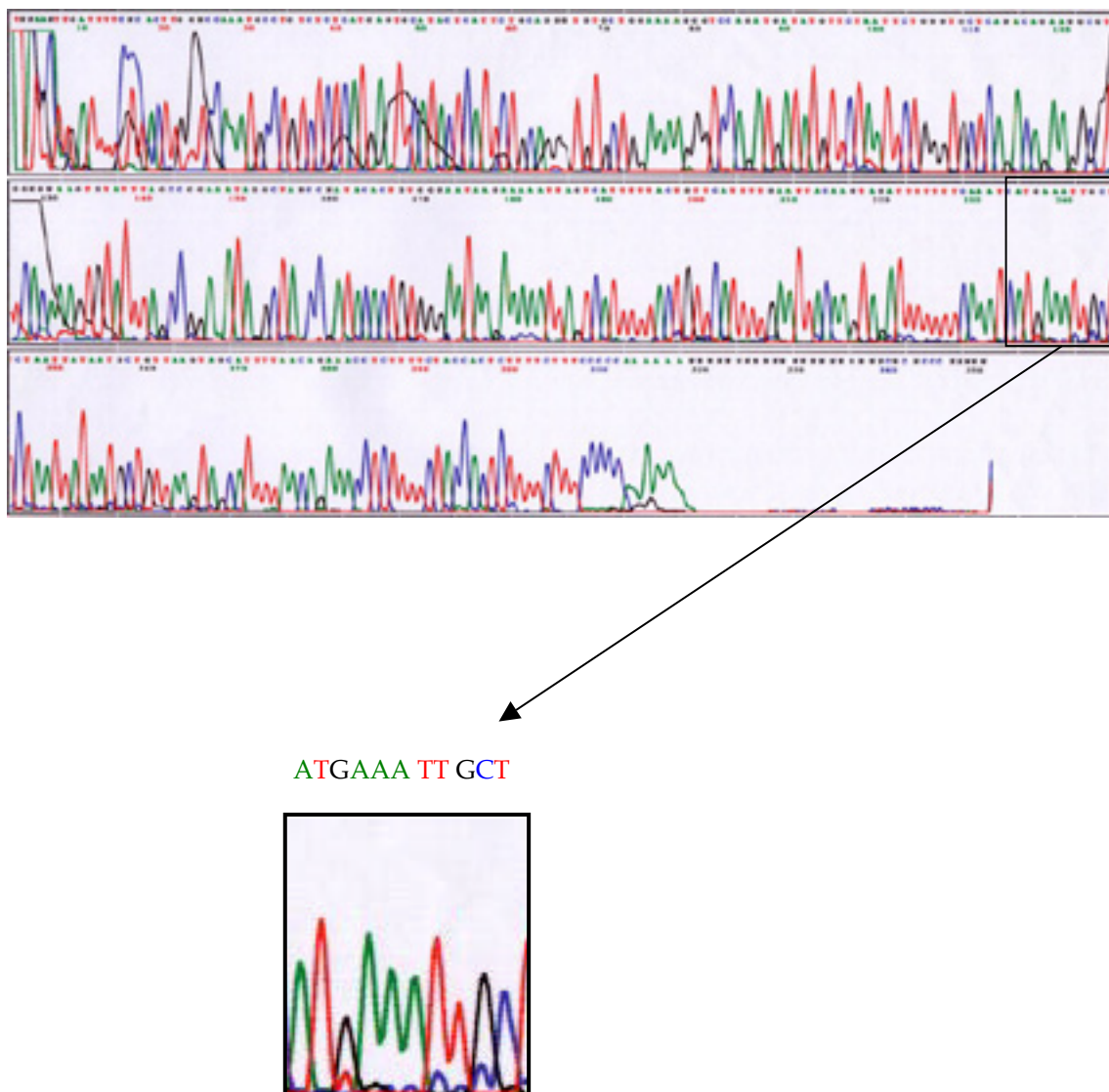


Figura 48: cromatograma obtingut de la seqüenciació *reverse* de l'exó 20 de la mostra de SP 33Rb. En detall s'observa que no s'ha produït la transició



3.3.3.5 Anàlisi de l'exó 23

Dels 60 pacients dels que es va obtenir mostra per a l'estudi molecular (taula 2, pàg 30), van ser analitzats 11 (taula 12, pàg 66), a partir de mostres de SP, de les quals 3 corresponen a pacients amb Rb BL i antecedents familiars positius de la malaltia, 1 a un individu amb Rb BL i sense antecedents, i 7 a pacients enucleats dels que es disposava de mostra tumoral.

En tots els casos els patrons electroforètics van ser normals.