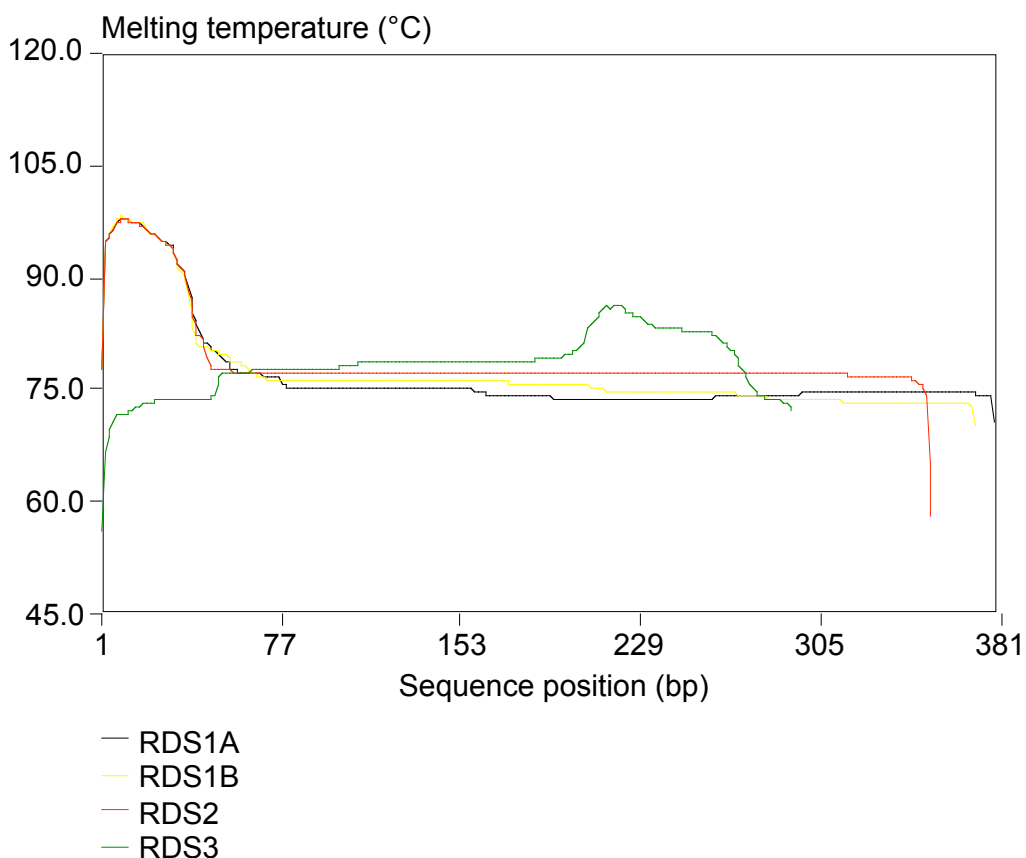


IV.1.2. Gen RDS / Periferina

La búsqueda de mutaciones se llevó a cabo en los tres exones del gen. Se amplificaron mediante PCR cuatro fragmentos de ADN (1A, 1B, 2, 3) del gen y se analizaron mediante la técnica de DGGE. El exón 3 se analizó mediante secuenciación directa ya que en la población existen tres polimorfismos en este exón que complican su análisis por otra técnica. Se estudiaron 150 pacientes afectados de RPAD y 100 SRP. Se incluyeron en el estudio siete pacientes con distrofias maculares autosómicas dominantes (DMAD), ya que la frecuencia de mutaciones observada en este gen aumenta considerablemente en familias que padecen esta enfermedad.

A continuación se presenta el resultado del análisis, mediante el programa informático WinMelt (*BioRad*), de los distintos dominios de fusión de los fragmentos del gen RHO analizados. Este análisis ha sido necesario para aproximar el gradiente desnaturizante necesario en cada caso para el cribado de mutaciones mediante la técnica de DGGE (aptdo. III.4.3.1.).



IV.1.2.1. Caracterización de mutaciones

La siguiente tabla resume las mutaciones y polimorfismos encontrados.

Mutación	Cambio de base	Dominio (proteína)	Fenotipo	Década Inicio	Evolución a ceguera legal
Tyr141His	C <u>I</u> A→C <u>C</u> A	Segundo Intradiscal	Distrofia Macular	5 ^a	Lenta, 6 ^a década
Arg142Trp	C <u>G</u> G→T <u>G</u> G	Segundo Intradiscal	Distrofia Macular	4 ^a	6 ^a Década
Cys214Tyr	T <u>G</u> C→T <u>A</u> C	Segundo Intradiscal	Distrofia Macular	4 ^a	Lenta
Mutación Silenciosa	Cambio de base				
Val106Val	G <u>T</u> C→G <u>T</u> I				

Se ha observado una mutación sinónima Val106Val en la secuencia codificante del gen RDS en un paciente con RPAD al que le fue detectada una mutación, también sinónima, en el exón 5 de la rodopsina.

Entre los pacientes DMAD, se observaron tres mutaciones del tipo “missense” y en heterocigosis.

IV.1.2.2. Análisis familiar

DMAD 24; Tyr141His; CTA→CCA; RDS 1B

La DGGE no llega a resolver los homodúplex en las muestras mutadas pero sí resuelve bien los heterodúplex. Se puede observar que el individuo III.2, presenta los heterodúplex algo más separados que el resto de muestras con mutación. La secuenciación automática permitió observar, solo en este paciente, la presencia de la mutación sinónima, Val106Val (GTC→GTT) en homocigosis “ligada a la mutación”, encontrándose en heterocigosis en el resto de los familiares que la presentan.

