

## 4. DISCUSSIÓ

---

## 4.1 ESTUDI CITOGENÈTIC

La freqüència de pacients portadors de reorganitzacions visibles que afecten la banda 13q14 és de l'ordre del 10% (Turleau *et al*, 1985). A la nostra sèrie, aquest percentatge ha estat inferior (4.16%), el que pot haver estat degut al tamany de la mostra.

Aproximadament del 4 al 5% dels pacients amb Retinoblastoma són portadors de delecions 13q14 constitucionals (Cowell *et al*, 1986, Cowell *et al*, 1987b Cowell, 1988). Entre els nostres 48 pacients estudiats per citogenètica, s'ha detectat la delecio constitucional afectant la banda 13q14 en un cas (pacient 4Rb), el que representa el 2,08% del total. Aquest pacient manifesta la malaltia de forma UL, i no presenta antecedents familiars. La literatura recull una sèrie de casos en que portadors de delecions 13q14 pateixen únicament tumors UL i UF ( Matsunaga 1980, Strong *et al*, 1981, Dryja *et al*, 1984, Cowell, 1988), d'altres presenten un tumor en un ull i un retinoma a l'altre (Keith *and* Webb, 1985), i alguns mai desenvolupen la malaltia (Cowell, 1988, Fukushima *et al*, 1987). Una possible explicació dels fenotips moderats en pacients portadors de delecions, seria el fet que les delecions exposessin gens deleteris pel creixement del tumor (Cowell i Hogg, 1992). Sembla que l'edat d'aparició de tumors és, en pacients amb anomalies del cromosoma 13, més tardana que en els portadors de mutacions puntuals (Ejima *et al*, 1982). El pacient 4Rb va ser diagnosticat a l'edat de 21 mesos, que podem considerar tardana.

Tot i que quan es donen delecions que afecten a a la regió 13q14, el Rb va associat a diferents anomalies congènites (Stallard, 1962, Lele *et al*, 1963), com retard mental, microcefàlia, hipertelorisme i d'altres (Cowell, 1988), sembla ser que aquestes són més freqüents quan les delecions són de gran mida (Baud *et al*, 1999), mentre que quan aquestes afecten a subbandes dins de 13q14 el Rb és l'única manifestació fenotípica evident (Cowell *et al*, 1989). El pacient 4Rb presentava, a més d'un Rb UL, la síndrome de Noonan, amb trets característics com estenosi pulmonar, criptorquídia, implantació baixa del cabell i mamil·les separades, no havent-hi antecedents familiars d'aquesta síndrome. La regió crítica per la síndrome de Noonan es localitza en el braç llarg del cromosoma 12, a la regió 12q24.2-q24.31 (Brady *et al*, 1997), i, segons el nostre coneixement, no s'ha descrit cap cas amb aquesta síndrome associada al Rb.

Els individus amb predisposició al Rb poden ser portadors de translocacions cromosòmiques en les que un punt de trencament afecti la banda 13q14. Aquestes alteracions es troben descrites a la literatura amb una freqüència inferior a la de pacients portadors de delecions (Turleau *et al*, 1985). En alguns casos l'herència d'una reorganització desequilibrada té com a conseqüència la pèrdua de la regió 13q14 (Riccardi *et al*, 1979, Rivera *et al*, 1981, Strong *et al*, 1981, Turleau *et al*, 1983, Turleau *et al*, 1985, Calzolari *et al*, 1987). A la nostra sèrie, una pacient (33Rb) amb Rb BL, diagnosticada als 13 mesos, i sense antecedents familiars de la malaltia, va presentar un cariotip 46,XX,t(5;13)(q22;q14). Tot i el caràcter aparentment equilibrat de la reorganització, i donat que és *de novo*, no podem descartar que aquesta hagi provocat la interrupció del gen RB1 (Higgins *et al*, 1989, Mitchell and Cowell, 1989, Blanquet *et al*, 1991), o bé una petita deleció submicroscòpica (Mitchell and Cowell, 1989). Qualsevol d'aquests esdeveniments resulten indetectables per citogenètica, i justificarien el fenotip de la pacient (Triviño *et al*, 1997).

Les anomalies diagnosticades han estat detectades en SP, i ja que els pacients són portadors de forma constitucional, podem considerar-les com l'esdeveniment tumorogènic primari. El diagnòstic genètic confirma en aquests dos casos el caràcter hereditari de la malaltia, que ja podem inferir del fenotip de la pacient 33Rb, per la seva afectació BL, però no del pacient 4Rb, amb una tumoració UL. L'estudi es pot oferir pel diagnòstic prenatal de la descendència d'aquests pacients.

## 4.2 ESTUDI PER FISH

L'eficiència de la sonda utilitzada, i la resolució del microscopi, van permetre valorar els resultats de 15 dels 22 pacients estudiats. Un d'aquests pacients, (111Rb, taula 2, pàg 30), amb Rb UL esporàdic, es diferencia de forma significativa del grup control, pel que el considerem com a portador d'una deleció en el locus RB1. Ja que la majoria de cèl·lules analitzades van mostrar dos senyals d'hibridació, la deleció es trobaria en mosaic. S'han descrit diferents casos de delecions en mosaic, detectades per citogenètica, en pacients amb Rb esporàdic, tant BL com UL (Motegi, 1982, Motegui and Minoga, 1984). Altres autors, han detectat mitjançant tècniques moleculars, diferents mutacions en mosaic (Greger *et al*, 1990, Munier *et al*, 1998, Sippel *et al*, 1998), el que vindria a

recolzar la hipòtesi de que alguns Rb esporàdics hereditaris es desenvolupen com a conseqüència de mutacions postzigòtiques. Munier i col·laboradors (1998) suggereixen que el mosaïcisme somàtic redueix la susceptibilitat a desenvolupar tumors, fet que justifica l'afectació UL del pacient 111Rb.

Els pacients 14Rb i 102Rb, ambdós amb Rb BL esporàdic, van presentar una freqüència de metafases amb un senyal superior a la mitjana de la població d'afectes estudiada. Els seus intervals de confiança es solapaven però amb el de la població control. L'estudi d'un major nombre de cèl·lules reduiria els intervals de confiança i l'error estadístic per individu, incrementant-se així la fiabilitat de l'estudi.

La resolució de la tècnica de FISH té un ordre de magnitud superior al que es pot obtenir amb els mètodes de bandeig cromosòmic (Kallioniemi *et al*, 1992), i ha permès confirmar la implicació del locus RB1 en la translocació (5;13) detectada per citogenètica, de la pacient 33Rb, amb Rb BL esporàdic

### 4.3 ANÀLISI DE LLIGAMENT

La utilitat d'un marcador de DNA per l'anàlisi de lligament, ve determinada per la seva freqüència de recombinació, i per l'índex d'heterozigositat. Per tal de poder minimitzar els problemes deguts a la recombinació, és convenient utilitzar marcadors intragènics. El gen RB1 ocupa una regió del genoma d'aproximadament 200Kb, aquesta distància representa uns 0,2 centimorgan i, per tant, la freqüència de recombinació és baixa. De fet, no s'han descrit casos de recombinació entre marcadors intragènics de RB1 i el fenotip afecte. En qualsevol cas, i ja que sembla que les mutacions que afecten a RB1 es poden donar en qualsevol punt del gen, aquest risc es redueix encara més si els pacients són informatius per dos loci distants, com el de BamHI a l'intró 1 i Rb1.20 a l'intró 20.

Cal, d'altra banda, utilitzar marcadors amb un nombre d'al·lels, i un índex d'heterozigositat que permeti poder distingir entre diferents individus amb una elevada probabilitat. El mètode de detecció dels marcadors ha de ser senzill, per tal de poder-se aplicar en un protocol de diagnòstic

### 4.3.1 Consideracions tècniques

Les condicions d'amplificació i detecció dels diferents marcadors polimòrfics van ser modificades respecte a les descrites a la literatura, per tal d'optimitzar-les al nostre laboratori. Cal destacar algunes consideracions referents als marcadors Rb1.20 i VNTR16.

Donat que el marcador Rb1.20 pot presentar molts al·lels, que poden diferir en un únic pb, resulta molt difícil comparar els resultats observats en diferents gels d'electroforesi. D'altra banda no era el nostre objectiu realitzar un estudi de freqüència al·lèlica poblacional, si no valorar la utilitat diagnòstica del Rb1.20 per les nostres famílies. És per tot això que no es van comparar els haplotips de les diferents famílies entre ells, per tal de determinar el diferent nombre d'al·lels detectats.

Degut a la gran mida del *core repeat* del VNTR descrit per Wiggs i col·laboradors (1988), que és de aproximadament 50pb, i aplicant la metodologia descrita per Scharf i col·laboradors (1992), hauria de ser relativament senzill identificar els diferents al·lels mitjançant electroforesi en agarosa, i poder distingir al·lels que difereixin en una única repetició. Cal tenir en compte, però, alguns aspectes a l'hora d'utilitzar aquest marcador. Va ser necessari optimitzar la PCR, especialment pel que fa al nombre de cicles, i a la quantitat inicial de DNA per tal d'evitar problemes com els deguts a l'efecte *ladder*, consistent en l'aparició de múltiples fragments inespecífics. Tot i això, no vam poder evitar que aquesta amplificació inespecífica fos present en ocasions, dificultant la interpretació dels resultats, i és per això que aquest marcador polimòrfic no va ser utilitzat en el diagnòstic de les dues famílies AV i AX. Una possible solució als problemes que presenta l'ús d'aquest marcador seria potser la utilització d'un parell d'encebadors diferent.

Scharf i col·laboradors (1992) utilitzaren una sonda no isotòpica per tal de facilitar la detecció del producte d'amplificació, però aquesta opció fa la utilització del VNTR16 tècnicament més complicada, i retarda l'obtenció de resultats.

### 4.3.2 Anàlisi de lligament de la família G

Els marcadors BamHI, XbaI i Tth 111 I no són útils pel diagnòstic genètic de cap membre de la **família G**, ni dels seus descendents, donat que tots els individus estudiats van presentar un haplotip homozigot 2/2.

El marcador Rb1.20 va resultar informatiu, i l'herència del Rb va lligada a la de l'al·lel 3 patern. Els descendents de I-1 (21PRb) i I-2 (22M) amb haplotip 1/2 o 1/4 seran normals, i els 2/3 o 3/4 portadors. Els possibles descendents de II-2 (23Rb) amb l'al·lel 3 matern seran portadors, i els que heretin l'al·lel 2 normals.

Tot i que es va intentar utilitzar el polimorfisme VNTR16 en l'estudi de la **família G**, no es va aconseguir una amplificació favorable.

### 4.3.3 Anàlisi de lligament de la família Q

La utilització del marcador BamHI permet el diagnòstic de la descendència dels membres I-1 (52P) i I-2 (53MRb), ja que l'herència del Rb va lligada a l'al·lel 1 matern, de forma que els individus 1/2 serien portadors. No va ser possible l'estudi de II-1 (54G), al no disposar de mostra, però cal esperar que presenti un haplotip 2/2. En cas de presentar haplotip 1/2, es tractaria d'un portador no afecte, inclòs dins del 10% de no penetrància descrit.

El marcador XbaI no és informatiu per aquesta família, ja que els dos membres afectes són homozigots 1/1

El marcador Tth 111 I no és informatiu, donat que tots els membres estudiats van presentar el mateix haplotip (1/2). Aquesta situació no canviaria en cas de ser possible l'estudi de II-1, ja que hem de tenir en consideració el fenomen de la penetrància incompleta.

El marcador Rb1.20 és informatiu per aquesta família. Els descendents de I-1 i I-2 amb haplotip 1/2 o 2/3 seran normals, i els 1/3 o 3/3 portadors, ja que l'al·lel mutat de RB1 va lligat al 3. Respecte a la possible descendència de II-2 (55Rb), seran normals els que heretin l'al·lel 1, i portadors els que heretin l'al·lel 3.

El marcador VNTR16 és informatiu, i la predisposició a la malaltia s'hereta conjuntament amb l'al·lel 1, de procedència materna, de forma que els fills de I-1 i I-2 amb haplotip 2/2 o 2/3 seran normals, i els que presentin haplotip 1/2 o

1/3 seran portadors. La utilització d'aquest marcador és així mateix potencialment útil pel diagnòstic de la descendència de II-2.

#### **4.3.4 Anàlisi de lligament de la família S**

Tots els individus estudiats van presentar haplotip 1/2 pels marcadors BamHI i XbaI. No és possible utilitzar aquests marcadors en el diagnòstic de no ampliar-se l'estudi amb mostres d'altres membres de la família. En qualsevol cas, de poder-se lligar l'herència de la mutació a la dels marcadors, únicament seria possible determinar si descendents homozigots de II-3 (60MRb) i II-4 (59P) són portadors o no, però no seria possible diferenciar els heterozigots, que podrien ser normals o portadors. Els marcadors serien potencialment útils per la descendència de III-1 (61Rb).

El marcador Tth 111 I no és informatiu per aquesta família, ja que tots els membres estudiats van presentar l'haplotip homozigot 2/2.

Els marcadors Rb1.20 i VNTR16 són informatius, i l'herència de la malaltia va lligada als al·lels 3 i 2 materns, respectivament.

#### **4.3.5 Anàlisi de lligament de la família Z**

Els marcadors BamHI, XbaI i VNTR16 són parcialment informatius. L'al·lel mutat de RB1 segrega amb un dels al·lels 2 materns. Donat que I-2 (78MRb) és homozigota no poden utilitzar-se els marcadors en el diagnòstic de la seva descendència. Sí serien, en canvi, potencialment útils en el diagnòstic de la descendència de II-1 (79Rb).

El marcador Tth 111 I no és informatiu per aquesta família, ja que tots els membres estudiats van presentar haplotip homozigot 2/2.

El marcador Rb1.20 és parcialment informatiu. La predisposició al Rb segrega amb l'al·lel 1 matern, pel que els descendents de I-1 (77P) i I-2 amb l'haplotip 1/1 seran portadors. L'individu II-1 és homozigot 1/1, pel que no es podrà utilitzar aquest marcador pel diagnòstic de la seva possible descendència.

### 4.3.6 Anàlisi de lligament de la família AN

Els marcadors BamHI, XbaI i VNTR16 són informatius, i la predisposició al Rb va lligada a l'herència de l'al·lel 1 patern, de forma que la descendència dels membres I-1 (103PRb) i I-2 (104M) amb haplotip 1/2 serà portadora. L'estudi és potencialment útil per fills de II-1 (105Rb) o II-2 (106Rb).

