

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y TERAPIA GÉNICA DEL RATÓN *Prpf31*^{A216P/+}

Tesis Doctoral de Ana M^a Aramburu del Boz



UNIVERSIDAD DE SEVILLA, FACULTAD DE MEDICINA
CENTRO ANDALUZ DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y MEDICINA REGENERATIVA (CABIMER)

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y TERAPIA GÉNICA DEL RATÓN *Prpf31*^{A216P/+}

Tesis doctoral para optar al grado de Doctor en Medicina
Sevilla, 2015

Doctorando: Ana M^a Aramburu del Boz

Directores: Francisco J. Díaz Corrales
Shomi S. Bhattacharya
Ignacio Montero de Espinosa Escoriaza

Tutor: Francisco Murillo Cabezas



Dr. Francisco J. Díaz Corrales, Titular científico del CSIC en el Centro Andaluz de Biología molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER)

Dr. Francisco Murillo Cabezas, Profesor titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla

INFORMAN:

Que el trabajo titulado CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y TERAPIA GÉNICA DEL RATÓN *Prpf31*^{A216P/+} ha sido realizado íntegramente por Dña. Ana M^a. Aramburu del Boz bajo nuestra dirección y tutela. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Sevilla, a 19 de Junio de 2015.

Dr. Francisco J. Díaz Corrales

Dr. Francisco Murillo Cabezas

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Shomi Battacharya, por darme la oportunidad de formar parte como estudiante de doctorado en este grupo de investigación.

Al doctor Ignacio Montero, porque alimentó mi gusanillo por la investigación y me facilitó la llegada a CABIMER.

A Fran, por dirigir este trabajo, por enseñarme a pensar de otra manera, por creer en mí. Por su generosidad, por dedicarme tardes de viernes y fines de semana.

A Berta, por su ayuda, por enseñarme todo lo que sé de western blot. Por su opinión constructiva.

A Lourdes por su buena disposición y por algún que otro café y risas con Toñi.

A Dani, por su colaboración. A Andrea, la primera con la que me senté en cultivos, por su paciencia. A Mari Luz, que puso en mis manos por primera vez una pipeta y me tuvo pipeteando agua un mes.

Al resto del grupo, porque todos han aportado su granito de arena y han servido de apoyo o ejemplo en algún que otro momento. Al personal técnico y administrativo de CABIMER.

A Don Jacinto Zulueta y la asociación Mácula Retina, por su interés en este grupo de investigación.

A mis padres, por su apoyo, por darme una educación. Porque cada vez que venía al laboratorio me preguntaban “pero hija cuanto te falta para terminar la tesis” y ya les puedo responder.

A Gonzalo, porque es el mejor compañero que se puede tener.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	xv
RESÚMEN.....	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DE LA RETINA.....	3
1.1.1 Desarrollo de la retina.....	3
1.1.2 Estructura de la retina.....	4
1.1.3 Ciclo visual.....	9
1.2 RETINOSIS PIGMENTARIA.....	13
1.2.1 Características clínicas de la enfermedad.....	13
1.2.2 Patrones de herencia de la RP.....	17
1.2.3 Defectos genéticos que causan RP.....	20
1.2.4 Opciones terapéuticas.....	23
1.3 PRPF 31.....	28
1.3.1 Estructura del gen y de la proteína.....	28
1.3.2 Mutaciones en <i>PRPF31</i> asociadas a RPad.....	29
1.3.3 Modelos animales para <i>PRPF31</i>	29
1.3.4 Otras enfermedades causadas por mutaciones en <i>PRPF31</i>	30
1.4 TERAPIA GÉNICA.....	33
1.4.1 Generalidades.....	33
1.4.2 Terapia génica en distrofias retinianas.....	35
1.4.3 Idoneidad del ojo para terapia génica.....	39
1.4.4 Vectores.....	39
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	49
2.1 JUSTIFICACIÓN.....	51
2.2 HIPÓTESIS.....	52
2.3 OBJETIVOS.....	53
2.3.1 Objetivos generales.....	53
2.3.2 Objetivos específicos.....	53

3. MATERIALES Y MÉTODOS	55
3.1 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	57
3.1.1 Consideraciones éticas.....	57
3.1.2 Genotipado y mantenimiento de la colonia.....	57
3.1.3 Funduscopia.....	58
3.1.4 Test optomotor	58
3.1.5 Electrorretinograma.....	60
3.1.6 Tomografía de coherencia óptica.....	63
3.1.7 Histología	64
3.1.8 Western Blot.....	65
3.1.9 Exposición a una fuente de luz intensa y electroporación.....	66
3.2 EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD Y EFICACIA DE LA TERAPIA GÉNICA	68
3.2.1 Producción, concentración y purificación de los vectores virales.....	68
3.2.2 Evaluación de la capacidad de transfección y citotoxicidad del vector AAV-2-PRPF31 en cultivo celular.....	70
3.2.3 Inyección subretiniana.....	70
3.2.4 Evaluación de los aniales tras la inyección.....	71
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	72
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
4.1 FENOTIPADO DE LOS RATONES MUTANTES KI	75
4.1.1 Los ratones <i>Prpf31</i> ^{A216P/+} KI presentan un fundus similar al descrito en otros modelos de degeneración macular asociada a la edad.....	75
4.1.2 La visión espacial en los ratones <i>Prpf31</i> ^{A216P/+} KI esta marcadamente afectada.....	76
4.1.3 la amplitud de la onda c del erg disminuye significativamente en los ratones <i>Prpf31</i> ^{A216P/+} KI.....	78
4.1.4 Los ratones KI muestran disminución del espesor retiniano e hiperreflectividad del EPR.....	79
4.1.5 Los ratones <i>Prpf31</i> ^{A216P/+} KI presentan atrofia del EPR y de la CPI de la retina.....	80
4.1.6 Los ratones <i>Prpf31</i> ^{A216P/+} KI presentan vacuolización del EPR y engrosamiento de la membrana de Bruch.....	81
4.1.7 Los ratones <i>Prpf31</i> ^{A216P/+} KI tienen acumulación de lipofucsina en las células del EPR.....	82
4.1.8 Acúmulos drusenoides se observaron en la retina de los ratones <i>Prpf31</i> ^{A216P/+} KI.....	83
4.1.9 La exposición a la luz induce daño sobre los conos en el ratón <i>Prpf31</i> ^{A216P/+} KI.....	85
4.1.10 La proteína PRPF31 se expresa altamente en el EPR de ratones y humanos.....	86
4.1.11 La disminución de la expresión del <i>Prpf31</i> en los ratones mutantes afecta a la maduración del Rpe65.....	87