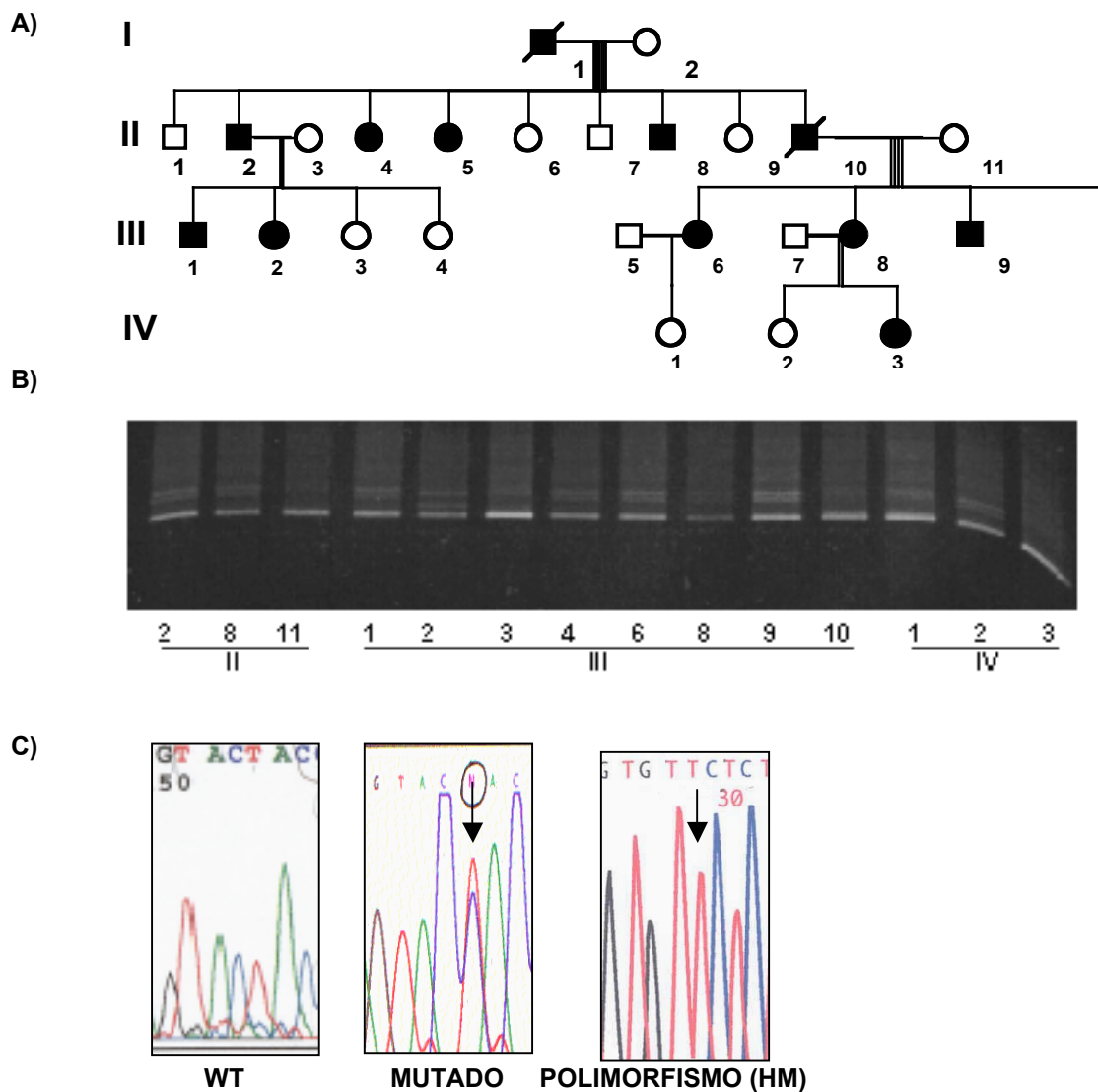


Figura 33. Familia DMAD 24; Tyr141His; CTA→CCA; RDS 1B; A. Árbol genealógico; B. DGGE; C. Secuenciación automática.

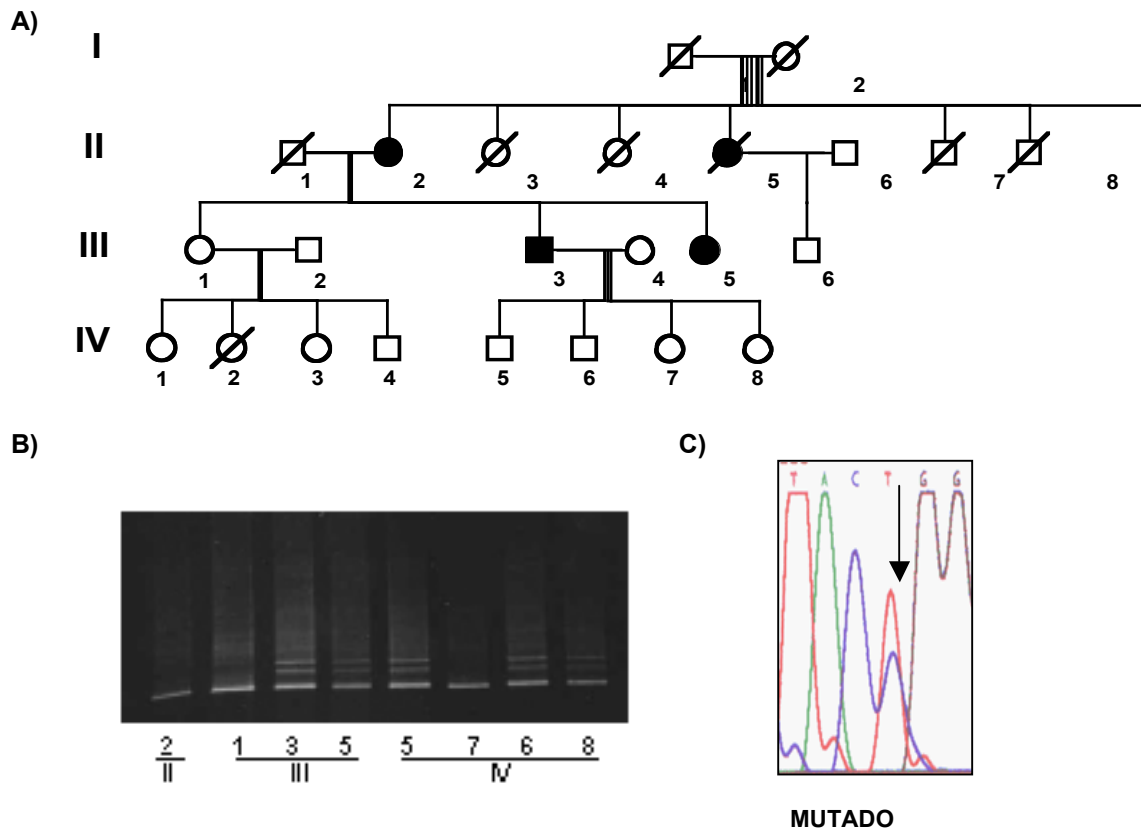
DMAD 25; Arg142Trp; CGG→TGG; RDS 1B

Figura 34. Familia DMAD 25; Arg142Trp; CGG→TGG; RDS 1B; **A.** Árbol genealógico; **B.** DGGE; **C.** Secuenciación automática.