El marcador Tth 111 I no és informatiu, ja que tots els individus estudiats van presentar un haplotip 2/2.

El marcador Rb1.20 és informatiu, i la predisposició al Rb s'hereta amb l'al·lel 2 patern, per tant, els descendents de I-1 i de I-2 amb haplotip 1/2 o 2/3 seran portadors. Aquesta informació és potencialment útil pel diagnòstic de la descendència de II-1 o II-2.

### 4.3.7 Anàlisi de lligament de la família AV

El marcador BamHI és informatiu, i va permetre confirmar en aquesta família la condició de portadora assintomàtica de I-8 (115M) i de no portadora de II-5 (117), que en el moment de l'estudi tenia una edat de 14 mesos. L'edat d'aquesta pacient, i els seus antecedents familiars farien considerar-la com a pacient de risc, i en canvi el diagnòstic genètic revela que no ho és.

El marcador XbaI és parcialment informatiu, i la predisposició al Rb s'hereta juntament amb l'al·lel 1. Podem deduir que els descendents de I-7 (114P) i I-8 (115M) amb haplotip 1/1 seran portadors i els 2/2 normals, però no podem treure conclusions dels descendents 1/2. El marcador és potencialment útil pel diagnòstic dels descendents de I-9 (115TRb). La informativitat de XbaI per la resta de membres de la família seria en qualsevol cas limitada, éssent el cas idoni aquell en que els membres sans de la primera generació presentessin haplotip 2/2.

El marcador Tth 111 I és també parcialment informatiu, i l'herència de la malaltia va lligada a un dels al·lells 2 materns. Aquesta informació no pot utilitzar-se en el diagnòstic de la descendència de I-7 i I-8, al ser I-8 homozigota, però sí pot ser útil pels descendents de I-9 o II-6 (116Rb).

El marcador Rb1.20 és parcialment informatiu. La predisposició al Rb s'hereta lligada a l'al·lel 3 de procedència materna, pel que els descendents de I-7 i I-8

amb haplotip 1/3 o 3/3 seran portadors. L'estudi no és útil pel diagnòstic dels fills dels membres afectes estudiats, I-9 i II-6, al ser ambdós homozigots 3/3.

### 4.3.8 Anàlisi de lligament de la família AX

Els marcadors BamHI i Tth 111 I no són informatius, ja que els individus I-1 (118PRb), I-2 (119M), II1 (120Rb) i II-2 (121Rb) presenten haplotip homozigot 2/2.

El marcador XbaI és parcialment informatiu. L'al·lel mutat de RB1 s'hereta amb l'al·lel 2 patern, el que permet deduir que els descendents de I-1 i I-2 amb haplotip 2/2 seran portadors. Aquest marcador no resulta útil pel diagnòstic dels descendents de II-1 o II-2, al ser ambdós homozigots.

El marcador Rb1.20 és informatiu. La mutació segrega amb l'al·lel 3, d'origen patern, pel que pot utilitzar-se aquest marcador per diagnosticar als descendents de I-1 i I-2, i l'estudi pot ser útil tanmateix pel diagnòstic dels fills de II-1 o II-2. Assumint la possibilitat de que I-4 (118G2) podia ser un portador no afecte, donat que el seu haplotip és 2/3, es va utilitzar aquest marcador en el diagnòstic prenatal de II-3 (118G2.2), resultant no portador, al presentar l'haplotip 1/2. Desde el primer cas d'estudi prenatal en famílies afectes de Rb (Mitchell *et al*, 1988) s'ha realitzat l'estudi de lligament prenatal en diferents famílies (Onadim *et al*, 1990), i el seguiment clínic posterior ha confirmat el diagnòstic genètic (Onadim *et al*, 1992a).

### 4.3.9 Valoració global d'informativitat

Encara que el VNTR16 és el marcador amb el nombre d'al·lels i l'índex d'heterozigositat més elevat, no ha estat el més útil, degut als problemes associats a la interpretació dels resultats, comentats anteriorment. El polimorfisme més valuós pel diagnòstic ha estat el Rb1.20, informatiu en diferent grau per totes les famílies, i el menys útil el Tth 111 I (taula 13). Aquests resultats estan d'acord amb els esperats, tenint en compte els índex d'heterozigositat publicats per diferents autors (Vaughn *et al*, 1990, McGee *et al*, 1990, Bookstein *et al*, 1990a, Scharf *et al*, 1992, Brandt *et al*, 1992).

Taula 13: informativitat de tots els marcadors utilitzats, per cada família

|                  | G  | Q  | S   | Z  | AN | AV | AX | Total     |
|------------------|----|----|-----|----|----|----|----|-----------|
| <b>BamHI</b>     | NI | I  | NI* | PI | I  | I  | NI | 3 (42,8%) |
| <b>XbaI</b>      | NI | NI | NI* | PI | I  | PI | PI | 1 (28,5%) |
| <b>Tth 111 I</b> | NI | NI | NI  | NI | NI | PI | NI | 0         |
| <b>Rb1.20</b>    | I  | I  | I   | PI | I  | PI | I  | 5 (85,7%) |
| <b>VNTR16</b>    | NR | I  | I   | PI | I  | NE | NE | 3 (60%)   |

I: marcador informatiu per la primera generació d'afectes estudiada, la informativitat d'altres membres està condicionada per l'haplotip de les seves possibles parelles; NI: marcador no informatiu; NI\*: marcador no informatiu amb les mostres de que es disposa; PI: marcador parcialment informatiu: només útil per alguns membres de la família, o que no permet distingir en tots els casos els normals dels portadors; NR: família estudiada, de la que no s'ha obtingut resultat; NE: família no estudiada.

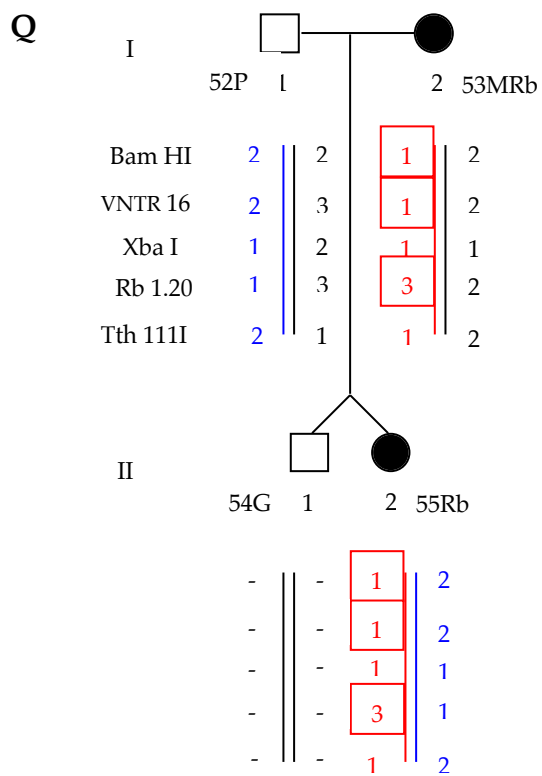
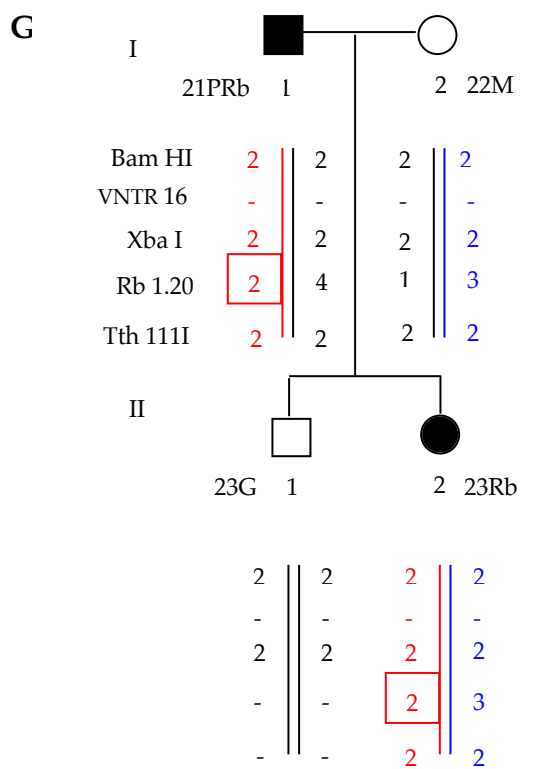
A banda de la informativitat de cada marcador concret, condicionada pel seu índex d'heterozigositat, hem de destacar la importància de l'ús combinat de diferents marcadors. Així, tot i que la majoria de les famílies estudiades a la nostra sèrie poden ésser diagnosticades emprant un únic marcador, el fet d'utilitzar-ne cinc, localitzats al llarg del gen RB1 (introns 1, 16, 17, 20 i 24) minimitza el risc d'error en el diagnòstic degut a una possible recombinació, i augmenta el control de seguretat sobre la manipulació de les mostres.

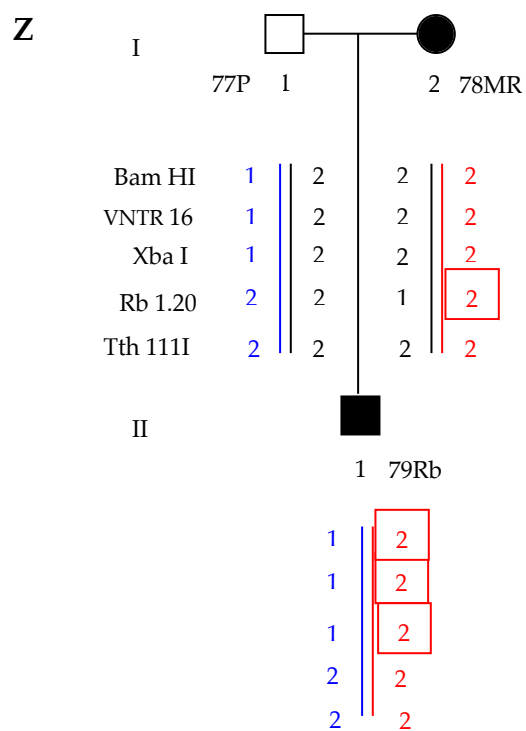
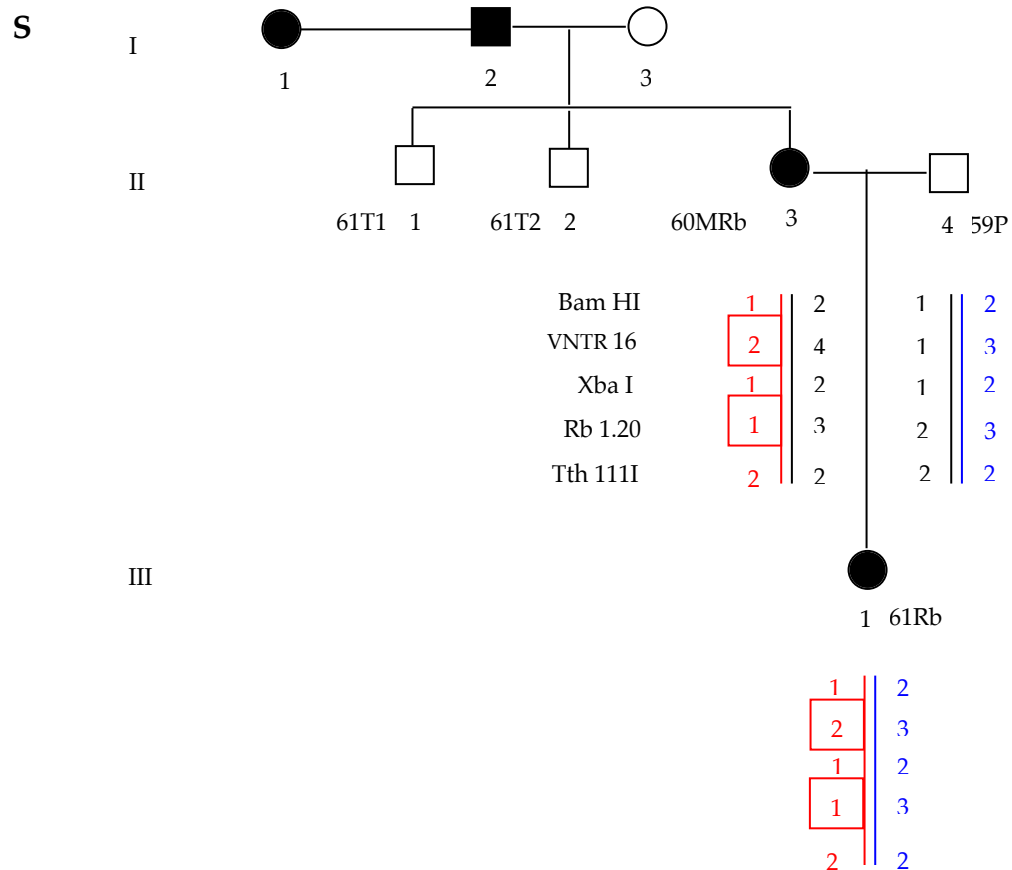
Els resultats obtinguts de l'anàlisi de lligament a partir dels cinc marcadors han permès, a les set famílies estudiades, valorar l'haplotip familiar, i determinar l'origen parental de cada al·lel del gen RB1. Per a realitzar aquesta determinació a cada família, han estat útils els marcadors informatius i els no informatius (fig 49).