4.2 EFICIENCIA DE LA LIBERACION DEL GEN <i>PRPF31</i> EN LA RETINA DE RATONES	93
4.2.1 La liberación del gen <i>PRPF31</i> en el espacio subretiniano de ratones <i>Prpf31^{A216/+}</i> restaura los niveles de expresión de RPE65.....	93
4.2.2 Producción, purificación y concentración de los AAV2.....	94
4.2.3 El transgen <i>PRPF31</i> se expresa adecuadamente a nivel nuclear <i>in vitro</i>	95
4.2.4 La sobre-expresión del gen <i>PRPF31</i> utilizando AAV2 como vector no produce citotoxicidad ni apoptosis <i>in vitro</i>	96
4.2.5 El transgen <i>PRPF31</i> humano administrado con AAV2 se expresa principalmente en el EPR de los ratones <i>Prpf31^{A216P/+}</i>	96
4.2.6 La expresión del transgen <i>PRPF31</i> humano administrado con AAV2 no produce ninguna mejoría en la visión espacial de los ratones <i>Prpf31^{A216P/+}</i>	98
4.2.7 La expresión del transgen <i>PRPF31</i> humano administrado con AAV2 no produce mejoría en la amplitud de la onda c de los ratones <i>Prpf31^{A216P/+}</i>	99
4.2.8 La expresión del transgen <i>PRPF31</i> humano administrado con AAV2 disminuye la amplitud de la onda a y b de los ratones <i>Prpf31^{A216P/+}</i>	100
4.2.9 La expresión del transgen <i>PRPF31</i> humano administrado con AAV2 produce infiltración de macrófagos en los ratones <i>Prpf31^{A216P/+}</i>	101
4.2.10 la expresión del transgen utilizando nanopartículas es efectiva para recuperar la visión espacial en los ratones mutantes	101
5. CONCLUSIONES	103
6. BIBLIOGRAFÍA	107
7. ANEXOS	119

ABREVIATURAS

aa: aminoácidos	Lx: lux
AAV: virus adenoasociado	mV: mili-voltios
ADA: adenosinadesaminasa	μl: microlitros
ADN: ácido dextrorribonucleico	μV: microvoltios
AFG: angiofluoresceingrafía	nm: nanómetros
AG: atrofia geográfica	OCT: tomografía de coherencia óptica
ARN: ácido ribonucleico	OKR: reflejo optoquinético
ARNi: ARN interferente	OP's: potenciales oscilatorios
ARNm: ARN mensajero	OS: segmento externo (del fotorreceptor)
ATP: adenosintrifosfato	Pb: pares de bases.
CARE: elemento de replicación activado en cis	PBS: tampón fosfato salino
cd·s·m ² : candelas por metro cuadrado	PDE: fosfodiesterasa
CNE: capa nuclear externa	PDEF: factor derivado del EPR
CNI: capa nuclear interna	<i>PRPF31</i> : factor de pre-procesamiento del pre-ARNm homólogo de factor de 31 (gen humano)
CPE: capa plexiforme externa	PRPF31: factor de pre-procesamiento del pre-ARNm homólogo de factor de 31 (proteína humana)
CPI: capa plexiforme interna	<i>Prpf31</i> : factor de pre-procesamiento del pre-ARNm homólogo de factor de 31 (gen animal)
CV: campo visual	Prpf31: factor de pre-procesamiento del pre-ARNm homólogo de factor de 31 (proteína animal)
DAB: diaminobenzidina	pv: partículas virales
DHA: ácido decosaheptaenoico	<i>RDS</i> : gen de la periferina
DMAE: degeneración macular asociada a la edad	<i>RHO</i> : gen de la rodopsina
EGFP: proteína verde fluorescente humanizada	ROS: radicales libres de oxígeno
EMQ: edema macular quístico	RP: retinosis pigmentaria
EPR: epitelio pigmentario de la retina	RPad: RP autosómica dominante
ERG: electroretinograma	RPar: RP autosómica recesiva
GDP: guanidil fosfato	<i>RPGR</i> : gen regulador de la GTPasa
GMPc: monofosfato cíclico de guanidina	RPx: RP ligada al cromosoma X
GTP: guanidiltrifosfato	SCID: inmunodeficiencia combinada severa
ICQ: inmunocitoquímica	snARN: ARN nuclear pequeño
Ig: inmunoglobulina	snRNP: ribonucleoproteínas
iPSC: células madre pluripotentes inducidas	VEGF: factor de crecimiento endothelial vascular
IS: segmento interno (del fotorreceptor)	VHS: virus del herpes simple
ISCEV: International Society for the Clinical Electrophysiology of Vision	WT: ratón silvestre
ITR: secuencias de repetición invertida terminal	
K ⁺ : ion potasio	
K _{ir} : canales rectificadores de entrada de potasio	
KI: ratón mutante knock-in	
KO: ratón mutante knock-out	
ITR: repetición terminal invertida	
Kb: kilo bases	
Kd: kilo daltons	
LCA: amaurosis congénita de Leber	