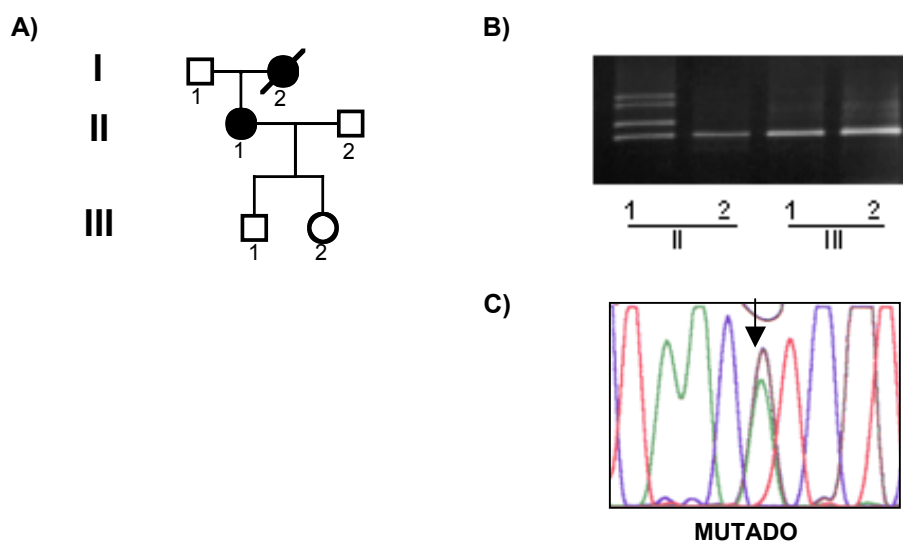
DMAD 13; Cys214Tyr; TGC→TAC; RDS 2

Figura 35. Familia DMAD 13; Cys214Tyr; TGC→TAC; RDS 2; **A.** Árbol genealógico; **B.** DGGE; **C.** Secuenciación automática.

La siguiente tabla muestra otros datos clínicos característicos de los distintos tipos de distrofia macular que producen las tres mutaciones descritas:

Mutación	Visión en color↓	Fotofobia	Mácula	ERG*	EOG*
Tyr141His	Si	Si	Lesiones amarillentas Atrofia y desestruct. EPR DMVA*.	↓Amplitud onda "b" en B, C y M.	Test Arden: Normal D 2.15 / I 2.16
Arg142Trp	---	---	Lesiones amarillentas Atrofia y desestruct. EPR DCAC*.	---	---
Cys214Tyr	No	No	Lesiones amarillentas Desestructuración EPR DM patrón.	---	---

* ERG, electroretinograma (B, bastones; C, conos; M, mixto); EOG, electrooculograma (D,derecho; I, izquierdo); DMVA, Distrofia macular viteliforme adulto; DCAC, Distrofia macular coroidal areolar central; EPR, Epitelio Pigmentario Retiniano.

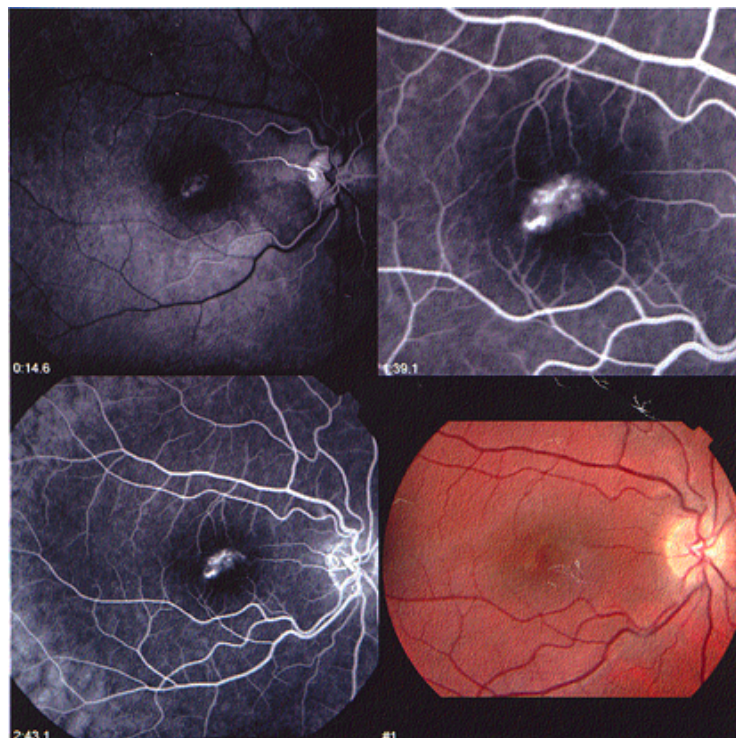


Figura 36. Angiografías y fondo de ojo de un paciente, que presenta la mutación Tyr141His, afectado de Distrofia macular viteliforme adulto.

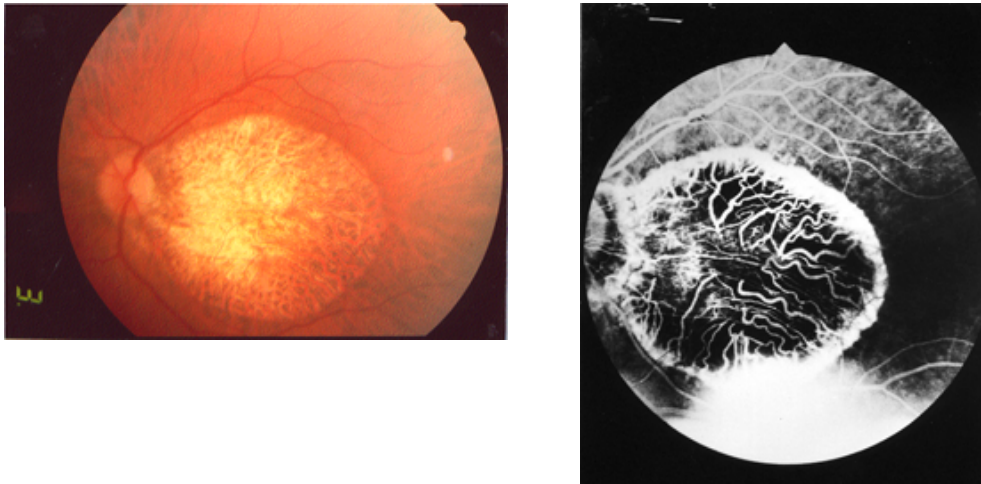


Figura 37. Fondo de ojo y angiografía de un paciente, que presenta la mutación Arg142Trp, afectado de Distrofia Macular coroidal areolar central.