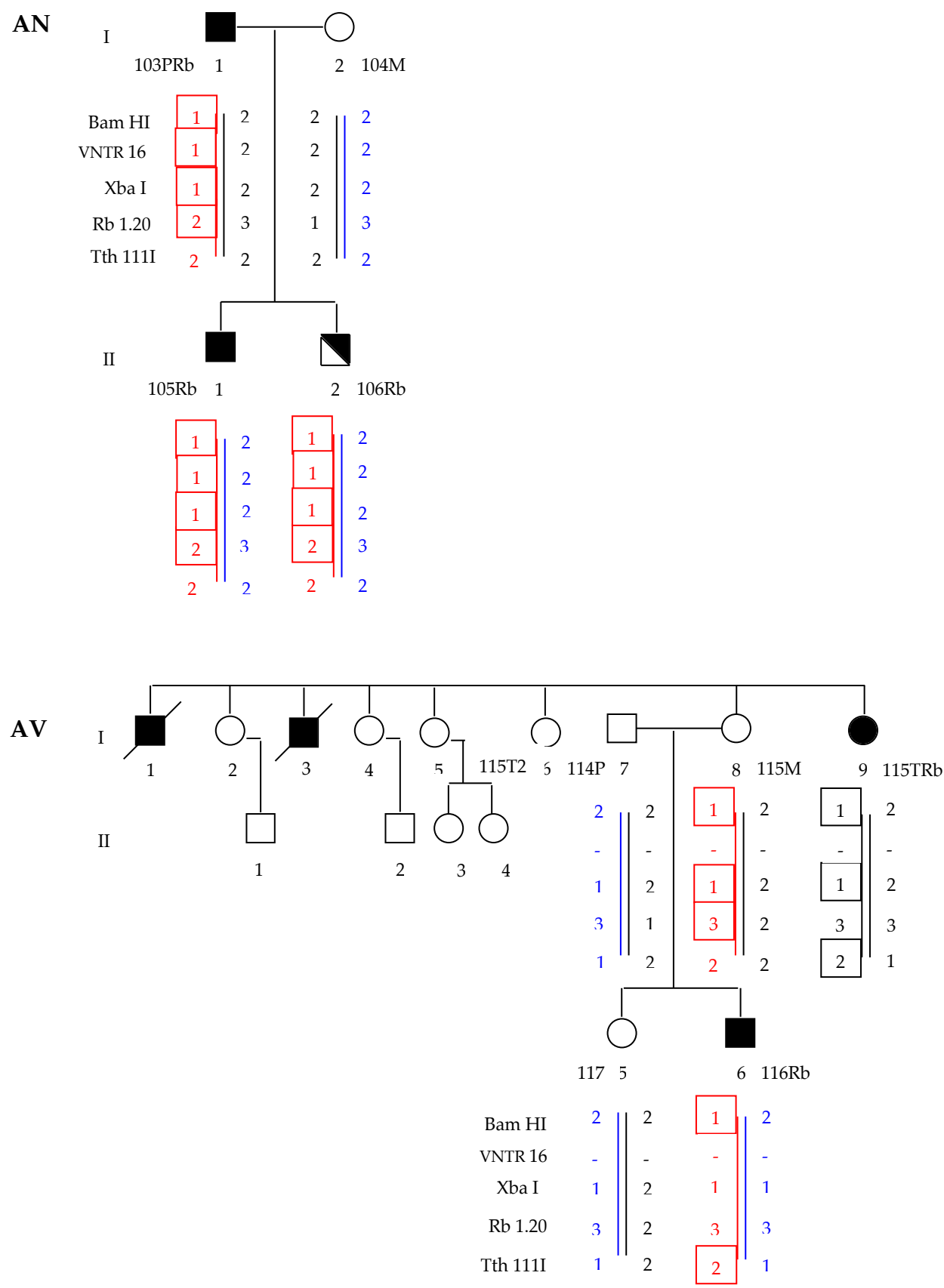
Dels resultats obtinguts destaca, no únicament la importància de triar diferents marcadors, distribuïts al llarg del gen, sinó també la de comptar amb mostres del màxim nombre de membres de cada família.

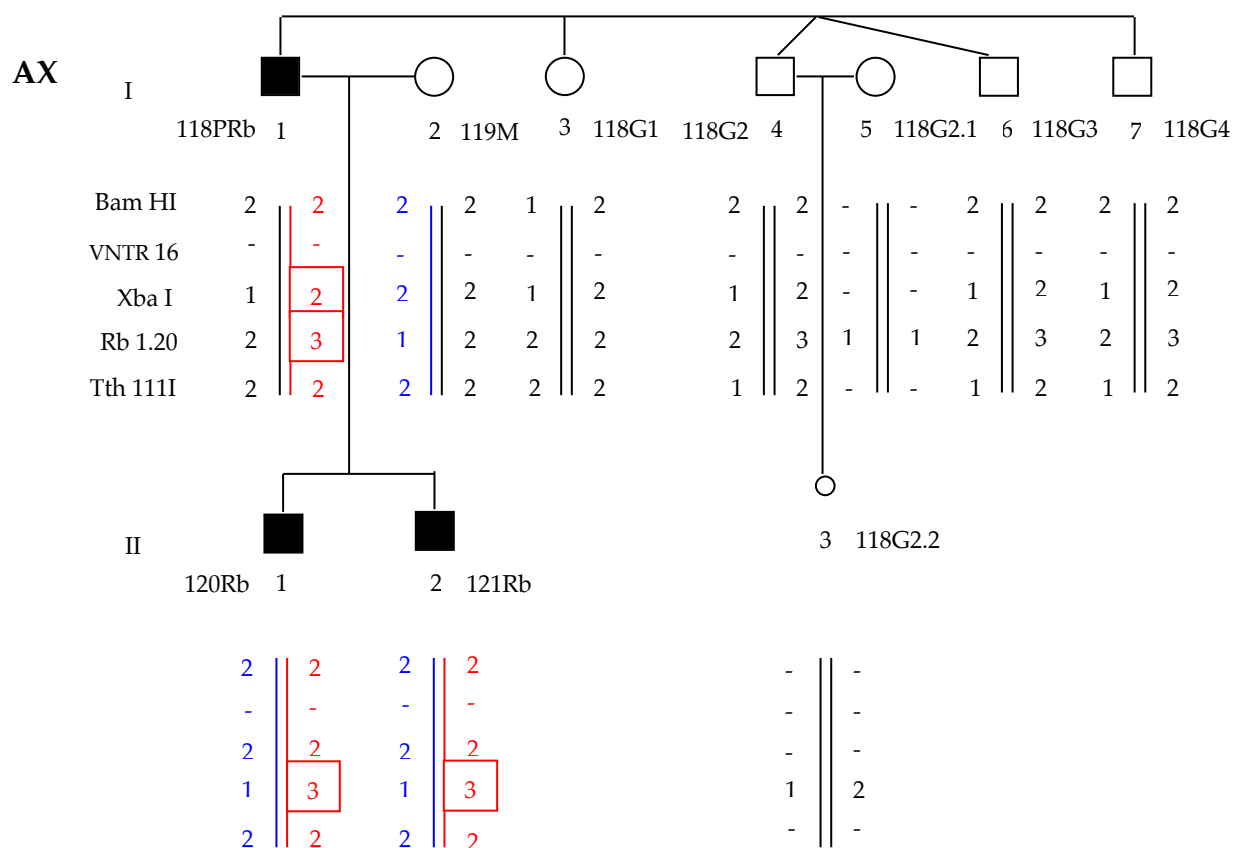
S'ha descrit a la bibliografia que entre el 5 i el 10% de les famílies mostren manca d'heterozigositat per tots els marcadors intragènics del gen RB1 disponibles, i en aquests casos es proposa com a alternativa la possible utilització de marcadors extragènics molt propers (Girardet *et al*, 1999).

Fig. 49: Valoració global d'informativitat.









En vermell, l'al·lel al que va lligada la malaltia, requadrats s'indiquen els resultats informatius per cada marcador

En blau, l'al·lel heretat del progenitor no portador

La distribució dels marcadors correspon a la que presenten al llarg del gen RB1 (BamHI, intró 1; VNTR16, intró 16; XbaI, intró 17, Rb1.20, intró 20, XbaI, intró 24)

## 4.4 DETECCIÓ DE MUTACIONS PER DIGESTIÓ AMB ENZIMS DE RESTRICCIÓ I POSTERIOR SEQÜENCIACIÓ

El codó CGA és un lloc de mutació recurrent en molts gens, inclòs el RB1 (Youssoufian *et al*, 1986, Yandell *et al*, 1989a, Krawczak *et al*, 1992), i la mutació puntual més comunment detectada en mostres de tumor de pacients amb Rb és la transició de C a T, preferentment en codons CGA (Cowell *et al*, 1994). El gen RB1 conté 14 codons CGA, i en alguns d'ells una transició de C a T altera una diana per un enzim de restricció.

Blanquet i col·laboradors (1994) van descriure per primera vegada tres mutacions constitucionals que afectaven a diferents pacients no emparentats. Dues d'aquestes mutacions consistien en transicions de C a T en codons CGA dels exons 8 i 18, i en ambdós casos es creaven noves dianes per enzims de restricció.

### 4.4.1 Estudi de l'exó 8

Les condicions utilitzades per digerir els fragments de 371pb obtinguts de la reacció d'amplificació, no van ser òptimes. El fragment amplificat conté una diana fixa per l'enzim Hph I, i en els casos en que es dona la mutació, es crea una nova diana per aquest enzim. Després de la digestió, s'observava en tots els casos la permanència de la banda de 371pb corresponent al fragment sense digerir, degut a que en la digestió directa de productes de PCR, els enzims de restricció no treballen en les seves condicions ideals. La mostra tumoral del pacient 110Rb, mostrava un patró de electroforètic corresponent a una mutació en heterozigosi (fig 19, pàg 90). Aquest patró és conseqüència, amb tota probabilitat d'un fenomen de digestió parcial, ja que de la seqüenciació es va obtenir un cromatograma compatible amb una mutació en homozigosi (figs 21 i 22, pàgs 92-93). Cal destacar, en aquest cas, la importància de la seqüenciació, per comprovar els resultats obtinguts de la digestió amb enzims de restricció.

La inactivació de les dues còpies de RB1 en tumors es dona en el 70 % dels casos per duplicació de la mutació inicial (Cavenee *et al*, 1983, Zhu *et al*, 1989). D'acord amb aquest fet, la transició de C a T, que té com a conseqüència la

creació d'un codó *stop* prematur, i la síntesi d'una proteïna truncada, és en aquest pacient el primer esdeveniment tumorogènic. Ja que la mutació no es troba en SP, podem considerar aquest cas com no hereditari. Aquest diagnòstic és compatible amb les característiques clíniques del pacient, que presenta un Rb UL aparentment UF, sense antecedents familiars, i d'aparició tardana. Tot i que els primers símptomes relacionats amb la malaltia es van detectar a l'edat de 4 anys, no es va diagnosticar el possible Rb fins que el pacient comptava amb 8 anys. Donada l'edat avançada i el fet de no trobar cèl·lules tumorals mitjançant paracentesi, el diagnòstic només va poder ser confirmat després de l'estudi anatomopatològic del globus ocular enucleat. Aquest estudi va permetre classificar al tumor com a molt diferenciat, donada la baixa densitat de cèl·lules en roseta observades (Mairal *et al*, 2000). Aquesta característica, així com la lenta progressió tumoral, fan pensar que la tumorogènesi es va iniciar en cèl·lules retinianes properes a la maduresa, el que reafirma el caràcter no hereditari de la malaltia. D'altra banda no s'ha observat l'aparició de nous focus tumorals a l'ull contralateral en revisions oftalmològiques periòdiques, fins l'edat de 12 anys.

#### 4.4.2 Estudi de l'exó 18

La mutació detectada en heterozigosi en la mostra de SP del pacient CPCRB provoca la síntesi d'una proteïna truncada no funcional. El fet que aquesta mutació sigui constitucional confirma el caràcter hereditari de la malaltia en aquest cas. Aquest diagnòstic està d'acord amb les característiques clíniques del pacient, que presenta afectació BL. És l'únic fill d'una parella sana, sense antecedents familiars de la malaltia, pel que cal pensar que la mutació s'ha produït *de novo*, no descartant-se la possibilitat de mosaïcisme en la línia germinal d'algun dels progenitors (Sippel *et al*, 1998).

#### 4.4.3 Valoració global

A la nostra sèrie han estat detectades transicions de C a T en codons CGA<sub>arg</sub> dels exons 8 i 18 en dos pacients (5%) dels 40 afectes estudiats, 26 amb Rb esporàdic UL o BL, i 14 amb Rb familiar, aquests últims corresponents a 8 famílies (taula 12 pag 66). Aquests resultats estan d'acord amb els obtinguts per Blanquet i col·laboradors (1994), que, després de l'anàlisi per SSCP i DGGE dels exons 8 i

18 van detectar la transició de forma constitucional en el 5,7% dels 175 pacients estudiats, amb Rb tant clínicament hereditari (esporàdic BL, esporàdic UL i MF, o familiar), com no hereditari (esporàdic UL i UF). Lohmann i col·laboradors (1996) van detectar aquest tipus de mutacions en el 40,8% de 71 pacients amb Rb clínicament hereditari, després d'un estudi mutacional dels 27 exons del gen RB1 mitjançant anàlisi d'heterodúplex, SSCP, o seqüenciació. En un estudi dels 14 codons CGA<sub>arg</sub> mitjançant digestió amb enzims de restricció, SSCP i seqüenciació, Cowell i col·laboradors (1994) van detectar la transició en el 16% dels 113 pacients amb Rb BL. En un treball similar en el que es van analitzar 8 dels 10 exons que contenen codons CGA<sub>arg</sub> mitjançant digestió amb enzims de restricció i SSCP, Mateu i col·laboradors (1997) van detectar la transició en 2 pacients (20%) entre 10 amb Rb BL. Pel que fa a la distribució d'aquestes alteracions, Lohmann i col·laboradors (1996) descriuen que els exons afectats preferentment, són el 5, seguit dels 8, 10, 11, 18, 23, el 15 i el 17, mentre que Cowell i col·laboradors (1994) troben alteracions preferentment a l'exó 8, seguit del 17, el 18, el 10 i el 23. Per últim, Mateu i col·laboradors (1997) troben la transició únicament en els exons 8 i 18. Curiosament, 7 de les 8 transicions detectades per Cowell i col·laboradors (1994) a l'exó 8, i 3 de les 4 trobades per Lohmann i col·laboradors (1996), afecten el codó 251, i només una en cada sèrie es localitza al codó 255, més freqüentment alterat en la sèrie de Mateu, a la de Blanquet, i a la nostra. Cal destacar que cap d'aquests autors ha detectat transicions als exons 1 i 27, aquest últim amb 2 codons CGA<sub>arg</sub>.

## 4.5 ANÀLISI DE MUTACIONS PER SSCP I SEQÜENCIACIÓ

Aproximadament un 40% dels afectes de Rb presenten la forma hereditària de la malaltia, però només un 10% del total dels pacients tenen antecedents familiars. Donat que la majoria de Rb hereditaris són conseqüència de mutacions *de novo*, és necessari identificar l'al·lel afecte per caracterització directa de la mutació.