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1.** Desarrollo embriológico del globo ocular.
- Figura 2.** Tipos celulares de la retina.
- Figura 3.** Estructura en capas de la retina.
- Figura 4.** Capa de fibras nerviosas.
- Figura 5.** Estructura de la retina. Sinapsis.
- Figura 6.** Densidad de los fotorreceptores en función del área retiniana.
- Figura 7.** Partes de un cono y de un bastón.
- Figura 8.** Funciones del EPR.
- Figura 9.** Estructura de la opsina.
- Figura 10.** Forma cis/trans del retinal.
- Figura 11.** Fisiología del ciclo visual.
- Figura 12.** Ciclo de los retinoides.
- Figura 13.** Simulación del campo de visión reducido.
- Figura 14.** Aspecto de la retina.
- Figura 15.** Funduscopia de RP sectorial.
- Figura 16.** Catarata subcapsular posterior.
- Figura 17.** Campimetría: daño severo del campo visual, solo islote de visión central.
- Figura 18.** Respuesta electrofisiológica normal y respuesta alterada por RP.
- Figura 19.** Patrones de herencia de la retinosis pigmentaria.
- Figura 20.** Estructura de la rodopsina
- Figura 21.** Empalme del ARNm
- Figura 22.** Células transfectadas con GFPy *PRPF31*
- Figura 23.** Esquema de Argus II.
- Figura 24.** Funduscopia de paciente con implante de Argus II
- Figura 25.** Terapia génica, esquema.
- Figura 26.** Estructura de la proteína codificada por *PRPF31*.
- Figura 27.** Escisión del exón 7 en los ratones mutantes.
- Figura 28.** Retrovirus.
- Figura 29.** Herpesvirus.
- Figura 30.** Adenovirus
- Figura 31.** Virus adenoasociados.
- Figura 32.** Estructura del vector AAV2 silvestre y de expresión del gen diana.
- Figura 33.** Reacción en cadena de la polimerasa.
- Figura 34.** Gel de agarosa 1% mostrando el genotipado de los ratones KI y KO.
- Figura 35.** Test optomotor.
- Figura 36.** Pruebas de ERG que recomienda la ISCEV.
- Figura 37.** Origen de las ondas del ERG.
- Figura 38.** Relación entre onda G y KRG.
- Figura 39.** Sistema óptico del OCT.
- Figura 40.** Representación de las capas de la retina en la OCT.
- Figura 41.** Inmunofluorescencia. Marcaje en IFI.
- Figura 42.** Inmunofluorescencia. Corte de retina.
- Figura 43.** Western Blot. Gel sometido a campo eléctrico. Transferencia húmeda.
- Figura 44.** Marcaje con anticuerpos.
- Figura 45.** Construcción del vector viral. Gen *PRPF31* humano insertado en el vector pAAVIREs-hrGFP.
- Figura 46.** Producción y purificación de AAV-*PRPF31*.
- Figura 47.** Fases de la inyección subretiniana.
- Figura 48.** Funduscopia de un ratón WT y un ratón *Prpf31*^{A216P/+} KI de 8 meses de edad.

Figura 49. Resultados de la PCR que descarta la mutación *rd8* en los *Prpf31*^{+/-} KI.

Figura 50. Porcentaje de respuestas positivas del test optomotor en ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+} KI de 8 meses a 100%, 75% y 50% de sensibilidad al contraste.

Figura 51. Umbrales de visión espacial en ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+} KI de 2, 4 y 8 meses al 100% de sensibilidad al contraste.

Figura 52. Registro ERG y amplitud de la onda c en un ratón WT y de un ratón mutante *Prpf31*^{A216P/+} KI.

Figura 53. Cuantificación de la amplitud de las ondas b y c en el ERG de los ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+} KI y resultado del cálculo de la razón de la amplitud onda c/b.

Figura 54. Cuantificación de la onda c del ERG de los ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+} KI de 2, 4 y 6 meses de edad.

Figura 55. Imagen de OCT y mapa de espesor retiniano de un ratón WT y *Prpf31*^{A216P/+} KI. Mapas de espesor retiniano.

Figura 56. Cuantificación del espesor retiniano y de la reflectividad del EPR/C en ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+} KI.

Figura 57. Cortes histológicos de la retina y sección tangencial del EPR teñidos con hematoxilina-eosina de ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+} KI. Inmunofluorescencia de EPR marcado con RPE65.

Figura 58. Microscopía electrónica del EPR en un ratón WT y un ratón *Prpf31*^{A216P/+} KI.

Figura 59. Auto-fluorescencia (verde) del EPR de un ratón WT y *Prpf31*^{A216P/+} KI.

Figura 60. Tinción de carbolfucsina de Kinyoun y ácido pícrico del AFIP para detección de lipofucsina en un ratón WT y en un ratón *Prpf31*^{A216P/+} KI.

Figura 61. Tinción de las lesiones drusenoides en un ratón *Prpf31*^{A216P/+} KI.