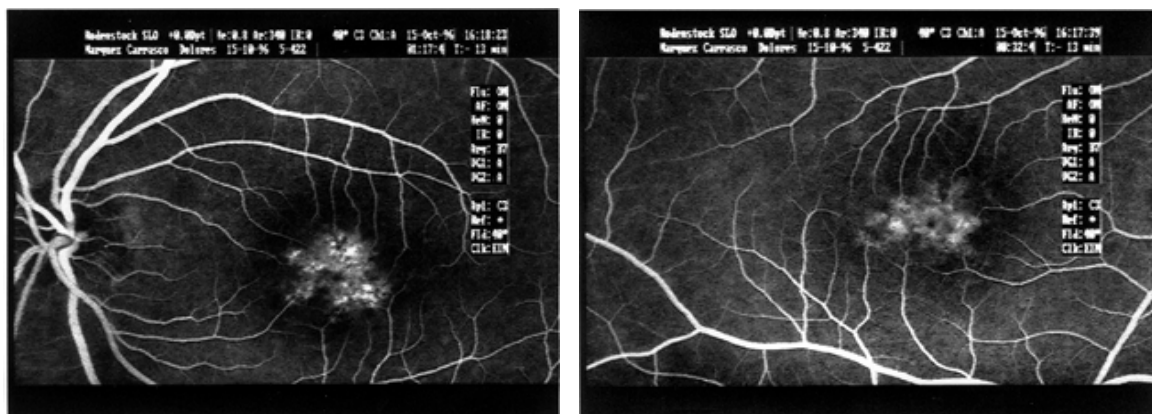


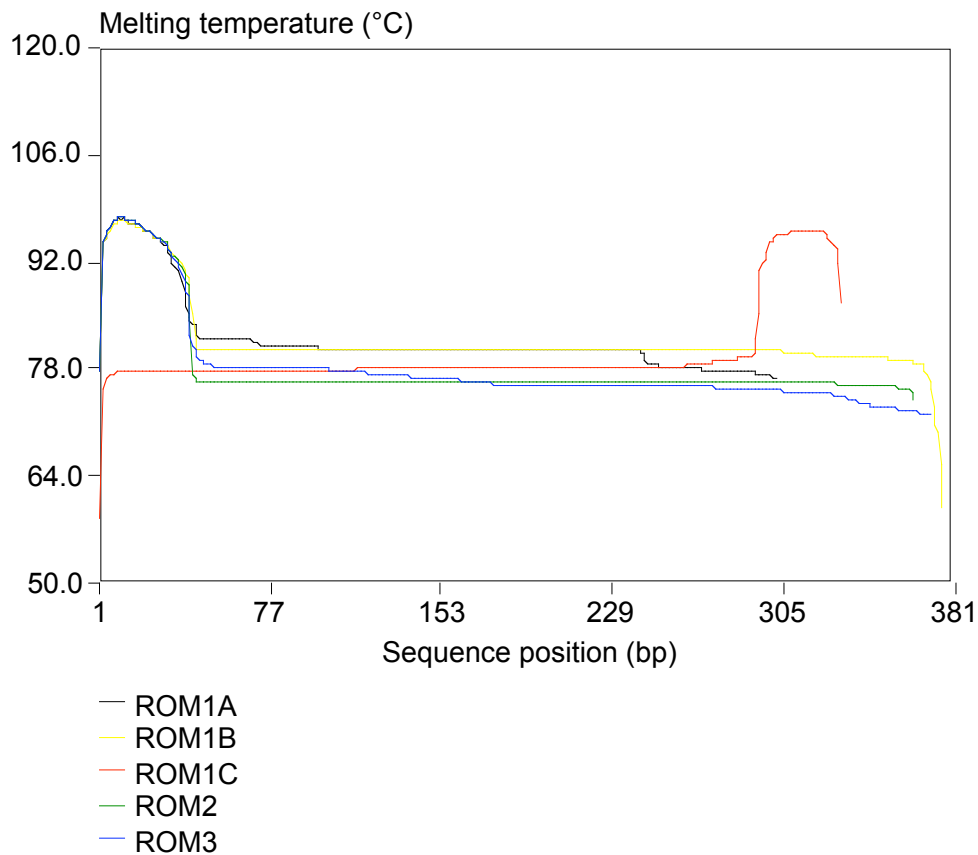
Figura 38. Angiografía de un paciente, que presenta la mutación Cys214Tyr, afectado de Distrofia macular patrón.

IV.1.3. Gen ROM1

La búsqueda de mutaciones en este caso ha abarcado un grupo menor de pacientes, 70 pacientes RPAD, debido a que existen dudas de que este gen esté asociado a RPAD.

El estudio se ha realizado sobre los tres exones del gen. Se amplificaron mediante PCR cuatro segmentos (1A, 1B, 1C, 2 y 3) que se analizaron posteriormente mediante la técnica de DGGE.

A continuación se presenta el resultado del análisis, mediante el programa informático WinMelt (*BioRad*), de los distintos dominios de fusión de los fragmentos del gen RHO analizados. Este análisis ha sido necesario para aproximar el gradiente desnaturalizante necesario en cada caso para el cribado de mutaciones mediante la técnica de DGGE (aptdo. III.4.3.1.).



IV.1.3.1. Caracterización de mutaciones

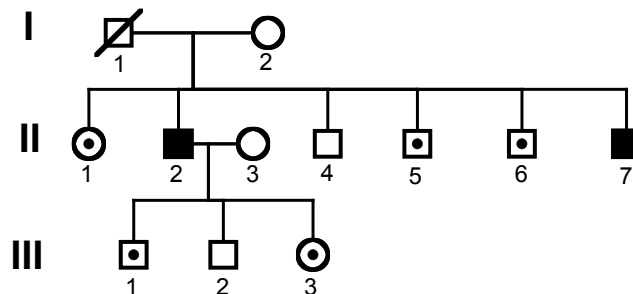
Se detectó una sola mutación en heterocigosis, Cys253Tyr, con una posible asociación con RPAD, en una familia afectada de RP.

IV.1.3.2. Análisis familiar

RPAD F22; Cys253Lys; TGC→TAC

La mutación crea una diana KpnI. Se generan dos fragmentos de 254 y 110 pb además del fragmento no digerido de 365 pb que corresponde al alelo salvaje en las muestras analizadas de los individuos con mutación. El análisis de restricción revela que los individuos asintomáticos II.1, II.5, II.6, III.1 y III.3 presentan también la mutación.

A)



B)

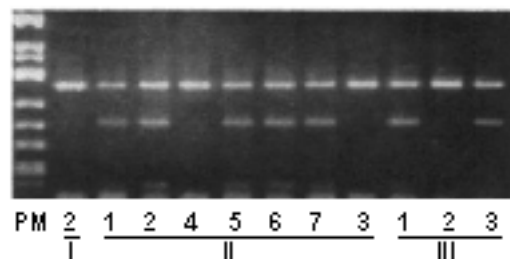
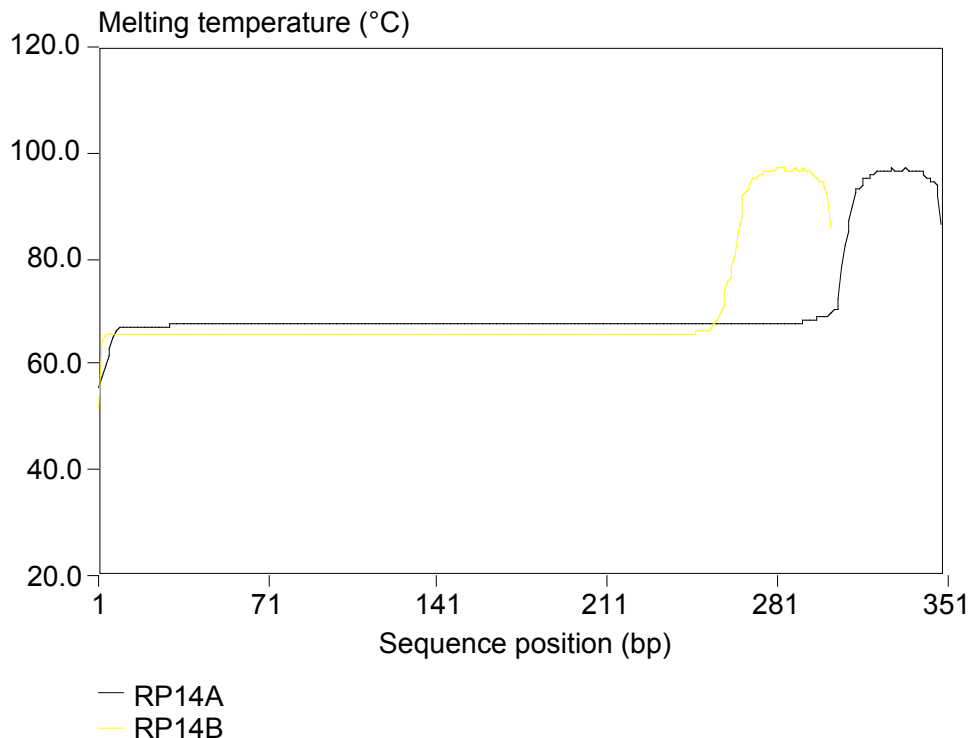