El Rb hereditari es manifesta preferentment de forma BL, o UL MF, i alguns autors han aplicat diferents tècniques de detecció de mutacions a sèries de pacients amb aquestes manifestacions clíniques de la malaltia (Lohmann *et al*, 1996), o bé a pacients amb història familiar positiva (Hogg *et al*, 1992). Ara bé,

segons la revisió portada a terme per Vogel (1979), entre un 10 i un 12% dels pacients amb Rb UL esporàdic són portadors d'una mutació constitucional. Altres autors han obtingut percentatges similars a l'incloure aquests pacients en els seus estudis (Blanquet *et al*, 1995) i és per això que en el nostre treball s'ha aplicat l'estratègia de detecció de mutacions també a pacients amb Rb UL esporàdic.

### 4.5.1 Consideracions tècniques

En el present treball hem utilitzat com a mètode de cribatge la tècnica de SSCP, i la seqüenciació per a la caracterització de mutacions. La capacitat de detectar variacions en seqüències de DNA mitjançant la tècnica de SSCP es veu influenciada pels factors electroforètics en diferent grau (Teschauer *et al* 1996). Sembla que el tipus de mutació no té un paper determinant en la detectabilitat, i seria més important la localització de l'alteració, així com la mida del fragment analitzat, que té una influència determinant en la sensibilitat de la tècnica (Sheffield *et al*, 1993).

La taxa de migració de fragments de DNA de cadena senzilla en condicions no desnaturalitzants depèn de la conformació que adoptin aquestes cadenes en les condicions electroforètiques triades. És clara la influència d'aquestes condicions electroforètiques en la migració de fragments de cadena doble, i així, tant l'augment de la concentració d'acrilamida com de tampó, disminueixen la taxa de migració, que també es veu disminuïda per l'addició de components com el glicerol al 10%. Una disminució de la relació acrilamida/bisacrilamida també té un efecte reductor de la taxa de migració. No és possible, en canvi, fer una predicció fiable sobre quin serà el comportament dels fragments de cadena senzilla i per exemple, la migració d'aquestes cadenes pot ser més lenta o més ràpida que la de cadenes dobles d'identica longitud. Donat que s'ha descrit una ampla varietat de diferents mutacions en el gen RB1, en qualsevol localització, no ens va ser possible orientar l'optimització de la tècnica per a la detecció d'una mutació concreta, de manera que, per motius pràctics, es van triar les condicions de més àmplia aplicabilitat i reproduïbilitat.

Les condicions electroforètiques triades van mostrar ser aparentment reproduïbles en els diferents experiments, donat que vam aconseguir detectar un patró característic per cada exó. Cal destacar però, que en l'estudi de l'exó

20, una mostra va presentar un patró electroforètic anòmal, en un gel detectat amb nitrat de plata, i una altra mostra, amb patró anòmal detectat per marcatge radioactiu, va presentar patró normal quan es va detectar amb plata. Mitjançant seqüenciació es va caracteritzar la mateixa variant intrònica en ambdós pacients. Aquest fet sembla indicatiu de que l'efectivitat de la tècnica de SSCP pot veure's compromesa per factors electroforètics o ambientals difícilment controlables.

D'altra banda la metodologia utilitzada per a la digestió enzimàtica dels fragments a estudiar, i la seva desnaturalització, va resultar correcta, ja que les mostres problema van presentar un patró electroforètic lliure de les bandes degudes a digestió o desnaturalització parcials, éssent aquest fet important en la valoració dels resultats (Lohmann *et al*, 1996).

Les mostres amb patró de SSCP alterat no van correspondre en tots els casos a veritables alteracions de seqüència en els pacients estudiats. Pel que fa concretament a l'anàlisi dels exons 15 i 16, els cromatogrames obtinguts de la seqüenciació, van resultar en un principi ininterpretables, i indicatius de possibles errors d'amplificació durant el procés de PCR. Aquests errors van ser deguts a la presència d'una seqüència de 13 T, 15 bases després de l'extrem 3' de l'encebador 5X15, i a la utilització de la Taq polimerasa, que introdueix errors a la seqüència. Alguns autors han descrit la utilitat d'altres enzims, com la Vent polimerasa per l'amplificació d'aquestes seqüències (Lohmann *et al*, 1996). Després de realitzar novament la PCR utilitzant una polimerasa d'alta fidelitat (Pfu polimerasa), els cromatogrames obtinguts van ser correctes.

## 4.5.2 Valoració de les alteracions detectades

### 4.5.2.1 Exó 2

La inserció d'una A a l'exó 2 detectada en mostres de SP i de biopsia tumoral de la pacient 82Rb té com a conseqüència l'aparició d'un codó *stop* a l'exó 3 (codó 109), i el resultat d'aquesta mutació és la síntesi d'una proteïna truncada, no funcional. La mutació està flanquejada per repeticions curtes (seqüència normal: ATTAAGATACCAGATCATG; seqüència mutada: ATTAAGATAACCAAGATCATG). Diferents autors han observat deleccions flanquejades per repeticions curtes en pacients amb Rb (Lohmann *et al*, 1992,

Blanquet *et al*, 1993, Hogg *et al*, 1993). La presència constitucional de l'alteració, confirma el caràcter hereditari de la malaltia, i està d'acord amb les manifestacions clíniques, ja que la pacient presenta afectació BL, detectada a l'edat de 16 mesos. De l'observació dels cromatogrames obtinguts de la seqüenciació, deduïm que l'alteració es troba en heterozigosi en SP, i en homozigosi en tumor. Aquest fet està en consonància amb que la pèrdua d'heterozigositat es doni, en el 70% dels Rb, per duplicació de la mutació inicial (Cavenee *et al*, 1983, Zhu *et al*, 1989).

#### 4.5.2.2 Exons 15 i 16

La seqüenciació dels exons 15 i 16 de la mostra de SP del pacient 17Rb, amb Rb BL, va donar com a resultat un cromatograma compatible amb una deleció d'aproximadament 14pb a l'intró 15, en heterozigosi. Tot i que el cromatograma no va permetre determinar amb precisió la mida de la deleció, aquesta es va observar en un gel d'electroforesi. Mitjançant la utilització combinada dels marcadors de pes molecular FX174/Hinf I i FX174/Hae III es va poder determinar que s'extenia entre 9 i 15pb. Aquesta deleció es localitza a l'intró 15, a 16pb de l'extrem 5', i a 46pb de l'extrem 3', pel que no es veuen afectades les seqüències *consensus* implicades en el *splicing*. Aquesta alteració no ha estat descrita prèviament, segons el nostre coneixement. A causa de la complexa estructura dels acceptors del *splicing* és difícil avaluar les conseqüències funcionals dels canvis intrònics, éssent necessari un estudi del mRNA. Ja que no es troben trànscripats truncats de RB1 constitucionalment (Dunn *et al*, 1989, Kato *et al*, 1994), seria necessari estudiar el RNA tumoral. Donat que no hem tingut accés al DNA tumoral del pacient, no podem descartar la possibilitat que la variant intrònica detectada tingui repercussió funcional.

#### 4.5.2.3 Exó 20

La variant detectada en els pacients 109Rb i 64Rb, consistent en una transició de A a G a l'intró 19, en posició -77, havia estat descrita anteriorment per Mateu i col·laboradors (1997), en un pacient i en els seus familiars no afectes, pel que van concloure que era irrelevant en la patogènesi.

Existeixen en la regió afectada per la transició, petites discrepàncies entre les seqüències publicades per diferents autors, de forma que, segons McGee i

col·laboradors (1989), la seqüència entre les posicions -80 i -77 és TGTA, i segons Toguchida i col·laboradors (1993) és AGCA.

#### 4.5.2.4 Valoració global

La mutació detectada a l'exó 2 en un pacient, tant en SP com en mostra tumoral, representa un 3,12% del total d'afectes no emparentats estudiats (32) i un 4,54% dels casos considerats clínicament hereditaris (22), es a dir, aquells que presenten antecedents familiars, o són esporàdics amb afectació BL o MF. Diferents autors no han detectat mutacions en aquest exó, en sèries més llargues que la nostra, com la de 71 pacients amb Rb familiar o BL esporàdic de Lohmann i col·laboradors (1996) o la de 232 pacients amb Rb familiar o esporàdic, tant UL com BL de Blanquet i col·laboradors (1995). Altres, com Mateu i col·laboradors (1997), no han inclòs l'exó 2 en el seu estudi.

Respecte a l'anàlisi conjunta dels exons 15 i 16, la variant intrònica detectada a l'intró 15, en la mostra de SP d'un pacient, representa un 2,85% del total d'afectes no emparentats (35), i el 4,54% si considerem únicament els casos clínicament hereditaris (22). Lohmann i col·laboradors (1996) no detecten variants en aquest intró entre els seus pacients amb Rb hereditari, i sí mutacions a l'exó 15 en un 4,2% dels casos. El percentatge de mutacions detectades per Blanquet i col·laboradors (1995) en aquest exó és sensiblement inferior, del 0,86%, hem de considerar però, que tant en el seu estudi, com en el nostre, s'inclouen pacients amb Rb UL esporàdic. En aquesta última sèrie tampoc no es detecten variants a l'intró 15. Cap d'aquests autors no troba mutacions a l'exó 16.

No hem detectat alteracions en l'estudi de l'exó 19, mentre que Lohmann i col·laboradors (1996) troben mutacions en el 2,8% dels casos, Mateu i col·laboradors (1997), i Blanquet i col·laboradors (1995) en el 2,6%, éssent en aquest últim cas un dels exons preferentment alterat.

Pel que fa a l'estudi de l'exó 20, la variant intrònica detectada a l'intró 19 en dos pacients, havia estat descrita prèviament (Mateu *et al*, 1997), i representa un 5,88% del total de pacients no emparentats estudiats (34). Un dels pacients en els que vam detectar l'alteració presentava la forma clínicament no hereditària de la malaltia (109Rb, amb Rb UL esporàdic). Respecte al percentatge d'alteracions detectades en aquest exó per diferents autors, Blanquet i

col·laboradors (1995) les observen en un 1,72% dels seus pacients, Mateu i col·laboradors (1997) en un 2,32%, i Lohmann i col·laboradors (1996) no en troben cap.

No hem detectat mutacions en l'estudi de l'exó 23, com tampoc no les troben Mateu i col·laboradors, tot i que aquest exó conté un codó CGA<sub>arg</sub>, i, com hem vist, aquests codons es troben alterats de forma recurrent. Cal destacar que el nombre de pacients estudiat és baix, i que tant Lohmann com Blanquet sí detecten mutacions (7% i 1,3% respectivament) en sèries més llargues.

Resulta difícil calcular un percentatge global de les mutacions trobades i comparar-les amb les descrites a la bibliografia, donat que el nombre de pacients estudiats per cada exó ha estat variable, i a que no s'ha fet un cribatge de tots els exons. En qualsevol cas, l'eficiència de la tècnica de SSCP en la detecció de mutacions ha estat baixa, i no esperem que aquesta situació canviï significativament en cas d'ampliar-se l'estudi a altres exons. Aquesta hipòtesi ve recolzada pel fet que, tot i que existeixen pocs estudis sobre la caracterització de mutacions constitucionals en el gen RB1, aplicats a sèries llargues de pacients, en la majoria dels casos aquests treballs han servit per detectar mutacions en un percentatge molt baix, inferior al 30%. En aquests treballs s'han utilitzat combinacions de diferents mètodes, com digestió amb enzims de restricció, SSCP i seqüenciació (Cowell *et al*, 1994), amb una taxa de detecció del 22%, DGGE, SSCP i seqüenciació (Blanquet *et al*, 1995), amb una taxa de detecció del 20%, i digestió amb enzims de restricció, SSCP i seqüenciació (Mateu *et al*, 1997), amb una taxa de detecció del 11,6%. En contraposició a aquests baixos percentatges d'èxit hi ha la sèrie de Lohmann, en la que es detecten mutacions en el 72% dels pacients. Cal destacar, però, que aquesta sèrie inclou únicament pacients amb Rb familiar o BL esporàdic, que totes les mostres es van estudiar mitjançant dos mètodes de cribatge (anàlisi d'heterodúplex, i SSCP), i que quan aquests mètodes van fracassar en la detecció de mutacions es va procedir a la seqüenciació directa. La metodologia utilitzada per Lohmann, tot i que exitosa en la detecció de mutacions, és, però, poc aplicable a la rutina clínica.

Les baixes taxes de detecció de mutacions no són exclusives dels estudis aplicats al gen RB1, i reflexen la dificultat de realitzar una anàlisi mutacional en gens grans amb una elevada heterogeneïtat mutacional. Val a dir, que

L'optimització de l'ús d'una determinada tècnica de cribatge de mutacions és possible quan es disposa d'informació sobre el tipus i la localització de la mutació a detectar (Kutach *et al*, 1999, O'Connell *et al*, 1999). Donat que en l'estudi de RB1 no ens beneficiem d'aquestes dades, és més que probable que diferents mutacions escapin al cribatge dels SSCP (Markoff *et al*, 1998).

Segons alguns autors, si es volen treure conclusions sobre l'eficiència de la tècnica, cal analitzar tots els exons, a tots els pacients (Cowell *et al*, 1994), encara que d'altres analitzen únicament exons seleccionats (Weir-Thompson *et al*, 1991, Blanquet *et al*, 1993).

La utilització de tots els mètodes de detecció de mutacions disponibles permet definir l'espectre de mutacions a RB1, el que ha de servir per entendre els mecanismes mutagènics i tumorogènics, però cal un mètode de detecció de mutacions útil per a la rutina clínica.

La nostra anàlisi de mutacions, mitjançant digestió amb enzims de restricció, SSCP i seqüenciació, ha inclòs els exons 2, 8, 15, 16, 18, 19, 20 i 23. La longitud total de regió codificant estudiada ha estat de 954 pb, el que suposa el 34% dels 2787 pb codificants totals. D'altra banda, dels 2744 pb totals analitzats, 1790 pb corresponen a seqüències intròniques adjacents. Aquestes seqüències inclouen 16 dels 52 *splice junctions* del gen RB1.