Figura 62. Morfología de la retina en ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI antes y después de exposición a una fuente de luz intensa durante 5 días.

Figura 63. Registro ERG del ratón WT *Prpf31*^{A216P/+} KI pre y post-exposición a la luz intensa por 5 días. Cuantificación de la amplitud de la onda b del ERG.

Figura 64. Inmunocitoquímica de la retina de ratón WT CD1 mostrando expresión de la proteína Prpf31 en el EPR.

Figura 65. WB para determinar la expresión de Prpf31 en la retina neural y EPR de cada ojo de un ratón C57 WT. EPR= epitelio pigmentario de la retina.

Figura 66. IF de la proteína PRPF31 en retina de un donante humano y WB de la retina neural y EPR de dos muestras de donante humano sano.

Figura 67. WB de Prpf31 y RPE65 de un ratón WT y de dos ratones mutantes uno sin fenotipo en el fondo de ojo y otro con depósitos drusenoides. RT-PCR del RPE65 de un ratón WT y otro mutante con fenotipo.

Figura 68. Expresión del RPE65 por *real time* PCR en ratones WT y mutantes en condiciones de luz y oscuridad.

Figura 74. Expresión del transgen *PRPF31* en ratones *Prpf31*^{A216P/+} 4 a 6 meses después de la inyección con los virus AAV2-*PRPF31*. Los ratones también fueron inyectados con PBS solo (control del vehículo) y con los virus AAV2-GFP (control del vector). La evaluación de la expresión del transgen se realizó por medio de la observación de fluorescencia de GFP en el fundus (A-C), en los cortes histológicos (D-F) y por WB (G-H) utilizando anticuerpos anti-*PRPF31* y anti-Flag.

Figura 75. Porcentaje de respuestas positivas del test optomotor en ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+} KI 6 meses después de haber sido inyectados en el espacio sub-retiniano con PBS, AAV2-GFP o AAV2-*PRPF31*.

Figura 76. Amplitud de la onda c en ratones WT y ratones *Prpf31*^{A216P/+} inyectados con PBS, AAV2-GFP y AAV2-*PRPF31*. Cuantificación de la onda c del ERG de los ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+}.

Tabla 1. Genes causantes de RP identificados hasta la fecha.

Tabla 2. Mutaciones en *PRPF31* encontradas en familias con RPad.

Tabla 3. Ensayos clínicos en enfermedades oculares en curso basados en terapia génica.

Tabla 4. Resumen de las características fenotípicas de algunos de los principales modelos murinos de DMAE seca y comparación con el modelo *Prpf31*^{A216p/+} KI.

RESÚMEN

El término Retinosis Pigmentaria (RP) engloba a un grupo de enfermedades hereditarias de la retina, caracterizadas por una degeneración progresiva de los fotorreceptores, que comienza con la muerte celular de los bastones seguidos de los conos, resultando una discapacidad visual que puede llegar a ser absoluta. Es una condición muy heterogénea, tanto fenotípica como genéticamente. En conjunto, este grupo de trastornos de la retina, representa la forma hereditaria más común de discapacidad visual en el hombre, con una prevalencia estimada de 1 de cada 3.000 a 1 de cada 5.000 personas en el mundo.

La RP se puede heredar de modo autosómico dominante (RPad), recesivo o rasgo recesivo ligado a X. Hasta ahora se han identificado más de 80 genes asociados con la enfermedad, la mayoría de ellos relacionados con el ciclo visual; sin embargo, algunos de los genes asociados a la RP no son específicos de la retina y se expresan de manera ubicua en todo el organismo, como son *PRPF3*, *PRPF8*, *PRPF31* y *PRPF4*, que codifican proteínas esenciales la maduración del pre-ARNm, un proceso denominado splicing. Mutaciones en estos genes son responsables del 12% de los casos de RPad. Uno de ellos, *PRPF31* es el gen causante de RP con penetrancia incompleta RP11 y el más común de estos factores asociado a RP. La preponderancia de mutaciones que producen proteínas truncadas en RP11 sugiere la haploinsuficiencia como base fisiopatológica. Esta idea se refuerza porque aparece penetrancia incompleta en relación al nivel de expresión del alelo silvestre.

Para el estudio de la patología molecular de la enfermedad y la formulación de futuras terapias, se han sido diseñados modelos de ratón apropiados. La estrategia utilizada para la generación de mutantes *PRPF31* fue la utilización de un constructo recombinante por mutagénesis dirigida que podría dar lugar a dos tipos de modelos de ratón. El primero es un modelo de mutación puntual que imita el cambio de patógenos A216P identificado en una de las familias con RP11. La homología entre el ratón y las proteínas *PRPF31* humanas es del 99% y el aminoácido en posición 216 está altamente conservado en todas las especie. El vector que porta la mutación puntual en el exón 7 (A216P) fue desarrollado de tal manera que dos sitios loxP flanquean el exón 7, lo que permite la eliminación de este fragmento con la recombinasa Cre. El modelo de ratón knock-in ya ha sido analizado hasta la edad de 12 meses. Hasta el momento se han observado algunos cambios en la histología de la retina como vacuolización y acúmulo de material amorfo entre el epitelio pigmentario y la membrana de Bruch.