Figura 39. Familia RPAD F22; Cys253Lys; TGC→TAC; **A.** Árbol genealógico; **B.** Análisis de restricción (Kpn I).

IV.1.4. Gen RP1

La mayoría de las mutaciones ya descritas causantes de RPAD en este gen se localizan en una región codificante de 1000 pb contenidas en el exón 4 de este gen. En este estudio hemos centrado el análisis a esta región del gen. Se amplificaron mediante PCR dos fragmentos de ADN que contienen las secuencias codificantes y contiguas del gen (4A y 4B) y se analizaron posteriormente mediante DGGE. Se analizaron un total de 150 pacientes afectados de RPAD y 100 casos SRP.

A continuación se presenta el resultado del análisis, mediante el programa informático WinMelt (*BioRad*), de los distintos dominios de fusión de los fragmentos del gen RHO analizados. Este análisis ha sido necesario para aproximar el gradiente desnaturizante necesario en cada caso para el cribado de mutaciones mediante la técnica de DGGE (aptdo. III.4.3.1.).



IV.1.4.1. Caracterización de mutaciones

La siguiente tabla resume las mutaciones encontradas:

Mutación	Cambio de base	Fenotipo RP	Década Inicio	Evolución a ceguera legal
Gln686Ter	2204C>T	RP leve Penetrancia Incompleta	3 ^a -4 ^a	Lenta
Arg677Ter	2177C>T	RP leve Penetrancia Incompleta	4 ^a	Lenta
Lys705fsX712	2260/2263delA	RP Leve Penetrancia Incompleta	4 ^a -5 ^a	Lenta
Lys722fsX737	2312/2314delAAinsG	RP Leve Penetrancia Incompleta	4 ^a -5 ^a	Lenta
Thr752Met	2403C>T			

La mutación Arg677Ter, bastante frecuente en otras poblaciones, se detectó en dos familias RPAD no relacionadas.

Tres nuevas mutaciones, Gln686Ter (2204C>T), 2260/2263delA (Lys705fsX712) y 2312/2314delAAinsG (Lys722fsX737), que generan proteínas truncadas fueron detectadas en tres familias RPAD.

Sólo en una familia se ha detectado una mutación “missense”, Thr752Met, pero no co-segrega con la enfermedad por lo que no se relaciona con RPAD.

IV.1.4.2. Análisis familiar

RPAD 265; Gln686Ter; C2204T; RP1 4A

Los individuos II.1, III.6 y III.7 son portadores asintomáticos.

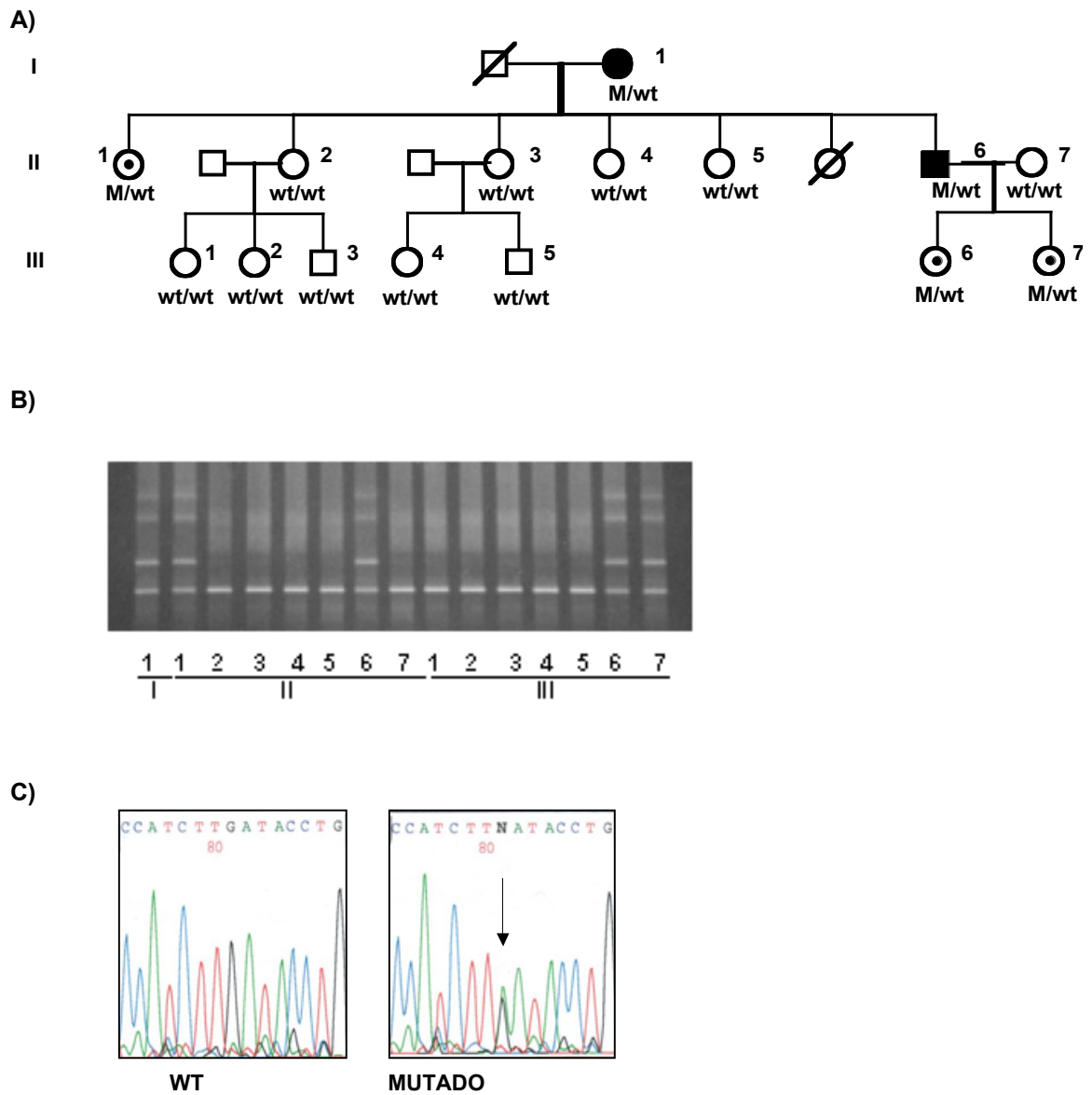


Figura 40. Familia RPAD 265; Gln686Ter; C2204T; RP1 4A; **A.** Árbol genealógico; **B.** DGGE; **C.** Secuenciación automática.