## 4.6 CONSELL GENÈTIC

Basant-se en dades empíriques, Shields (1992) va calcular el risc de diferents individus de tenir descendència amb Rb, segons si formaven part de famílies amb historial negatiu de la malaltia (taula 14), o amb historial positiu (taula 15), assumint una penetrància del 80%, inferior a la considerada per la majoria d'autors (Sakai *et al*, 1991, Onadim *et al*, 1992b, Dryja *et al*, 1993, Otterson *et al*, 1997). Aquestes taules són de gran valor en el consell genètic, però aquest és obviament més acurat quan es disposa d'un diagnòstic genètic que permet la detecció de portadors asimptomàtics.

A la nostra sèrie de pacients, i mitjançant l'anàlisi de lligament, s'ha aconseguit en tots els casos de Rb familiar determinar amb quín al·lel va lligada la malaltia. Aquest fet pot resultar de gran valor, en el diagnòstic de la descendència d'aquests pacients. De fet, ja ha estat útil en la caracterització del membre II-5

(117G, taula 2 pàg 30, fig 6 pàg 68) de la família AV, que segons la taula 13 presentava un risc del 40% de patir la malaltia, i que va resultar ser no portadora. D'altra banda, i aplicant l'anàlisi de lligament de forma prenatal, es va determinar que el fetus 118G2.2 ( II-3, família AX, taula 2 pàg 30, fig 13, pàg 80) era igualment no portador, quedant així exclòs del risc del 7% (taula 13).

Taula 14: risc de la descendència de desenvolupar Rb quan l'historial familiar és negatiu (assumint una penetrància del 80%)

| Descendents de...                      | Afectació  |           |
|----------------------------------------|------------|-----------|
|                                        | Unilateral | Bilateral |
| <b>Pares del pacient afecte</b>        | 1%         | 6%        |
| <b>Pacient afecte</b>                  | 8%         | 40%       |
| <b>Germans sans del pacient afecte</b> | 1%         | <1%       |

Dades obtingudes de: Shields *Intraocular tumors*. WB Saunders Company (1992)

Taula 15: risc de la descendència de desenvolupar Rb quan l'historial familiar és positiu (assumint una penetrància del 80%)

| Descendents de...                      | Afectació  |           |
|----------------------------------------|------------|-----------|
|                                        | Unilateral | Bilateral |
| <b>Pares del pacient afecte</b>        | 40%        | 40%       |
| <b>Pacient afecte</b>                  | 40%        | 40%       |
| <b>Germans sans del pacient afecte</b> | 7%         | 7%        |

Dades obtingudes de: Shields *Intraocular tumors*. WB Saunders Company (1992)

Pel que fa al consell genètic basat en la caracterització directa de la mutació predisposant, cal tenir en consideració el tipus de mutació detectada. Així, en el cas de la pacient 33Rb (taula 1, pàg 22, taula 2, pàg 30), portadora d'una translocació *de novo*, aparentment equilibrada, ha de contemplar-se el risc de la futura descendència, no únicament d'heretar la predisposició al Rb, si no la possibilitat d'heretar la reorganització en desequilibri. Així, els individus portadors de translocacions recíproques tenen sovint problemes reproductius,

consistents habitualment en avortaments repetitius, o en una descendència cromosòmicament desequilibrada. És possible oferir a aquesta pacient un diagnòstic prenatal, tenint en consideració que els únics descendents normals seràn aquells que heretin els cromosomes 5 i 13 no implicats en la reorganització.

En el consell genètic al pacient 4Rb, s'ha de valorar no únicament el risc de transmetre la deleció, que és del 50%, si no el fet de que presenta la síndrome de Noonan. Aquesta síndrome és majoritariament esporàdica, amb un índex de recurrència baix, i en els casos hereditaris presenta un tipus d'herència autosòmica dominant.

Respecte als pacients 82Rb i CPCRB, en els que s'ha detectat constitucionalment una mutació puntual, pot aplicar-se la metodologia utilitzada en la detecció d'aquestes mutacions, pel diagnòstic de la seva descendència, que té un risc teòric del 50% d'heretar la predisposició al Rb.

El fet de que el pacient 110Rb no presenti de forma constitucional la mutació puntual que es troba en homozigosi a la seva mostra tumoral, ens ha permès diagnosticar-lo genèticament com a no portador, de manera que el seu risc de tenir descendència afecta passa de ser del 8% teòric (taula 14, pàg 143), a ser el de la població normal.

Pel que fa als pacients en que s'han detectat variants intròniques i no s'ha establert la correlació d'aquestes variants amb el fenotip afecte, no podem utilitzar aquesta troballa en el diagnòstic, ni per tant en el consell genètic.

Cal destacar el cas de les famílies B i L (fig 2, pàg 27), que presenten un arbre genealògic especial, pel fet de que hi ha més d'un membre afecte a la segona generació, éssent els progenitors normals. Diferents autors han descrit casos similars, de famílies en que els individus afectes presenten preferentment formes moderades de la malaltia, i/o alguns membres són portadors obligats no afectes (Onadim *et al*, 1992b, Kratzke *et al*, 1994, Cowell *et al*, 1996, Bremner *et al*, 1997, Schubert *et al*, 1997, Cowell i Bia, 1998). Es proposa que aquests fenotips poden estar relacionats amb el tipus o la localització de la mutació predisposant, que en qualsevol cas dóna lloc a una proteïna que conserva una activitat parcial. D'altra banda s'han descrit casos en els que el membre fundador en una família presenta una mutació en mosaic. En aquests casos, habitualment el fundador presenta un fenotip moderat, i pot tenir tant

descendents afectes com amb pseudo-baixa penetrància (Munier *et al*, 1998). Els individus amb pseudo-baixa penetrància serien aquells que han heretat l'al·lel al que va lligada la malaltia, però en la seva forma normal. Per últim s'ha de considerar la possibilitat de que el membre fundador es trobi dins del 10% de no penetrància i, éssent portador, no desenvolupi la malaltia (Knudson, 1971, Vogel, 1979). Qualsevol d'aquestes possibilitats podria explicar el pedigrí de les famílies B i L, i han de tenir-se en consideració a l'hora del consell genètic, especialment en aquests casos, en que no s'ha caracteritzat la mutació predisposant.

Una vegada caracteritzada la metodologia apropiada pel diagnòstic genètic d'una família, és possible aplicar-la en el diagnòstic prenatal (Junien *et al*, 1982, Mitchell *et al*, 1988, Onadim *et al*, 1992a, Pierro *et al*, 1993, Sütterlin *et al*, 1999). Donat que la legislació vigent en el nostre país, permet la interrupció de l'embaràs si es detecten defectes congènits, cal contemplar una sèrie de fets clínics per tal de proporcionar un consell acurat. És cert que el Rb rarament és letal, i que la visió no sempre està compromesa, si la detecció dels tumors es fa a l'inici del seu desenvolupament. També és, però cert, que de vegades té com a conseqüència l'enucleació, que pot arribar a ser BL, i que els pacients afectes de Rb hereditari tenen una probabilitat entre el 5 i el 10% superior a la de la població normal, de desenvolupar altres tipus de càncer, preferentment sarcomes de teixits tous i osteosarcomes. En qualsevol cas, el diagnòstic assintomàtic permet el seguiment exhaustiu dels portadors i la detecció avançada de les tumoracions, que és essencial per preservar la vida i la visió. A la nostra sèrie, de 61 pacients, 45 van ser enucleats (73%), 11 (18%) no havien patit enucleació com a part del tractament, en el moment de l'última revisió de que tenim constància, i en 5 casos (8,2%) aquesta dada no va ser facilitada (taula 1, pàg 22).

## 4.7 PROTOCOL D'ESTUDI GENÈTIC

Entre els 46 pacients no emparentats als que s'han aplicat mètodes directes de detecció de mutacions, 9 (19,5%) han presentat algun tipus d'anomalia. D'altra banda, a les 7 famílies a les que s'ha aplicat un estudi indirecte mitjançant anàlisi de lligament ha pogut determinar-se l'al·lel amb el que segrega la malaltia.

En base a aquests resultats, ens vam plantejar quin seria el protocol més addient pel diagnòstic genètic, en el marc de la rutina clínica (fig 49). Hem de tenir en consideració, principalment, que per a que un protocol sigui aplicable, ha de permetre l'obtenció de resultats en un temps raonable, ha d'adaptar-se a l'experiència del laboratori, i a l'opció més econòmica. Per qualsevol test genètic és desitjable obtenir taxes de detecció de mutacions superiors al 95%, però això es dificulta quan existeix una gran heterogeneïtat mutacional (Dequeker *et al*, 2000), com és el cas del Rb, i en qualsevol cas, per tal de mantenir la viabilitat del protocol, creiem recomanable utilitzar el mínim de proves que permetin obtenir el màxim de resultats.

És sempre imprescindible mantenir una estreta relació amb l'equip clínic que tracta als pacients, per tal d'obtenir informació relevant de les dades clíniques dels individus clau en cada família, especialment en aquelles en que es donen formes atípiques de presentació de la malaltia, per tal de detectar possibles portadors amb, per exemple regressió espontània del tumor (Onadim *et al*, 1991). Cal, sempre, obtenir dades com l'edat d'aparició, el tipus d'afectació i l'existència o no d'antecedents familiars. A partir d'aquestes dades es fa una primera classificació dels pacients.

Per obtenir un diagnòstic genètic cal obtenir mostra de SP dels individus afectes per a realitzar un cultiu i una extracció de DNA. És de gran utilitat obtenir DNA a partir de mostres tumorals, sempre que sigui possible.

L'anàlisi del cariotip ens permetrà descartar la presència d'alteracions citogenètiques. En cas de que el resultat sigui positiu, es farà el cariotip dels pares de l'individu afecte, per establir si l'alteració ha estat o no heretada, i definir amb més claredat la seva implicació en la patologia. Pot aplicar-se la tècnica de FISH sobre les preparacions obtingudes del cultiu, per a valorar la presència de petites delecions, o per confirmar la implicació del gen RB1 en cas de detectar-se anomalies citogenètiques.

Quan la història familiar és positiva, hem d'obtenir mostres de DNA del màxim nombre de familiars, per tal de realitzar una anàlisi de lligament. En el cas poc probable de no aconseguir informació de cap dels marcadors utilitzats, serà necessari identificar la mutació predisposant que es segrega a la família.

Si la història familiar és negativa, o bé és positiva però no s'ha obtingut informació útil de l'anàlisi de lligament, i sempre que no s'hagi detectat cap

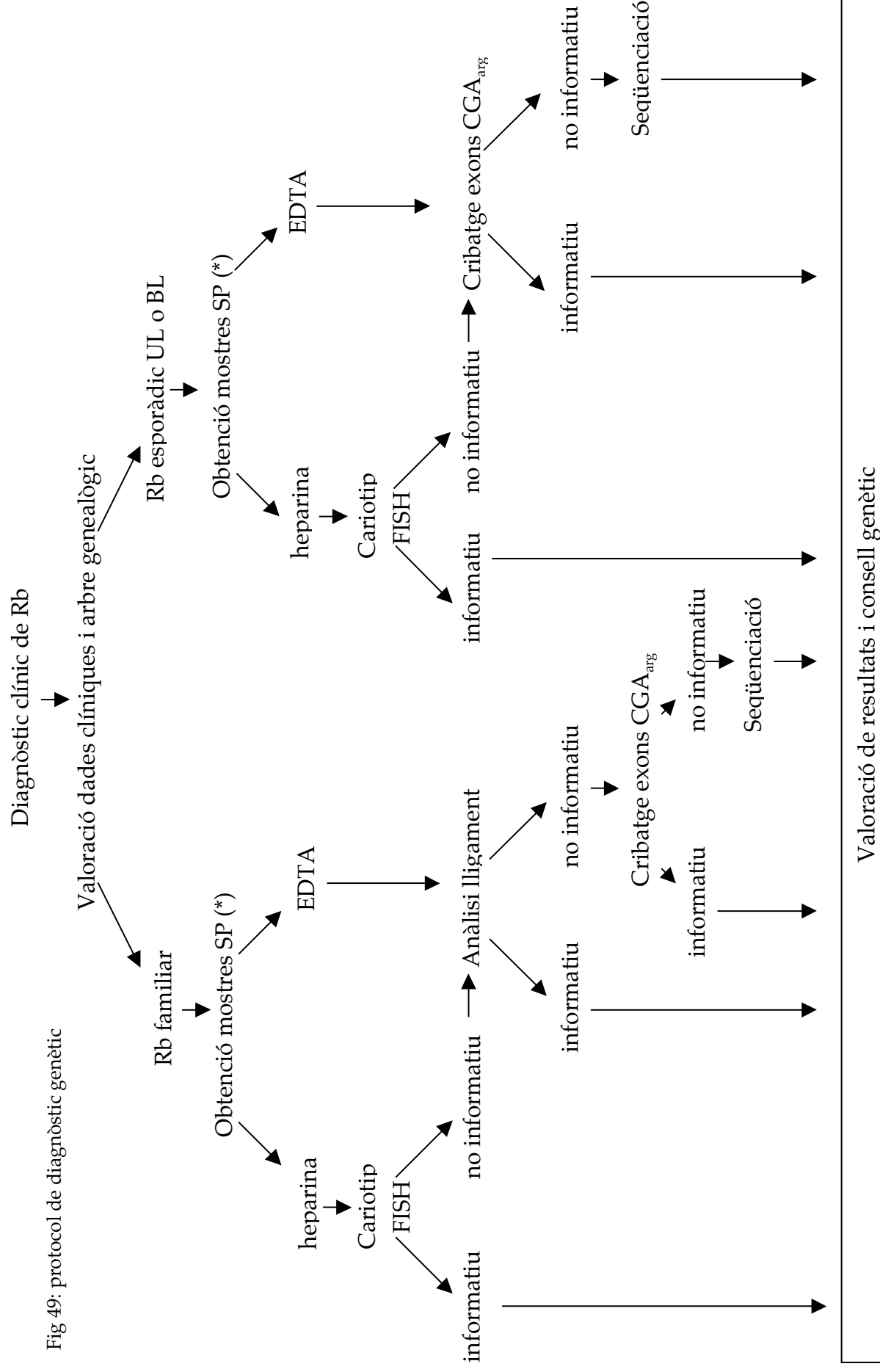
alteració a l'estudi citogenètic, s'ha de procedir a la detecció de la possible mutació predisposant.