La RP se caracteriza por una degeneración progresiva de los fotorreceptores, sin embargo las alteraciones observadas hasta la fecha en el modelo *Prpf31*^{A216P/+} knock-in no han mostrado un fenotipo claro de degeneración de los fotorreceptores, sino cambios a nivel del epitelio pigmentario. Por ello profundizamos en la caracterización fonotípica de este modelo animal y nuestros resultados muestran un fenotipo claro de degeneración del epitelio pigmentario con presencia de lesiones drusenoides en la retina, adelgazamiento del espesor retiniano medido por OCT, disminución de la amplitud de la onda c del electroretinograma y disminución de la visión espacial medida con el test optomotor. Curiosamente, observamos estas alteraciones que se asemejan más con las descritas en otros modelos animales de degeneración macular asociada a la edad.

Por otro lado, no existe un tratamiento eficaz que pueda prevenir o revertir la pérdida de la visión asociada a RP. Sin embargo, en humanos y en modelos animales, la introducción en el ojo de genes funcionales usando vectores virales (terapia de sustitución génica) restauró la visión de forma notable en una forma recesiva de Amaurosis Congénita de Leber causada por mutaciones en el gen *RPE65*. Esto abre las puertas a la posibilidad de restaurar la visión en otras degeneraciones de fotorreceptores como es el caso de la RP causada por mutaciones en el gen *PRPF31*.

Los vectores son sistemas que ayudan en el proceso de transferencia de un gen exógeno a la célula, facilitando la entrada y biodisponibilidad intracelular del mismo, de tal modo que este pueda funcionar correctamente. Existen vectores orgánicos e inorgánicos. Todos los virus se unen a sus células diana e introducen su material genético en la célula huésped como parte de su ciclo de replicación. Gracias a esta capacidad los virus pueden ser utilizados como vehículos para transferir genes 'sanos' a una célula humana. El virus adenoasociado (AAV) es un virus muy pequeño, no autónomo, que contiene ADN lineal de cadena sencilla. AAV es de particular interés para la terapia génica debido a su limitada capacidad aparente para inducir respuestas inmunitarias en el ser humano, un factor que debe influir positivamente en la eficiencia de la transducción de vectores y reducir el riesgo de cualquier patología inmunológica asociada.

Realizamos terapia génica en el ratón *Prpf31^{A216P/+}* knock-in mediante inyección subretiniana con el vector AAV2 portando el trasgen *PRPF31*. Realizamos seguimiento de los animales durante 6 meses y logramos una adecuada expresión del gen a nivel del epitelio pigmentario de los ratones. Sin embargo no observamos mejoría de la visión espacial ni recuperación de la amplitud de la onda c. En estudios histológicos visualizamos infiltrados de células similares a macrófagos en el sitio de la inyección, donde se observó que la capa de fotorreceptores presentaba un aspecto atrófico con pocas capas de núcleos en la capa nuclear externa de la retina. Sin embargo con el uso de vectores no virales se observó recuperación de la visión espacial y disminución de la atrofia de la retina en el seguimiento a un mes. Esto es una prueba de concepto de que la terapia génica utilizando *PRPF31* podría tener un efecto terapéutico en el manejo de esta distrofia retiniana.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DE LA RETINA

La anatomía y fisiología del ojo son temas muy extensos, por lo que en esta introducción se va a realizar una breve revisión sobre algunos aspectos relevantes que serán útiles para comprender la tesis y sus conclusiones.

1.1.1 DESARROLLO DE LA RETINA

El desarrollo del ojo es un proceso complejo en el que intervienen diversos tejidos (Fig. 1). En el embrión humano, aproximadamente a los 25 días después de la fecundación, los ojos se aprecian como unas vesículas pareadas conformadas por una evaginación del diencefalo del tubo neural (Fig. 1a). Al principio, estas vesículas se encuentran adyacentes al ectodermo, posteriormente se interpone una capa de células mesenquimatosas (procedentes del mesodermo) y las vesículas se desplazan caudalmente. La vesícula óptica se pliega sobre sí misma convirtiéndose en la excavación óptica y el ectodermo del cristalino se invagina en la vesícula (Fig. 1b). Hacia el día 34 las dos capas de tejido resultantes de la excavación constituyen el esbozo del epitelio pigmentario de la retina (EPR) y la retina neurosensorial, con la vesícula

del cristalino completamente formada y en el interior de la excavación (Fig. 1c). La esclera y la coroides son de origen mesodérmico¹. En una fase posterior del desarrollo de la retina se generan las diversas clases de células gliales y neuronales (Fig. 2). Los diferentes tipos de células de la retina originados por las células progenitoras no son producidas al mismo tiempo. Las células ganglionares de la retina son las primeras que se generan. A continuación se diferencian los otros grupos celulares en una secuencia regular. Mediante marcaje con timidina² se ha observado que en conjunto, las clases de células se pueden dividir en dos fases de generación. En la primera se generan las células ganglionares, los conos y las células horizontales. En la segunda fase de la histogénesis, las células progenitoras generan los bastones, las células de la