RPAD 11/90, 265/99; Arg677Ter; C2177T; RP1 4A

La mutación destruye una diana de restricción TaqI, por lo que en el análisis de restricción se generan dos fragmentos de 170 pb (no diferenciables en agarosa) correspondientes a la digestión del alelo salvaje y un fragmento de 340 pb que corresponde al alelo mutado no digerido.

Los individuos III.3 de la familia 11/90 y IV.2, IV.4 de la familia 265/99 son portadores asintomáticos.

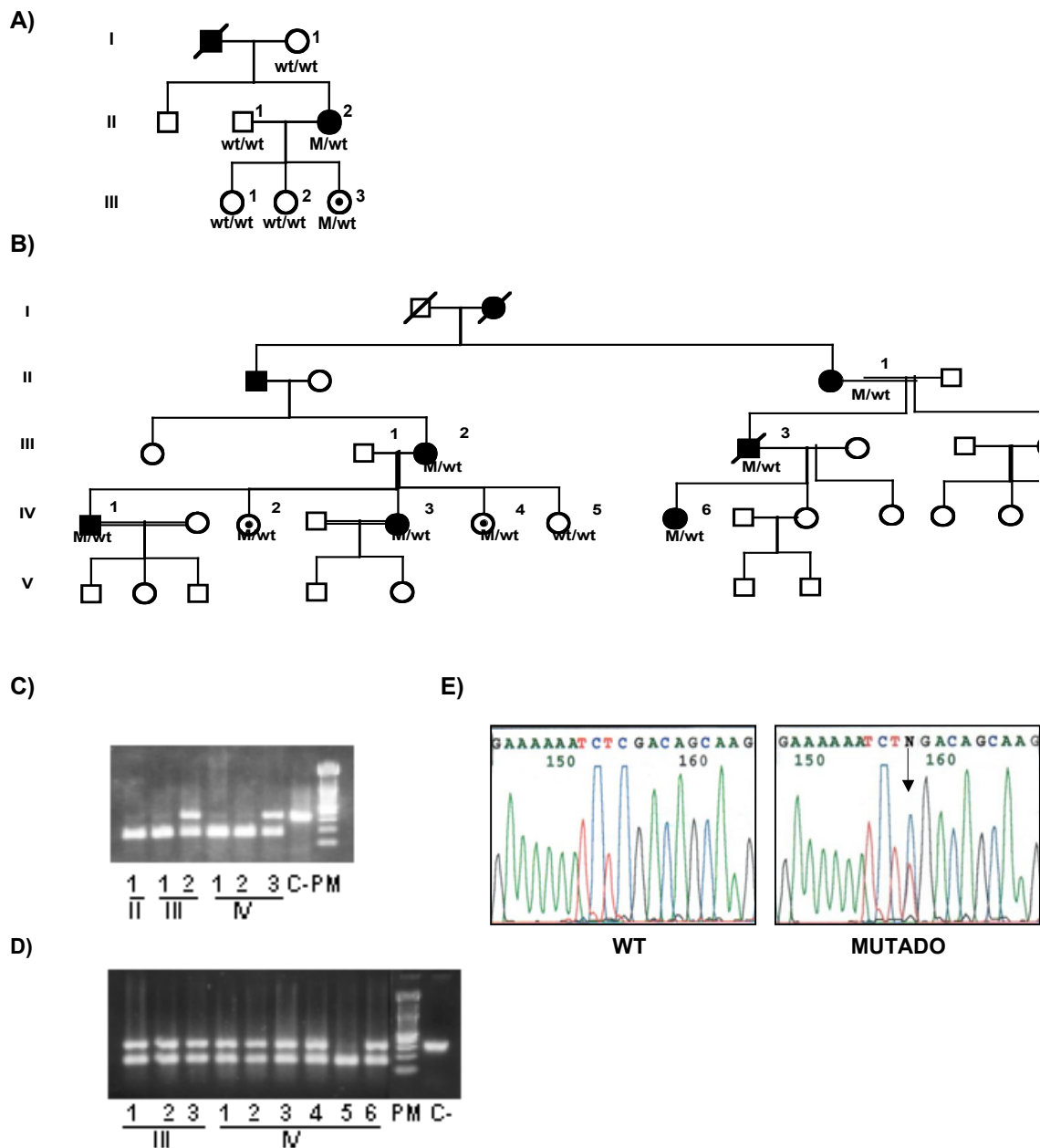


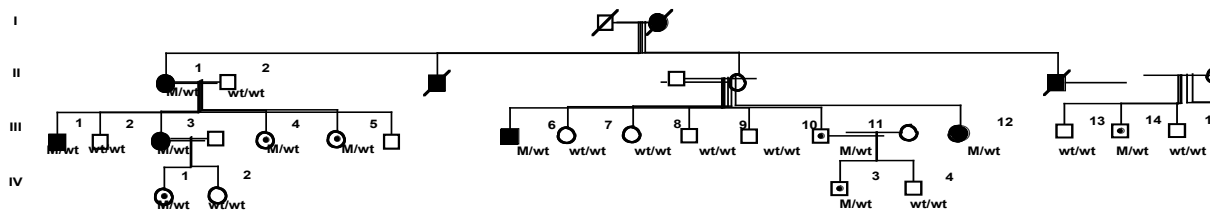
Figura 41. Familias RPAD 11/90, 265/99; Arg677Ter; C2177T; RP1 4A; **A y B.** Árbol genealógico familias 11/90 y 265/99 respectivamente; **C y D.** Análisis de restricción (Taq I); **E.** Secuenciación automática.

RPAD 455; Lys705fsX712; 2260/2263delA; RP1 4B

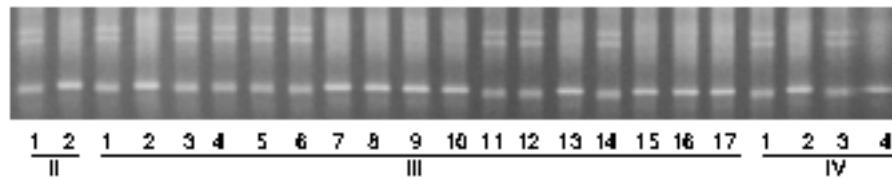
La DGGE muestra los heterodúplex de los individuos que presentan la mutación. Los homodúplex no llegan a separarse en la electroforesis.