Com a primera aproximació proposem l'anàlisi dels exons en que una mutació de tipus *nonsense* pot canviar un codó Arginina per un codó *stop*, ja que aquest estudi, tot i que parcial, ha resultat positiu en el present treball, i existeix acord entre diferents autors sobre l'elevada incidència d'aquestes mutacions en el gen RB1 (Blanquet *et al*, 1994, Cowell *et al*, 1994, Blanquet *et al*, 1995, Lohmann *et al*, 1996, Mateu *et al*, 1997). En els casos en que les mutacions provoquen canvis en dianes d'enzims de restricció, podem detectar-les mitjançant amplificació i digestió. Si la mutació no implica aquests canvis, és recomanable utilitzar la seqüenciació directa, ja que, en alguns casos, tècniques com l'anàlisi de SSCP o d'heterodúplex, fracassen en la detecció d'aquestes mutacions (Lohmann *et al*, 1996).

Si arribat aquest punt no hem detectat una mutació predisposant, proposem utilitzar la seqüenciació directa, ja que creiem que l'efectivitat de la tècnica de SSCP no és suficient per aplicar-la a la rutina del diagnòstic, opinió que ve recolzada pels resultats publicats per diferents autors (Blanquet *et al*, 1995, Mateu *et al*, 1997). Si bé és cert que en el treball de Lohmann i col·laboradors (1996), sobre una llarga sèrie de pacients, la taxa de detecció de mutacions ha estat elevada, aquesta s'ha obtingut no únicament de l'aplicació de la anàlisi de SSCP, si no de la combinació de diferents tècniques. Pensem que la necessitat d'utilitzar un protocol tan complex fa poc viable la seva aplicació rutinària.

Una vegada s'ha caracteritzat una anomalia per qualsevol dels mètodes aplicats cal valorar la seva implicació en el fenotip del pacient, i la possibilitat d'emprar la mateixa metodologia en el diagnòstic genètic dels parents asimptomàtics del *proband*. Sempre que sigui possible és útil contrastar els resultats obtinguts de l'estudi de mostres tumorals i de SP.

En cas de no trobar-se cap anomalia ha de considerar-se la possibilitat de que hagi passat desapercebuda o sigui indetectable pels mètodes emprats. En base a això, i valorant les dades clíniques del pacient, pot establir-se un protocol de seguiment clínic.



## **5. CONCLUSIONS**

---

1.- Mitjançant l'estudi citogenètic s'ha detectat un 4,2% d'anomalies cromosòmiques: un pacient amb cariotip 46,XX,t(5;13)(q22;q14), amb retinoblastoma bilateral esporàdic, i un pacient amb cariotip 46,XY,del(13)(q14.3), amb retinoblastoma unilateral esporàdic. Ambdues mutacions són constitucionals i justifiquen el fenotip dels pacients

2.- Degut a la baixa eficiència de la sonda utilitzada, dels vint i dos pacients analitzats per FISH, s'ha obtingut resultat de catorze

S'ha detectat una deleció en mosaic en un pacient amb retinoblastoma unilateral esporàdic, i s'ha confirmat la implicació del gen RB1 en la t(5;13) detectada per citogenètica. Ambdues mutacions són constitucionals i justifiquen el fenotip dels pacients

En els tretze pacients restants, un augment del nombre de cèl·lules analitzades incrementaria la resolució de la FISH en la detecció de delecions

3.- En l'anàlisi de lligament utilitzant els marcadors BamHI, XbaI, Tth 111 I, Rb1.20, i VNTR16 s'ha observat un percentatge d'heterozigots del 46,6%, 60%, 34,5%, 74,2% i 84,6% respectivament

La utilització conjunta de cinc marcadors polimòrfics ha permès identificar l'al·lel del gen RB1 al que va lligada l'herència del retinoblastoma en les set famílies estudiades

4.- L'anàlisi dels exons 8 i 18, que contenen codons CGA<sub>arg</sub>, per digestió amb enzims de restricció, ha permès detectar mutacions en dos pacients (5%): una mutació constitucional en heterozigosi en un pacient amb retinoblastoma bilateral esporàdic, i una mutació somàtica en homozigosi en un pacient amb retinoblastoma unilateral esporàdic

Ambdues mutacions s'han caracteritzat per seqüenciació, i els resultats obtinguts estan d'acord amb el fenotip dels pacients

5.- El cribatge de mutacions mitjançant SSCP ha permès la detecció, en quatre pacients, de tres variants, (2,4%, 2,2%, 5,4% dels pacients estudiats per cada exó). Mitjançant seqüenciació s'han caracteritzat com:

Una inserció d'una adenina a l'exó 2, en heterozigosi en sang perifèrica i en homozigosi en mostra tumoral. Aquest resultat està d'acord amb el fenotip de la pacient, amb retinoblastoma bilateral esporàdic

Una deleció, en heterozigosi, d'aproximadament 14 parells de bases a l'intró 15, en un pacient amb retinoblastoma bilateral esporàdic

Una variant intrònica consistent en una transició d'adenina a guanina a l'intró 19, constitucional en heterozigosi en un pacient amb retinoblastoma bilateral esporàdic, i constitucional i somàtica en heterozigosi en un pacient amb retinoblastoma unilateral esporàdic. Aquesta variant es considera un polimorfisme

6.- La baixa incidència d'anomalies detectades mitjançant SSCP es justifica tant per l'alt percentatge de pacients amb retinoblastoma esporàdic unilateral i unifocal inclòs a l'estudi (35%), com per l'elevada heterogeneïtat mutacional del gen RB1, i per la baixa eficiència del mètode, ja que en condicions aparentment idèntiques, una mateixa alteració pot provocar o no un patró electroforètic alterat

7.- El diagnòstic genètic de sis pacients mitjançant l'anàlisi directa de mutacions ha permès l'assessorament genètic als familiars de risc, i oferir un diagnòstic prenatal

L'anàlisi indirecta ha estat útil per a la detecció de portadors adults no afectes, i per a determinar la condició de no portadors de pacients en edat de risc, fet que els pot excloure de revisions oftalmològiques

8.- La variabilitat clínica i l'heterogeneïtat genètica de la malaltia, fan necessari utilitzar un protocol d'estudi genètic, tant per pacients amb retinoblastoma bilateral com unilateral. És necessari que aquest protocol sigui aplicable a la rutina clínica, en termes de cost-benefici

# **BIBLIOGRAFIA**

---

## BIBLIOGRAFIA

### A

- Abramson DH, Ellsworth RM, Zimmerman LE (1976) Nonocular cancer in retinoblastoma survivors. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 81:454-457.
- Arheden K, Tommerup N, Mandahl N, Heim S, Winther J, Jensen OA, Prause JU, Mitelman F (1988) Amplification of the human putative oncogene INT1 in primary retinoblastoma tumors. *Cytogenet Cell Genet* 48:174-177.

### B

- Baud O, Cormier Daire V, Lyonnet S, Dejardins L, Turleau C, Doz F (1999) Dysmorphic phenotype and neurological impairment in 22 retinoblastoma patients with constitutional cytogenetic 13q deletion. *Clin Genet* 55(6):478-482.
- Bayar E, Robinson MG, Kurczynski TW (1998) Unilateral retinoblastoma with acquired monosomy 7 and secondary acute myelomonocytic leukaemia. *Cancer Genet Cytogenet* 105:79-82.
- Bennet R, Steinhaus KA, Ulrich SB, O'Sullivan CK, Resta RG, Lochner D, Oyle D, Markel DS, Vincent V, Hamanishi J (1995) Recommendations for standardized human pedigree nomenclature. *Am J Hum Genet* 56:745-752.
- Bieche I, Lidereau R (2000) Loss of heterozygosity at 13q14 correlates with RB1 gene underexpression in human breast cancer. *Mol Carcinog* 29(3):151-158.
- Blanquet V, Turleau C, Créau-Goldberg N, Cochet C, DeGrouchy J (1987) De novo t(2;13)(p24.3;q14.2) and retinoblastoma. Mapping of two 13q14 probes by in situ hybridization. *Hum Genet* 76(1):102-105.
- Blanquet V, Turleau C, Grouchy J, Creau-Goldberg N (1991) Physical map around the retinoblastoma gene: possible genome imprinting suggested by Nrul digestion. *Genomics* 10:350-355.
- Blanquet V, Turleau C, Gross MS, Goossens M, Besmond C (1993) Identification of germline mutations in the RB1 gene by denaturant gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction direct sequencing. *Hum Mol Genet* 2(7):975-979.

- Blanquet V, Gross MS, Turleau C, Sénamaud-Beaufort C, Doz F, Besmond C (1994) Three novel germline mutations in exons 8 and 18 of the retinoblastoma gene. *Hum Mol Genet* 3, 7:1185-1186.
- Blanquet V, Turleau C, Gross-Morand MS, Sénamaud-Beaufort C, Doz F, Besmond C (1995) Spectrum of germline mutations in the RB1 gene: a study of 232 patients with hereditary and non hereditary retinoblastoma. *Hum Mol Genet* 4, 3:383-388.
- Bookstein R, Lai C-C, To H, Lee W-H (1990a) PCR-based detection of a polymorphic BamHI site in intron 1 of the human retinoblastoma (RB) gene. *Nucleic Acids Res* 18(6):1666.
- Bookstein R, Shew JY, Chen PL, Lee W-H (1990b) Suppression of tumorigenicity of human prostate cells by replacing a mutated RB gene. *Science* 247:712-715.
- Brady AF, Jamieson CR, van der Burgt I, Crosby A, van Reen M, Kremer H, Mariman E, Patton MA, Jeffery S (1997) Further delineation of the critical region for Noonan syndrome on the long arm of chromosome 12. *Eur J Hum Genet* 5:336-337.
- Brandt B, Greger V, Yandell D, Passarge E, Horsthemke B (1992) A simple and nonradioactive method for detecting the Rb 1.20 DNA polymorphism in the retinoblastoma gene. *Am J Hum Genet.* 51:1450-1451.
- Bremner R, Du DC, Connolly Wilson MJ, Bridge P, Ahmad KF, Mostachfi H, Rushlow D, Dunn JM, Gallie BL (1997) Deletion of RB exons 24 and 25 causes low penetrance retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 61(3):556-570.
- Buchkovich K, Duffy LA, Harlow E (1989) The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 58:1097-1105.

## C

---

- Calzolari E, Palazzi P, Aiello V, Mazzeo E, Perri P, Minelli A, Senno Ld, Patracchini P, Bernardi F, (1987) De novo complex autosomal translocation involving chromosomes 8, 13 and 15 in a girl with sporadic retinoblastoma. *Hum Genet* 77:51-54.
- Cano J, Oliveros O, Yunis J (1994) Phenotype variants, malignancy, and additional copies of 6p in retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 76:112-115.

- 
- Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305:779-784.
  - Cooper JA, White P (1989) RB and the cell cycle: entrance or exit. *Cell* 58:1009-1011.
  - Cotton RGH, Rodrigues NR, Campbell RD (1988) Reactivity of cytosine and thymidine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4397-4401.
  - Cowell JK, Rutland P, Jay M, Hungerford L (1986) Deletions on esterase-D locus from a survey of 200 retinoblastoma patients. *Hum Genet* 72:164-167.
  - Cowell JK, Jay M, Rutland P, Hungerford J (1987a) An assessment of the usefulness of electrophoretic variants of esterase-D in the antenatal diagnosis of retinoblastoma in the United Kingdom. *Br J Cancer* 55(6):661-664.
  - Cowell JK, Hungerford J, Rutland P, Jay M (1987b) A chromosome breakpoint that separates the esterase D and retinoblastoma predisposition loci in a patient with del(13)(q14q31). *Cancer Genet Cytogenet* 27:27-31
  - Cowell JK (1988) One hundred years of retinoblastoma research. *Ophthal Paediat Genet* 10:75-88.
  - Cowell JK, Hungerford J, Rutland P, Jay M, (1989) Genetic and cytogenetic analysis of patients showing reduced esterase-D levels and mental retardation for a survey of 500 individuals with retinoblastoma. *Ophthal Paediat Genet* 10:117-127 .
  - Cowell JK, Hogg A (1992) Genetics and cytogenetics of retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 64(1):1-11.
  - Cowell JK, Smith T, Bia B (1994) Frequent constitutional C to T mutations in CGA-arginine codons in the RB1 gene produce premature stop codons in patients with bilateral (hereditary) retinoblastoma. *Eur J Hum Genet* 2:281-290.
  - Cowell JK, Bia B, Akoulitchev A (1996) A novel mutation in the promotor region in a family with a mild form of retinoblastoma indicates the location of a new regulatory domain for the RB1 gene. *Oncogene* 12(2):431-436.

- Cowell JK, Bia B (1998) A novel missense mutation in patients from a retinoblastoma pedigree showing only mild expression of the tumor phenotype. *Oncogene* 16(24):3211-3213.
- Chittenden T, Livingston DM, De Caprio JA (1993) Cell cycle analysis of E2F in primary human T cells reveals novel E2F complexes and biochemically distinct forms of free E2F. *Mol Cell Biol* 13(7):3975-3983.

## D

---

- De Caprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang CM, Lee WH, Marsillo E, Paucha E, Livingston DM (1988) SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 54:275-283.
- Dequeker E, Cuppens H, Dodge J, Estivill X, Goossens M, Pignatti PF, Scheffer H, Schwartz M, Tümmler B, Cassiman J-J (2000) Recommendations for quality improvement in genetic testing for cystic fibrosis European concerted action on cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet* 8 Suppl 2:S2-S4.
- Dosaka-Akita H, Cagle PT, Hiroumi H, Fujita M, Yamashita M, Sharma A, Kawakami Y, Benedict WF (2000) Differential retinoblastoma and p16(INK4A) protein expression in neuroendocrine tumors of the lung. *Cancer* 88(3):550-556
- Draper GJ, Sanders BM, Kigston JE (1986) Second primary neoplasms in patients with retinoblastoma. *Br J Cancer* 53:661-671.
- Dryja TP, Cavenee WK, White R, Rapaport JM, Peterden RA, Albert DM, Bruns GAP (1984) Homozygosity of chromosome 13 in retinoblastoma. *N Engl J Med* 310:550-553.
- Dryja TP, Rapaport JM, McGee TL, Nork TM, Schwartz TL (1993) Molecular etiology of low-penetrance retinoblastoma in two pedigrees. *Am J Hum Genet* 52:1122-1128.
- Dunn JM, Phillips RA, Becker AJ, Gallie BL (1988) Identification of germline and somatic mutations affecting the retinoblastoma gene. *Science* 241:1797-1800.
- Dunn JM, Phillips RA, Zhu X, Becker A, Gallie BL (1989) Mutations in the RB1 and their effects on transcription. *Mol Cell Biol* 9:4596-4604.

- Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E (1989a) The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243:934-937.
- Dyson N, Buchkovich K, Whyte P, Harlow E (1989b) The cellular 107K protein that binds to adenovirus E1A also associates with the large T antigens of SV40 and JC virus. *Cell* 58(2):249-255.

---

## E

---

- Ejima Y, Sasaki MS, Kaneko A, Tanooka H, Hara Y, Hida T, Kinoshita Y (1982) Possible inactivation of part of chromosome 13 due to 13qXp translocation associated with retinoblastoma. *Clin Genet* 21:357-361.
- Ewen ME, Ludlow JW, Marsilio E, De Caprio JA, Millikan RC, Cheng SH, Paucha E, Livingston DM (1989) An N-terminal transformation-governing sequence of SV40 large T antigen contributes to the binding of both p110Rb and a second cellular protein, p120. *Cell* (1989) 58(2):257-267.

---

## F

---

- Feugeas O, Guriec N, Babin-Boilletot A, Marcelin L, Simon P, Babin S, Thyss A, Hofman P, Terrier P, Kalika C, Brunat-Mentigny M, Patricot LM, Oberling F (1996) Loss of heterozygosity of the RB gene is a poor prognostic factor in patients with osteosarcoma. *J Clin Oncol* 14(2):467-472.
- Fischer SG, Lerman LS (1983) DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:1579-1583.
- Franke U (1976) Retinoblastoma and chromosome 13. *Cytogenet Cell Genet* 14:131-134.
- Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323:643-646.
- Fukushima Y, Kuroki Y, Ito T, Kondo I, Nishizaki I (1987) Familial retinoblastoma (mother and son) with 13q14 deletion. *Hum Genet* 77(2):104-107.
- Fung Y-KT, Murphree AL, Tang A, Qian J, Hinrichs SH, Benedict WF (1987) Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science* 236:1657-1661.

## G

- Gallie BL, Ellsworth RM, Abramson DH, Phillips RA (1982) Retinoblastoma: spontaneous regression of retinoblastoma or bening manifestation of the mutation?. Br J Cancer 45:513-521.
- Gallie BL Dunn JM, Chan HS, Hamel PA, Phillips RA (1991) The genetics of retinoblastoma. Relevance to the patient. Pediatr Clin North Am 38:299-315.
- Gallie BL (1997) Predictive testing for retinoblastoma comes of age. Am J Hum Genet 61:279-281.
- Gil-Gibernau JJ (1997) Tratado de oftalmología pediátrica. Ed Escribá S.A. Barcelona.
- Girardet A, Lien S, Leeflang E, Beaufrère L, Tuffery S, Munier F, Arnheim N, Claustres M, Pellestor F (1999) Direct estimation of the recombination frequency between the RB1 gene and two closely linked microsatellites using sperm typing. Europ J of Hum Genet 7:239-242.
- Godbout R, Dryja TP, Squire J, Gallie BL, Phillips RA, (1983) Somatic inactivation of genes on chromosome 13 is a common event in retinoblastoma. Nature 304:451-453.
- Godbout R, Squire J (1993) Amplification of a DEAD box protein gene in retinoblastoma cell lines. Proc Natl Acad Sci USA 90:7578-7582.
- Goddard AD, Balakier H, Canton M, Dunn J, Squire J, Reyes E, Becker A, Phillips RA, Gallie BL (1988) Infrequent genomic rearrangement and normal expression of the putative RB1 gene in retinoblastoma tumors. Mol Cell Biol 8(5):2082-2088.
- Goodrich DW, Wang N-P, Qian Y-W, Lee E-Y, Lee W-H (1991) The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. Cell 67:293-302.
- Goodrich DW, Chen Y, Scully P, Lee W-H (1992) Expression of the retinoblastoma gene product in bladder carcinoma cells associates with a low frequency of tumor formation. Cancer Res 52:1968-1973.
- Greger V, Passarge E, Horsthemke B (1990) Somatic mosaicism in a patient with bilateral retinoblastoma. Am J Hum Genet 46:1187-1193.

- Greger V, Debus N, Lohmann D, Hopping W, Passarge E, Horsthemke B (1994) Frequency and parental origin of hypermethylated BR1 alleles in retinoblastoma. *Hum Genet* 94:491-496.

---

## H

---

- Hamann U, Herbold C, Costa S, Solomayer EF, Kaufmann M, Bastert G, Ulmer HU, Frenzel H, Komitowsky D (1996) Allelic imbalance on chromosome 13q: evidence for the involvement of BRCA2 and RB1 in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 56:1988-1990.
- Higgins MJ, Hansen MF, Cavenee WK, Lalande M (1989) Molecular detection of chromosomal translocations that disrupt the putative retinoblastoma susceptibility locus. *Mol Cell Biol* 9:1-5.
- Hogg A, Onadim Z, Baird PN, Cowell JK (1992) Detection of heterozygous mutations in the RB1 gene in retinoblastoma patients using single-strand conformation polymorphism analysis and polymerase chain reaction sequencing. *Oncogene* 7:1445-1451.
- Hogg A, Bia B, Onadim Z, Cowell JK (1993) Molecular mechanisms of oncogenic mutations in tumors from patients with bilateral and unilateral retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7351-7355.
- Hopkinson DA, Mestriner MA, Cortner J, Harris H (1973) Esterase-D: a new human polymorphism. *Ann Hum Genet* 37:119-137.
- Horowitz JM, Yandell DW, Park S-H, Canning S, Whyte P, Buchkovich K, Harlow E, Weinberg RA Dryja TP (1989) Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene. *Science* 243:937-940.
- Horsthemke B (1992) Genetics and cytogenetics of retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 63:1-7.

---

## J

---

- Junien C, Depoisse S, Turleau C, Nicolas H, Picard F, Le Marec B, Kaplan JC, de Grouchy J (1982) Retinoblastoma, deletion 13q14, and esterase D: application of gene dosage effect to prenatal diagnosis. *Cancer Genet Cytogenet* 6(4):281-287.

---

## K

---

- Kallionemi A, Kallionemi O-P, Waldman FM, Chen L-C, Yu L-C, Fung YKT, Smith HS, Pinkel D, Gray JW (1992) Detection of retinoblastoma gene copy

number in metaphase chromosomes and interphase nuclei by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 60:190-193.

- Kato MV, Ishizaki K, Ejima Y, Kaneko A, Tanooka H, Sasaki MS (1993) Loss of heterozygosity on chromosome 13 and its association with delayed growth of retinoblastoma. *Int J Cancer* 54:922-926.

- Kato MV, Ishizaki K, Toguchida J, Kaneko A, Takayama J, Tanooka H, Kato T, Shimizu T, Sasaki MS (1994) Mutations in the retinoblastoma gene and their expression in somatic and tumor cells of patients with hereditary retinoblastoma. *Hum Mutat* 3:44-51

- Keith CG, Webb GC (1985) Retinoblastoma and retinoma occurring in a child with a translocation and deletion of the long arm of chromosome 13. *Arch Ophthalmol* 103(7):941-944.

- Kingston JE, Hawkins MM, Draper GJ, Marsden HB, Wilson KLM (1987) Patterns of multiple primary tumors in patients treated for cancer during childhood. *Br J Cancer* 56:331-338.

- Knudson AG (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Ntl Acad Sci USA* 68:820-823.

- Knudson AG (1996) Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol* 122(3):135-140.

- Kratzke RA, Otterson GA, Hogg A, Coxon AB, Geradts J, Cowell JK (1994) Partial inactivation of the RB product in a family with incomplete penetrance of familial retinoblastoma and benign retinal tumors. *Oncogene* 9(5):1321-1326.

- Krawczak M, Reiss J, Cooper DN (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90:41-54.

- Kutach LS, Bolsakov S, Ananthaswamy HN (1999) Detection of mutations and polymorphisms in the p53 tumor suppressor gene by single-strand conformation polymorphism analysis. *Electrophoresis* 20(6):1204-1210.

- Kusnetsova LE, Prigogina EL, Pogosianz HE, Belkina BL (1982) Similar chromosomal abnormalities in several retinoblastomas. *Human Genet* 61:201-204.

---

## L

- Lee W-H, Murphree AL, Benedict WF (1984) Expression and amplification of the N-myc gene in primary retinoblastoma. *Nature* 309:458-460.
- Lee W-H, Bookstein R, Hong F, Young L-J, Shew JY, Lee EY-HP (1987a) Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 235:1394-1399.
- Lee W-H, Shew JY, Hong F, Sery TW, Donoso LA, Young L-J, Bookstein R, Lee Y-P (1987b) The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature* 329:642-645.
- Lele KP, Penrose LS, Stallard HB (1963) Chromosome deletion in a case of retinoblastoma. *Ann Hum Genet (Lond)* 27:171-174.
- Lemieux N, Richter CL (1990) Chromosome evolution and high-resolution analysis of leucocytes, bone marrow, and tumor cells of retinoblastoma patients. *Am J Med Genet* 36:456-462)
- Lohmann DR, Horsthemke B, Gillessen-Kaesbach G, Stefani FH, Höfler H (1992) Detection of small RB1 gene deletions in retinoblastoma by multiplex PCR and high-resolution gel electrophoresis. *Hum Genet* 89:49-53.
- Lohmann DR, Brandt B, Höpping W, Passarge E, Horsthemke B (1996) The spectrum of RB1 germ-line mutations in hereditary retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 58:940-949.
- Lohmann DR (1999) RB1 gene mutations in retinoblastoma. *Hum Mutat* 14(4):283-288.
- Lukas J, Bartkova J, Bartek J (1996) Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRB-controlled G1 checkpoint. *Mol Cell Biol* 16(12):6917-6925.

---

## M

- Mairal A, Pinglier E, Gilgert E, Peter M, Validire P, Desjardins L, Doz F, Aurias A, Couturier J (2000) Detection of chromosome imbalances in retinoblastoma by parallel karyotype and CGH analyses. *Genes, Chromosomes Cancer* 28: 370-379.
- Makely TA (1963) Retinoblastoma in a 52-year-old man. *Arch Ophthalmol* 69:325-327.

- Markoff A, Sormbroen H, Bogdanova N, Preisler-Adams S, Genev V, Dworniczak B, Horst J (1998) Comparison of conformation-sensitive gel electrophoresis and single-strand conformation polymorphism analysis for detection of mutations in the BRCA1 gene using optimized conformation analysis protocols. *Eur J Hum Genet* 6(2):145-150.
- Mateu E, Sánchez F, Nájera C, Beneyto M, Castell V, Hernández M, Serra I, Prieto F (1997) Genetics of retinoblastoma: a study. *Cancer Genet Cytogenet* 95:40-50.
- Matsunaga E (1980) Retinoblastoma: host resistance and 13q- chromosomal deletion. *Hum Genet* 56:53-58.
- McGee TL, Yandell DW, Dryja TP (1989) Structure and partial genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. *Gene* 80(1):119-28.
- Mc Gee TL, Cowley GS, Yandell DW, Dryja TP (1990) Detection of the XbaI RFLP within the retinoblastoma locus by PCR. *Nucleic Acids Res* 18(1):207.
- McLean IW, (1996) Retinoblastomas, retinocytomas, and pseudo retinoblastomas. Spencer WH (ed) A: Ophthalmic pathology: an atlas and textbook. WB Saunders, Philadelphia, pp1332-1380.
- Mehra KS, Hamid MB (1961) Retinoblastoma in an adult. *Am J Ophthalmol* 52:405-406.
- Mihara K, Cao XR, Yen A, Chandler S, Driscoll B, Murphree AL, T-Ang A, Fung Y-KT (1989) Cell cycle-dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product. *Science* 246:1300-1303.
- Mitchell CD, Nicolaides K, Kingston J, Hungerford J, Jay M, Cowell JK (1988) Prenatal exclusion of hereditary retinoblastoma. *Lancet* 1(8589):826.
- Mitchell CD, Cowell JK, (1989) Predisposition to retinoblastoma due to a translocation within the 4.7R locus. *Oncogene* 4:253-257.
- Moberg K, Starz MA, Lees JA (1996) E2F-4 switches from p130 to p107 and pRB in response to cell cycle reentry. *Mol Cell Biol* 16(4):1436-1449.
- Motegi T (1982) High rate of detection of 13q14 deletion mosaicism among retinoblastoma patients (using more extensive methods). *Hum Genet* 61:95-97.

- 
- Motegi T, Minoda K (1984) A decreasing tendency for cytogenetic abnormality in peripheral lymphocytes of retinoblastoma patients with 13q14 deletion mosaicism. *Hum Genet* 66:186-189.
  - Mudryj M, Devoto SH, Hiebert SW, Hunter T, Pines J, Nevins JR (1991) Cell cycle regulation of the E2F transcription factor involves an interaction with cyclin A. *Cell* 65(7):1243-1253.
  - Mulligan G, Jacks T (1998) The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. *TIG* 14(6):223-229.
  - Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Elrich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51:263-273.
  - Mullis KB, Faloona F (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-351.
  - Munier FL, Pescia G, Jotterand-Bellomo M, Balmer A, Gailloud C, Thonney F (1989) Constitutional karyotype in retinoblastoma. Case report and review of literature. *Ophthalmic Paediatr Genet* 10:129-159.
  - Munier FL, Thonney F, Girardet A, Balmer A, Claustre M, Pellestor F, Senn A, Pescia G, Shorderet DF (1998) Evidence of somatic and germinal mosaicism in pseudo-low penetrant hereditary retinoblastoma, by constitutional and single-sperm mutation analysis. *Am J Hum Genet* 63:1903-1908.
  - Murakami Y, Katahira M, Makino R, Hayashi K, Hirohashi S, Sekiya T (1991) Inactivation of the retinoblastoma gene in a human lung carcinoma cell line detected by single-strand conformation polymorphism analysis of the polymerase chain reaction product of cDNA. *Oncogene* 6:37-42.
  - Murphree A, Benedict W (1984) Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. *Science* 223:1028-1033.