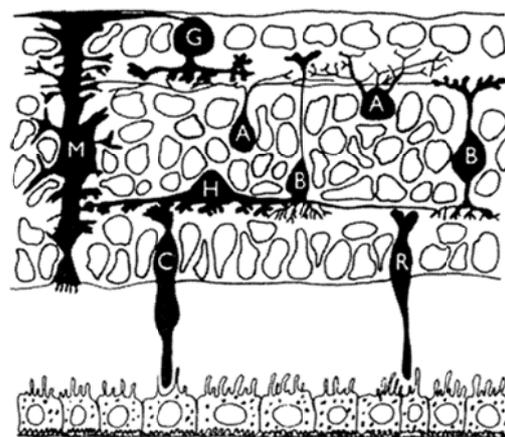
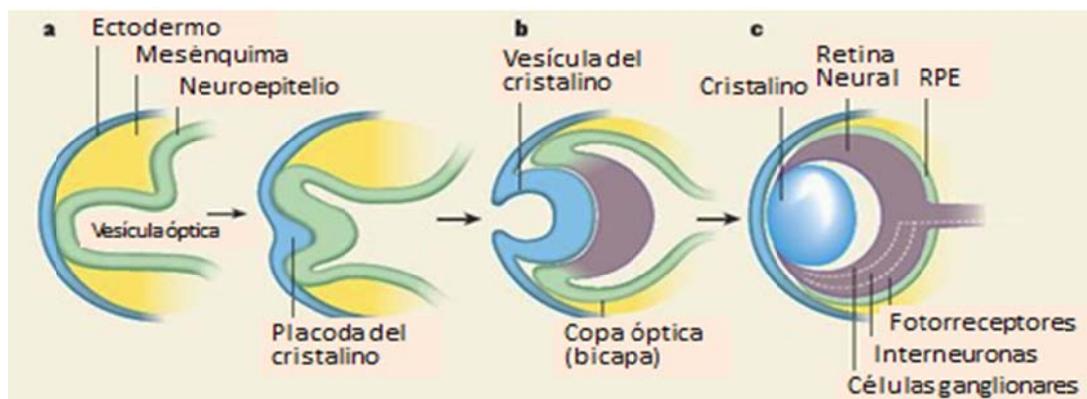


Figura 2. Tipos celulares de la retina A) Células amacrinas. B) Células bipolares. C) Conos. G) Células ganglionares. H) Células horizontales. M) Células de Müller. R) Bastones



glía de Müller y las células bipolares. El caso de las células amacrinas no está tan claro, pero parece que se generan principalmente en la segunda fase.

Hay que señalar que desde el centro hasta la periferia el gradiente de histogénesis varía, y que la retina periférica puede estar en la primera fase cuando la retina central ya está generando tipos de células tardías¹. Los bastones y el EPR culminan su desarrollo post-natalmente.

1.1.2 ESTRUCTURA DE LA RETINA

ESTRUCTURA EN CAPAS DE LA RETINA

La retina está estructurada en diez capas celulares paralelas. Existen dos capas plexiformes o sinápticas intercaladas en tres capas neuronales o nucleares. Así, de capa más interna a capa más externa distinguimos (Fig. 3):

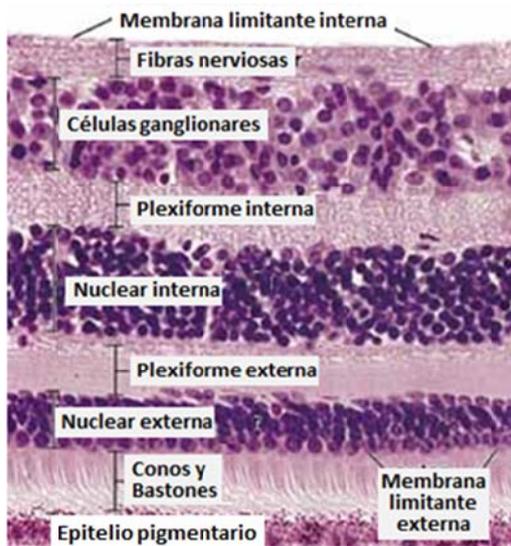


Figura 3. Estructura en capas de la retina.

1. Membrana limitante interna

Está formada por uniones de las prolongaciones terminales de las células de Müller, que se extienden lateralmente, y una membrana basal. Separa la retina del humor vítreo.

2. Capa de fibras nerviosas

Formada por los axones de las células ganglionares, que convergen en el disco óptico o papila (Fig. 4).

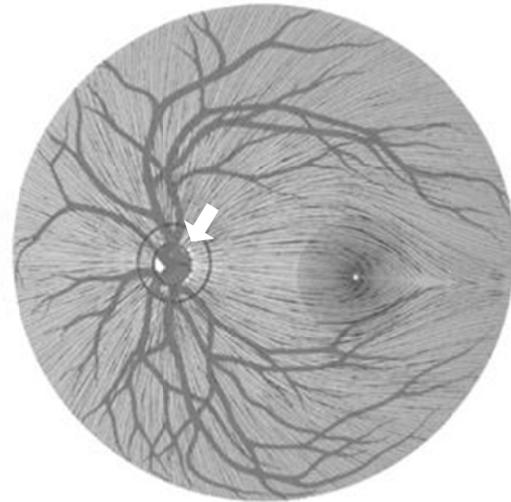


Figura 4. Capa de fibras nerviosas. Flecha: Disco óptico.

3. Capa de células ganglionares

Contiene los cuerpos de las células ganglionares.

4. Capa plexiforme interna

Está conformada por las conexiones sinápticas entre las células amacrinas y bipolares con las células ganglionares.

5. Capa nuclear interna

Contiene los núcleos de las células horizontales, bipolares, amacrinas y de Müller.

6. Capa plexiforme externa

Está compuesta por las sinapsis entre las células horizontales, bipolares y los fotorreceptores.

7. Capa nuclear externa

Formada por los cuerpos de los fotorreceptores.

8. Membrana limitante externa

Es una membrana virtual formada por las uniones entre los segmentos internos de los fotorreceptores con las células de Müller. Esta estructura actúa como barrera metabólica ante el paso de moléculas de gran tamaño³.