Los individuos III.4, III.6, III.11, III.14 y IV.3 son portadores asintomáticos, y en este caso puede sugerir una posible penetrancia incompleta.

A)



B)



C)

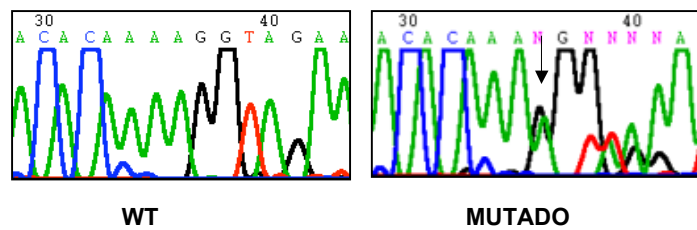


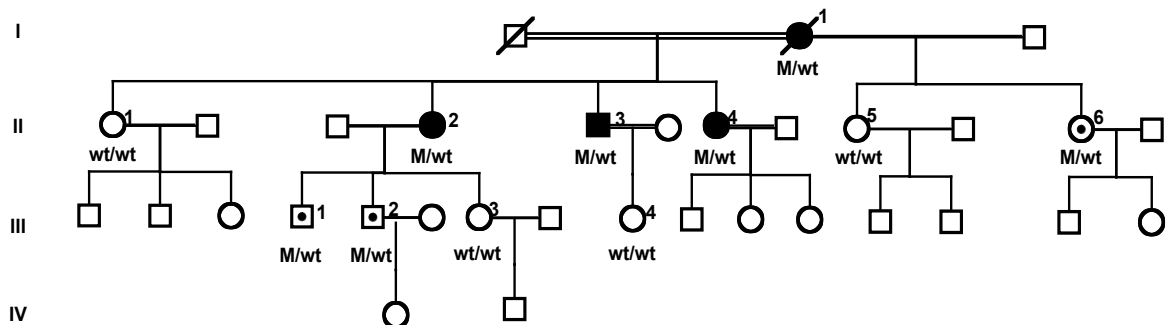
Figura 42. Familia RPAD 455; Lys705fsX712; 2260/2263delA; RP1 4B; **A.** Árbol genealógico; **B.** DGGE; **C.** Secuenciación automática.

RPAD 177; Lys722fsX737; 2312/2314delAAinsG; RP1 4B

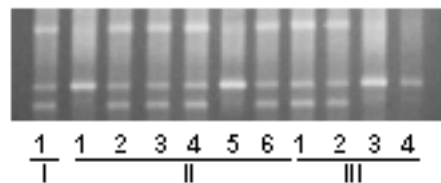
La DGGE muestra los dos homodúplex de los individuos que presentan la mutación, los heterodúplex no llegan a separarse en la electroforesis.

Los individuos II.6, III.1y III.2, son portadores asintomáticos.

A)



B)



C)

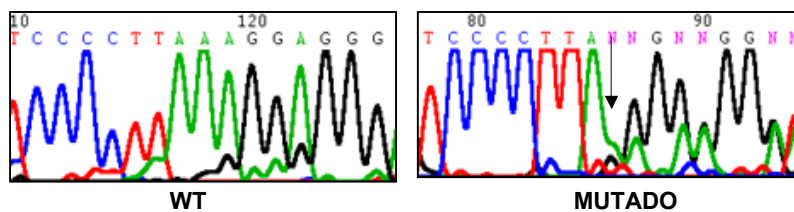


Figura 43. Familia RPAD 177; Lys722fsX737; 2312/2314delAAinsG; RP1 4B; **A.** Árbol genealógico; **B.** DGGE; **C.** Secuenciación automática.

La siguiente tabla muestra algunos datos clínicos, oftalmológicos (CV, AV) y electrofisiológicos (ERG) de cada uno de los individuos analizados pertenecientes a las tres familias en las que se han detectado las mutaciones correspondientes.

Mutación	Individuo	Edad (años)	Inicio CN* (años)	Inicio ↓CV* (años)	Inicio ↓AV* (años)	CV (actual)	AV (actual)	ERG* (actual)	Funduscopia
K722fsX737	I-1	85	60	65	--	¿?	¿?	¿?	¿?
	II-2	59	50	49	--	10° centrales	0.6	Abolido	RP típica
	II-3	58	43	46	50	10° centrales	<< 0,1	Abolido	RP típica + MCA
	II-4	56	37	54	--	10° centrales	0.5	Abolido	RP típica
Q686X	I-1	86	45	74	¿?	Escotoma abs.	<<0,1	B/M ab. / C ↓ ↓	RP típica
	II-1	60	No	No	No	Normal	Normal	----	----
	II-6	54	28	31	38	Normal	0,1	B/M ↓ ↓ / CN	RP típica
	III-6	29	No	No	No	20° centrales	Normal	Normal	Normal
	III-7	26	No	No	No	Normal	Normal	Normal	Normal
K705fsX712	II-1	73	No	No	No	RP VC sup	0.7/ 0.6	B ab. ; M/C ↓	Normal
	III-1	46				Afectado RP	----	----	RP típica
	III-3	42	30	35	--	20°OD /	0.8/1	Abolido	RP típica
	III-4	40	No	No	No	10°OI	Normal	Normal	Normal
	III-5	39	No	No	No	Asintomático	Normal	Normal	Normal
	III-6	49				Asintomático			RP típica
	III-11	41	No	No	No	Afectado	Normal	Normal	Normal
	III-12	38				Asintomático			RP típica
	III-14	39	No	No	No	Afectado	Normal	Normal	Normal
IV-1	11	No	No	No	Asintomático	Normal	Normal	Normal	

* CN, ceguera nocturna; CV, campo visual; AV, agudeza visual (OD, ojo derecho; OI, ojo izquierdo); ERG, electroretinograma (B, bastones; C, conos; M, mixto; ab., abolido).

La siguiente página contiene los resultados detallados de pruebas oftalmológicas (Campimetría; Electroretinograma; Funduscopia) realizadas a individuos sanos, afectados de RP y portadores de mutación asintomáticos. Los resultados de estas pruebas se muestran sólo en este caso debido a la particularidad de éstas mutaciones que presentan penetrancia incompleta en la familia. Además estos resultados no han sido publicados todavía.