## N

- 
- Nevins JR (1994) Cell cycle targets of the DNA tumor viruses. *Curr Opin Genet Dev* 4(1):130-134.
  - Noorani HZ, Khan HN, Gallie BL, Detsky AS (1996) Cost comparison of molecular versus conventional screening of relatives at risk for retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 59:301-307.

## O

- O'Connell CD, Altha DH, Oldenburg MC, Tian J, Siebert M, Handrow R, Grooms K, Heisler L, de Arruda M (1999) Detection of p53 gene mutations: analysis by single-strand conformation polymorphism and cleavage fragment length polymorphism. *Electrophoresis* 20(6):1211-1223.
- Ohtani-Fujita N, Dryja TP, Rapaport JM, Fujita T, Matsumura S, Ozasa K, Watanabe Y, Hayashi K, Maeda K, Kinoshita S, Matsumura T, Ohnishi Y, Hotta Y, Takahashi R, Kato MV, Ishizaki K, Sasaki MS, Horsthemke B, Minoda K, Sakai T (1997) Hypermethylation in the retinoblastoma gene is associated with unilateral, sporadic retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 98(1):43-49.
- Oliveros O, Yunis E (1995) Chromosome evolution in retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 82:155-160.
- Onadim Z, Mitchell CD, Rutland PC, Buckle BG, Jay M, Hungerford JL, Harper K, Cowell JK (1990) Application of intragenic DNA probes in prenatal screening for retinoblastoma gene carriers in the United Kingdom. *Archives of Disease in Childhood* 65:651-656.
- Onadim Z, Cowell JK (1991a) Application of PCR amplification of DNA from paraffin embedded tissue sections to linkage analysis in familial retinoblastoma. *J Med Genet* 28:312-316.
- Onadim Z, Hykin PG, Hungerford JL, Cowell JK (1991b) Genetic counselling in retinoblastoma: importance of ocular fundus examination of first degree relatives and linkage analysis. *Br J Ophthalmol* 75(3):147-150.
- Onadim Z, Hungerford J, Cowell JK (1992a) Follow-up of retinoblastoma patients having prenatal and perinatal predictions for mutant gene carrier status using intragenic polymorphic probes from the RB1 gene. *Br J Cancer* 65:711-716.
- Onadim Z, Hogg A, Baird PN, Cowell JK (1992b) Oncogenic point mutations of the RB1 gene in families showing incomplete penetrance and mild expression of the retinoblastoma phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6177-6181.
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K, (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874-879.

- 
- Otterson GW, Chen W, Coxon AB, Khleif SN, Kaye FJ (1997) Incomplete penetrance of familial retinoblastoma linked to germ-line mutations that result in partial loss of RB function. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12036-12040.

## P

- 
- Partridge JF, La Thangue NB (1991) A developmentally regulated and tissue dependent transcription factor complexes with the retinoblastoma gene product. *EMBO J* 10:3819-3827.
  - Pierro L, Brancato R, Capoferri C (1993) Prenatal detection and early diagnosis of hereditary retinoblastoma in a family. *Ophthalmologica* 207(2):106-111.
  - Potluri VL, Helson L, Ellsworth RM, Reid T, Gilbert F (1986) Chromosomal abnormalities in human retinoblastoma. *Cancer* 58:663-671.

## Q

- 
- Qin XQ, Livingston DM, Ewen M, Sellers WR, Arany Z, Kaelin WG Jr (1995) The transcription factor E2F-1 is a downstream target of RB action. *Mol Cell Biol* 15(2):742-755.

## R

- 
- Riccardi VM, Hittner HM, Francke U, Pipperin S, Holmquist GP, Kretzer FL, Ferrell R (1979) Partial triplication and deletion of 13q: study of a family presenting with bilateral retinoblastomas. *Clin Genet* 15:332-345.
  - Rivera H, Turleau L, De Grouchy J, Junien C, Despoisse S, Zucker JM (1981) Retinoblastoma deletion (13q-14); report of two patients, one with trisomic sib due to maternal insertion. Gene dosage effect for esterase-D. *Hum Genet* 59:211-214.

## S

- 
- Sakai T, Kanda N, Shiloh Y, Donlon T, Schreck R, Shipley J, Dryja TP, Chaum E, Chaganti RSK, Latt S (1985) Molecular and cytologic analysis of DNA amplification in retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 17:95-112.
  - Sakai T, Ohtani N, Mc Gee TL, Robbins PD, Dryja TP (1991) Oncogenic germ-line mutations in Sp1 and ATF sites in the human retinoblastoma gene. *Nature* 353:83-86.
  - Salamanca-Gómez F, Luengas F, Antillón F (1984) Genetic and cytogenetic studies in children with retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 13:129-134.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(12):5463-5467.
- Scharf SJ, Bowcock AM, McClure G, Klitz W, Yandell DW, Erlich HA (1992) Amplification and characterization of the retinoblastoma gene VNTR by PCR. *Am J Hum Genet.* 50:371-381.
- Scheffner M, Münger K, Byrne JC, Howley PM (1991) The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5523-5527.
- Schlamp CL, Poulsen GL, Nork TM, Nickells RW (1997) Nuclear exclusion of wild-type p53 in immortalized human retinoblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 89(20):1530-1536.
- Schubert EL, Strong LC, Hansen MF (1997) A splicing mutation in low penetrance retinoblastoma. *Hum Genet* 100 (5-6):557-563.
- Schwarz JK, Devoto SH, Smith EJ, Chellappan SP, Jakoi L, Nevins JR (1993) Interactions of the p107 and Rb proteins with E2F during the cell proliferation response. *EMBO J* 12(3):1013-1020.
- Seshadri R, Matthews C, Norris MD, Brian MJ (1988) N-myc amplified in retinoblastoma cell line FMC-RB1. *Cancer Genet Cytogenet* 33:25-27.
- Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16:325-332.
- Shields JA, Michelson JB, Leonard BC, Thompson R (1975) Retinoblastoma in an eighteen-year-old male. *J Pediatr Ophthalmol* 13(5):274-277.
- Shields (1992) Intraocular tumors. WB Saunders Company p: 337.
- Shimizu T, Toguchida J, Kato MV, Kaneko A, Ishizaki K, Sasaki MS (1994) Detection of mutations of the RB1 gene in retinoblastoma patients by using exon-by-exon PCR-SSCP analysis. *Am J Hum Genet* 54:793-800.
- Shirodkar S, Ewen M, De Caprio JA, Morgan J, Livingston DM, Chittenden T (1992) The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell-cycle-regulated manner. *Cell* 68(1):157-166.

- Sippel KC, Fraioli RE, Smith GD, Schalkoff ME, Sutherland J, Gallie BL, Dryja TP (1998) Frequency of somatic and germ-line mosaicism in retinoblastoma: implications for genetic counselling. *Am J Hum Genet* 62:610-619.
- Smith SM, Sorsby A (1958) Retinoblastoma: some genetic aspects. *Ann Hum Genet* 23:50-58.
- Sopta M, Gallie BL, Gill RM, Hamel PA, Muncaster M, Zacksenhaus E, Phillips RA (1992) The retinoblastoma protein and the cell cycle. *Semin Cancer Biol* 3(3):107-113.
- Sparkes RS, Murphree AL, Lingua RW, Sparkes MC, Field LL, Funderbuck S, Benedict WF (1983) Gene for hereditary retinoblastoma assigned to human chromosome 13 by linkage to esterase-D. *Science* 217:971-973.
- Squire J, Phillips RA, Boyce S, Godbout R, Rogers B, Gallie BL (1984) Isochromosome 6p, a unique chromosomal abnormality in retinoblastoma: verification by standard staining techniques, new densitometric methods, and somatic cell hybridization. *Hum Genet* 66:46-53.
- Squire J, Gallie BL, Phillips RA (1985) A detailed analysis of chromosomal changes in heritable and nonheritable retinoblastoma. *Hum Genet* 70:291-301.
- Stallard HB (1962) The conservative treatment of retinoblastoma. Doyne Memorial Lecture. *Trans Ophthalmol Soc UK* 83:473-535.
- Strong LC, Riccardi VM, Ferrell RE, Sparkes RS (1981) Familial retinoblastoma and chromosome 13 deletion transmitted via an insertional translocation. *Science* 213:1501-1503.
- Sütterlin M, Sleiman PA, Onadim Z, Delhanty J (1999) Single cell detection of inherited retinoblastoma predisposition. *Prenat Diagn* 19:1231-1236.

## T

- Takahashi R, Hashimoto T, Xu SX, Matsui T, Miki T, Bigo-Marshall H, Aaronson SA, Benedict WF (1991) The retinoblastoma gene functions as a growth and tumor suppressor in human bladder carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5257-5261.
- Teschauer W, Mussack T, Braun A, Waldner H, Fink E (1996) Conditions for single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis with broad applicability: a study on the effects of acrylamide, buffer and glycerol

concentrations in SSCP analysis of exons of the p53 gene. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 34:125-131.

- Tien H-F, Chuang S-M, Chen M-S, Lee F-Y, Hou P-K (1989) Cytogenetic evidence of multifocal origin of a unilateral retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 42:203-208.
- Toguchida J, McGee TL, Paterson JC, Eagle JR, Tucker S, Yandell DW, Dryja TP (1993) Complete genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. *Genomics* 17(3):535-543.
- Tricoli JV, Gumerlock PH, Yao J-L, Chi S-G, D'Sourza SA, Nestok BR, White RW, and the Cooperative Prostate Network, National Cancer Institute (1996) Alterations in the retinoblastoma gene in human prostate adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 15:108-114.
- Triviño E, Guitart M, Egozcue J, Coll MD (1997) Characterization by FISH of a t(5;13) in a patient with bilateral retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 96(1):23-25.
- Turleau C, Grouchy Jd, Chavin-Colin F, Despoisses S, Leblanc A (1983) Two cases of del (13q)-retinoblastoma and two cases of partial trisomy due to a familial insertion. *Ann Genet* 26:158-160.
- Turleau C, Grouchy Jd, Chavin-Colin F, Junien C, Seger J, Schienger P, Leblanc A, Haye C (1985) Cytogenetic forms of retinoblastoma: their incidence in a survey of 66 patients. *Cancer Genet Cytogenet* 16:321-334.

## V

---

- Vairo G, Livingston DM, Ginsberg D (1995) Functional interaction between E2F-4 and p130: evidence for distinct mechanisms underlying growth suppression by different retinoblastoma protein family members. *Genes Dev* 9(7):869-881.
- Vaughn GL, Toguchida J, Mc Gee TL, Dryja TP (1990) PCR detection of the Tth 111 I RFLP at the RB locus. *Nucleic Acids Res* 18(16):4965.
- Vogel F (1979) The genetics of retinoblastoma. *Hum Genet* 52:1-54.

---

## W

---

- Wartell RM, Hosseini SH, Moran CPJ (1990) Detecting single base pair substitutions in DNA fragments by temperature-gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 18:2699-2705.
- Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-330.
- Weir-Thompson E, Condie A, Leonard RCF, Proser J (1991) A familial RB1 mutation detected by the HOT technique is homozygous in a second primary neoplasm. *Oncogene* 6:2353-2356.
- Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Raybuck M, Weinberg RA, Harlow E (1988) Association between an oncogene and an antioncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 334:124-128.
- Whyte P, Williamson NM, Harlow E (1989) Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell* 56(1):67-75.
- Whyte E (1994) p53, guardian of Rb. *Nature* 371:21-22.
- Wiggs J, Nordenskjöld M, Yandell DW, Rapaport J, Grondin V, Janson M, Werelius B, Petersen R, Craft A, Riedel K, Liberfarb R, Walton D, Wilson W, Dryja TP (1988) Prediction of the risk of hereditary retinoblastoma, using DNA polymorphisms within the retinoblastoma gene. *New Engl J Med* 318(3):151-157.

## Y

---

- Yandell DW, Dryja TP (1989a) Direct genomic sequencing of alleles at the human retinoblastoma locus: application to cancer diagnosis and genetic counselling. *Cancer cells 7 Molecular Diagnostics of human cancer* 223-227
- Yandell DW, Dryja TP (1989b) Detection of DNA sequence polymorphisms by enzymatic amplification and direct genomic sequencing. *Am J Hum Genet* 45:547-555.
- Yandell DW, Campbell TA, Dayton SH, Petersen R, Walton D, Little JB, McConkie Rosell A, Buckley EG, Dryja TP (1989c) Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene: their application to genetic counselling. *N Eng J Med* 321(25):1689-1695.

- Youssoufian H, Kazazian HH, Philips DB, Aronis S, Tsiftis G, Brown VA, Antonarakis SE (1986) Recurrent mutations in hemophilia. A give evidence for CpG mutation hotspots. Nature 324:380-382.

---

## Z

---

- Zhang HS, Postigo AA, Dean DC (1999) Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16(INK4a), TGFbeta, and contact inhibition. Cell 97:53-61.
- Zhu X, Dunn JM, Phillips RA, Goddard AD, Paton KE, Becker A, Gallie BL (1989) Preferential germline mutation of the paternal allele in retinoblastoma. Nature 340:312-313.

### **De ahora en adelante**

Como después de un sueño,  
no acertaría  
a decir en qué instante sucedió.  
Llamaban.  
Algo, ya comenzado, no admitía espera.

Me sentí extraño al principio,  
lo reconozco – tantos años  
que pasaron igual que si en la luna...  
Decir exactamente qué buscaba,  
mi esperanza cuál fue, no me es posible  
decirlo ahora,  
porque en un instante  
determinado todo vaciló: llamaban.  
Y me sentí cercano.  
Un poco al aire libre,  
algo tan natural como un rumor  
crece si se le escucha de repente.

Pero ya desde ahora siempre será lo mismo.  
Porque de pronto el tiempo se ha colmado  
y no da para más. Cada mañana  
trae, como dice Auden, verbos irregulares  
que es preciso aprender, o decisiones  
penosas y que aguardan examen.  
Todavía  
hay quien cuenta conmigo. Amigos míos,  
o mejor: compañeros, necesitan,  
quieren lo mismo que yo quiero  
y me quieren a mí también, igual  
que yo me quiero.

Así que apenas puedo recordar  
qué fue de varios años de mi vida,  
o adónde iba cuando desperté  
y no me encontré solo.

Jaime Gil de Biedma