9. Capa de fotorreceptores

Es la capa más externa de la retina neurosensorial. Está formada por los segmentos internos (IS) y externos (OS) de los fotorreceptores, dentro de los cuales se distinguen dos tipos diferentes: conos, que representan un 5% del total, y bastones, un 95%.

10. EPR

El EPR es adyacente a los OS de los fotorreceptores de la retina y está anclado a la coroides subyacente a través de la membrana de Bruch.

A continuación se encuentra una capa vascular, que es la coroides. En su cara más interna existe una lámina elástica de unas 2 – 4 micras de espesor que se conoce como membrana de Bruch. Compuesta fundamentalmente de colágeno, esta capa se engruesa con la edad, ralentizando el transporte de metabolitos y productos de desecho desde el EPR hacia la coroides y pudiendo originar la acumulación de depósitos y formación de drusas.

TIPOS DE CÉLULAS RETINIANAS

Desde las investigaciones de Ramón y Cajal a principios del siglo XX⁴ se sabe que la retina de los vertebrados contiene cinco tipos principales de neuronas. Los fotorreceptores (conos y bastones) transforman los estímulos luminosos en señales químicas y eléctricas. Las células bipolares contactan con los fotorreceptores y transmiten las señales de la retina externa hacia la interna. Esta transmisión de los fotorreceptores está

modulada por las células horizontales, que son interneuronas que se extienden lateralmente y que también contactan con las bipolares. En la retina interna, las células bipolares hacen sinapsis con su objetivo principal, las células ganglionares. La información de la luz sale de la retina a través de los axones de las células ganglionares, que van a formar el nervio óptico. Las células amacrinas son interneuronas que modulan los procesos de impulsos nerviosos, estableciendo contacto entre células bipolares y ganglionares. De esta manera las células bipolares son reguladas por las células amacrinas.

Las células de Müller orientadas de forma radial, son las células gliales predominantes. Son células estructurales de sostén y encargadas de la nutrición de los IS de los fotorreceptores y la generación de impulsos nerviosos. Actúan como reservorio iónico durante la hiperpolarización del fotorreceptor por la luz.

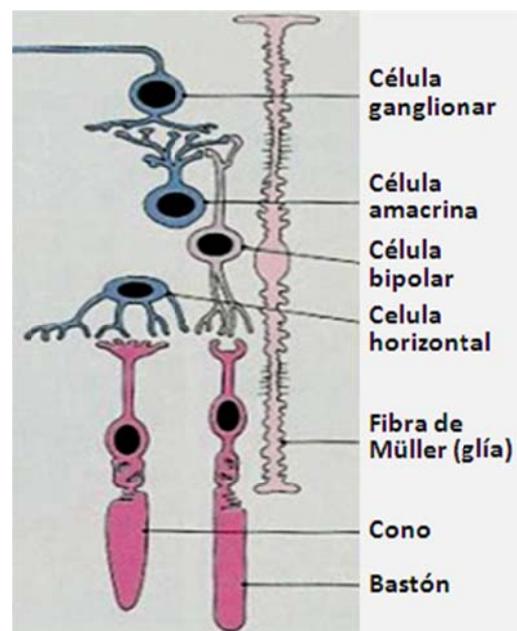


Figura 5. Estructura de la retina. Sinapsis.

El circuito retiniano (Fig. 5) más simple es una cadena vertical de tres neuronas: del fotorreceptor a la célula bipolar y de ella a la ganglionar. Los axones de las células ganglionares convergen en el

nervio óptico, que lleva toda la información visual a los centros superiores. Además de esta vía vertical existen dos clases de interneuronas laterales, las células horizontales de la capa plexiforme externa y las células amacrinas de la plexiforme interna. En líneas generales, la función de las neuronas laterales es modelar las repuestas de los elementos verticales en la retina⁵.

Para la mejor comprensión de esta tesis cabe profundizar en dos tipos celulares: los fotorreceptores y las células del EPR.

Fotorreceptores:

Los **conos** reciben este nombre por la forma conoidea que tiene su OS. Estas células son las responsables de la visión en colores (visión fotópica o en condiciones normales de iluminación). En la zona central de la retina (fóvea), sólo hay conos (no bastones) y su número desciende a medida que nos acercamos a la periferia (Fig. 6)

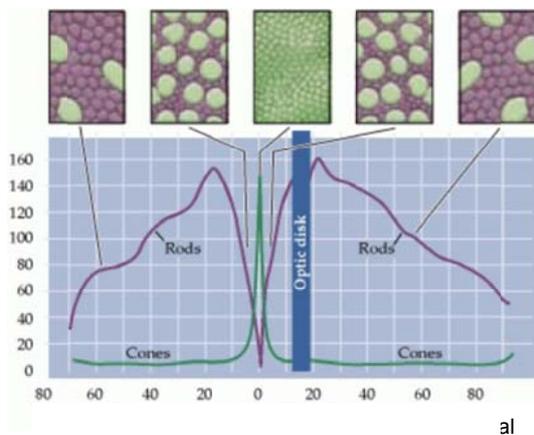


Figura 6. Densidad de los fotorreceptores en función del área retiniana.

En la especie humana y en muchos otros primates existen tres tipos de conos, cada uno de ellos es sensible de forma selectiva a la luz de una longitud de onda determinada: verde, roja o azul. Esta sensibilidad específica se debe a la

presencia de tres sustancias llamadas opsinas:

- La eritropsina tiene mayor sensibilidad para las longitudes de onda largas, de alrededor de 560 nm (luz roja).
- La cloropsina para longitudes de onda de unos 530 nm (luz verde).
- La cianopsina tiene mayor sensibilidad para las longitudes de onda pequeñas, de unos 430 nm (luz azul).