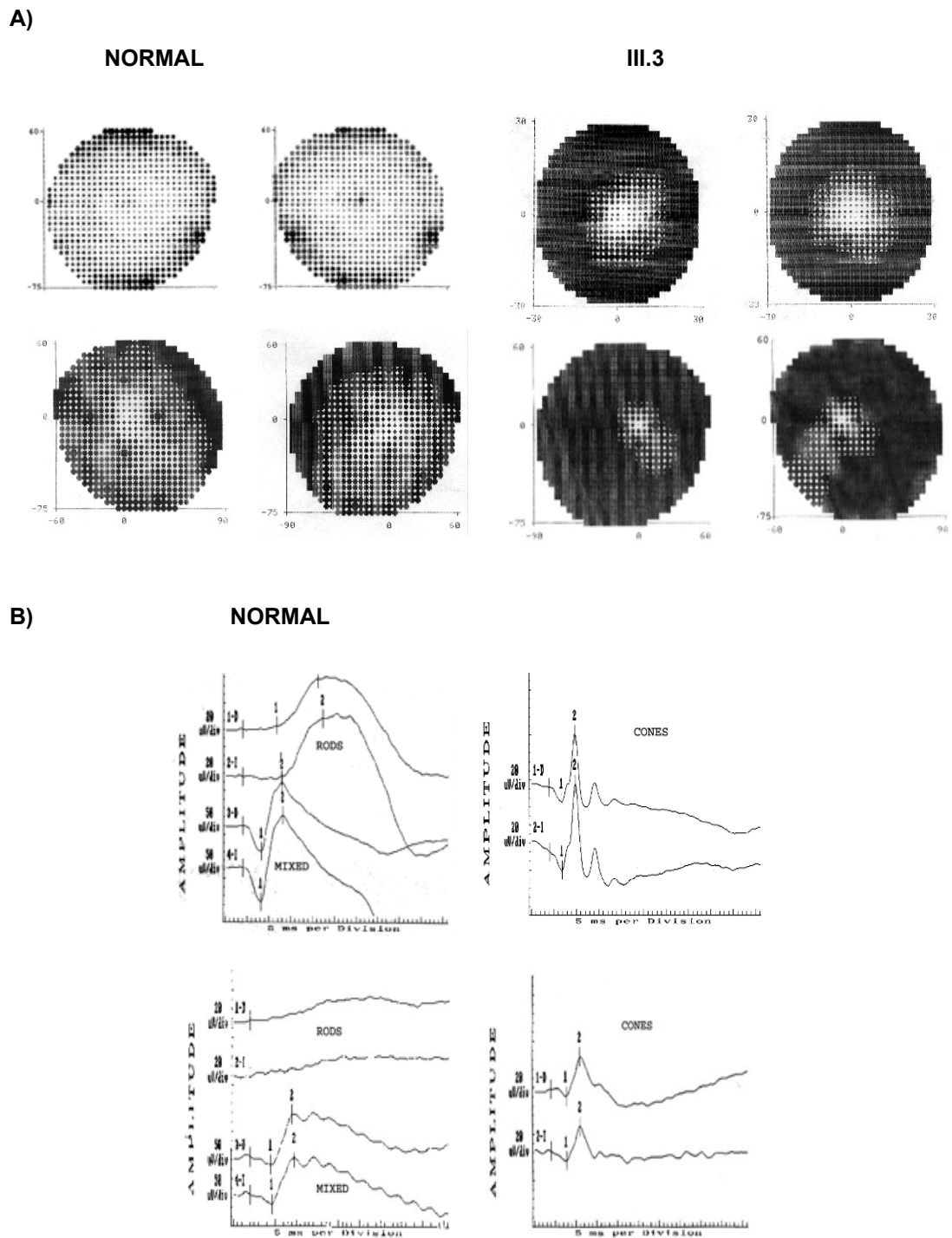
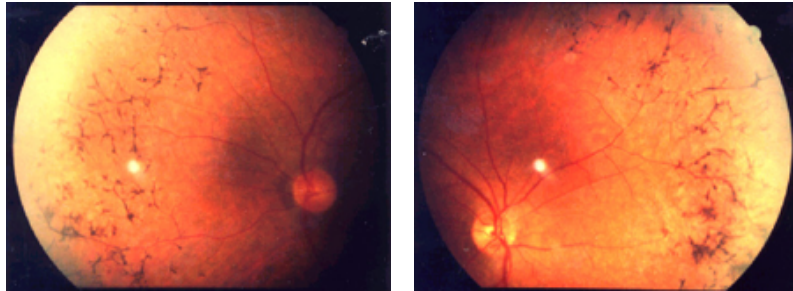
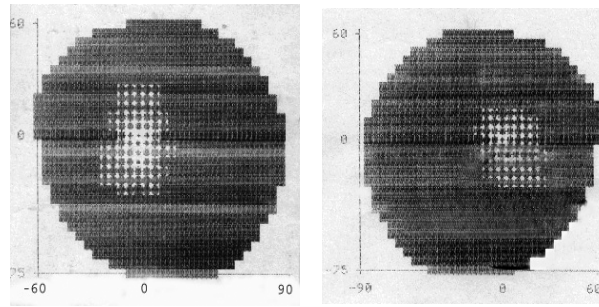


Figura 44. Variabilidad intrafamiliar en la expresión de la enfermedad producida por la mutación K705fsX712. **A.** Campos visuales de un individuo normal, y de los pacientes portadores de la mutación II.1 (72 años) y III.3 (40 años-arriba- y 42 años-abajo-). **B.** Electrorretinogramas de un individuo normal, y del paciente II.1 que a los 72 años de edad todavía muestra respuesta a la señal de conos y bastones mientras que el paciente III.3 presenta un ERG abolido (no se muestra).

II.6



III.6

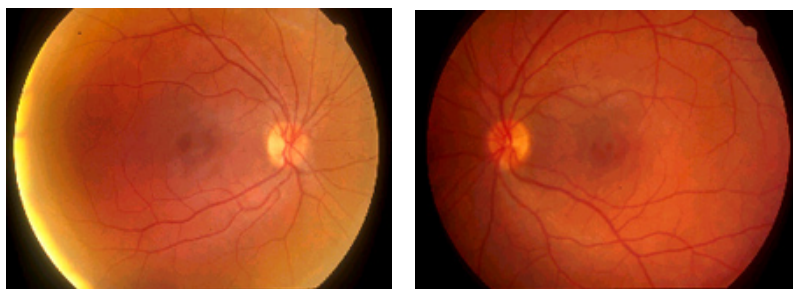
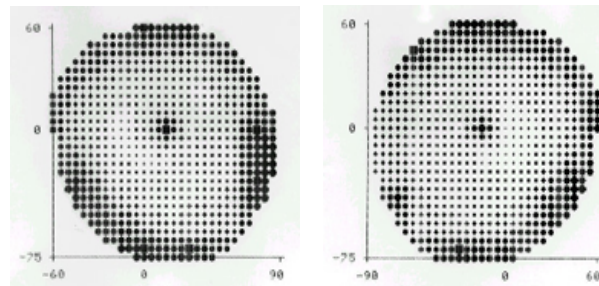


Figura 45. Variabilidad intrafamiliar en la expresión de la enfermedad producida por la mutación Q686X. Campos visuales y Fondos de ojo del paciente II.6 y el individuo asintomático III.6, ambos portadores de la mutación.