Los **bastones** son muy sensibles, capaces de detectar la energía de un sólo fotón y responsables por tanto de que sea posible la visión en condiciones de poca luminosidad (escotópica). Presentan una elevada sensibilidad a la luz aunque se saturan en condiciones de mucha luminosidad y no detectan los colores. Se ubican en casi toda la retina exceptuando la fóvea. Contienen rodopsina, que es una proteína que presenta una mayor sensibilidad a las longitudes de onda cercanas a 500nm, es decir, a la luz verde azulada.

Los bastones responden a los estímulos que alcanzan un área general, no tienen capacidad para separar los pequeños detalles de la imagen visual. La diferente localización y estructura de estas células conduce a la división del campo visual del ojo en una pequeña región central de gran agudeza y una zona periférica de menor agudeza, pero con gran sensibilidad a la luz. Así, durante la noche, los objetos se pueden ver por la parte periférica de la retina cuando son invisibles para la fóvea central.

Los bastones son más delgados que los conos, el diámetro de sus IS es de aproximadamente 2 micras. Los OS de los bastones están formados por discos membranosos aislados de la membrana plasmática, donde se encuentra la rodopsina. Estos discos están continuamente renovándose. Los discos antiguos se van desplazando hacia el EPR, donde son fagocitados y

convertidos en fagosomas durante el ciclo diurno, sobre todo al amanecer.

Ambos tipos celulares muestran la misma organización estructural básica (Fig. 7). Son células alargadas y la disposición de sus componentes citoplasmáticos es tal que diferentes funciones tienen lugar en puntos específicos en toda su longitud.

La estructura del fotorreceptor consta de:

Un OS, que es la porción de la célula sensible a la luz y que está constituido por una pila de discos huecos, cuyas membranas contienen las moléculas del pigmento visual.

Una región estrecha denominada cilio, que es una estructura tubular que conecta el segmento externo y el interno.

Un IS, porción de fabricación de la célula, se divide en dos: un elipsoide externo y un mioide interno. El elipsoide contiene mitocondrias y proporciona energía para los procesos de transducción del segmento externo; el mioide contiene cuerpos de Golgi y ribosomas para la elaboración de membranas y componentes celulares.

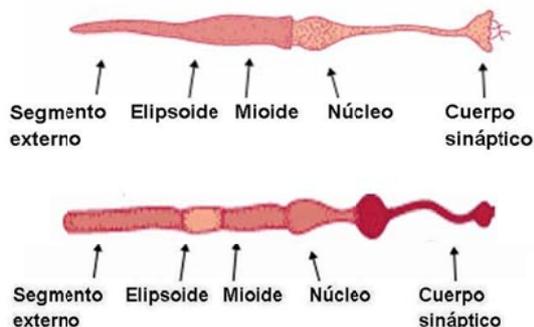


Figura 7. Partes de un cono (superior) y de un bastón (inferior).

Una fibra de conexión externa, que conecta el IS con el cuerpo de la célula. En los conos, tiende a ser corta, ya que los núcleos están situados en la porción profunda de la capa nuclear externa y cerca de la membrana limitante externa.

En los bastones, la longitud varía según la posición nuclear.

Un núcleo o cuerpo celular.

Una fibra de conexión interna, que discurre desde el núcleo a la región sináptica. En los conos esta estructura es la que se alarga en la fóvea para entrar en contacto con las neuronas intermediarias desplazadas y formar la capa de fibras de Henle.

Una región sináptica. En los bastones se denomina esférico del bastón y en los conos, pedículo de los conos. En ambas células dicha región contiene vesículas sinápticas, de forma que los neurotransmisores almacenados en ellas son liberados a la hendidura sináptica continuamente en la oscuridad. Cuando el segmento externo absorbe luz se produce la fototransducción y se dejan de liberar los neurotransmisores. Ambas células contienen las denominadas conexiones invaginadas conectándolas con componentes de neuronas intermediarias profundas con respecto a la superficie de su sinapsis. Estas sinapsis invaginadas se denominan "tríadas" porque contienen tres procesos; generalmente, uno de una célula bipolar y dos de células horizontales. Los bastones tienen una sola tríada, mientras que los conos pueden tener hasta veinte.

Células del EPR

La función de las células del EPR es apoyar y mantener los fotorreceptores suprayacentes, y con este fin sustenta cinco procesos principales: la absorción de la luz dispersa, el transporte activo de metabolitos, la provisión de una barrera hematorretiniana, la regeneración de los pigmentos visuales y la fagocitosis.

Las células del EPR suelen ser hexagonales y están encajadas a modo de empedrado en una ordenación regular (Fig. 8). Estas células poseen gránulos de melanina que aumentan la efectividad

del fotorreceptor al absorber la luz dispersa; impide la reflexión de la luz, dando mayor nitidez y contraste a la imagen. Es crucial para la captura, almacenamiento y movilización de la vitamina A que participa en el ciclo visual. Sin embargo, puede haber desigualdades en la pigmentación así como irregularidades en la cantidad y distribución de la melanina en cada célula.

Las células epiteliales se mantienen unidas por fijaciones ultraestructurales especializadas entre las membranas de las células adyacentes. Estas áreas de unión sellan el espacio intercelular lateral desde el espacio subretiniano y, junto a los capilares retinianos no fenestrados, constituyen la barrera hematorretiniana. Esta barrera impide el intercambio libre de macromoléculas entre los fotorreceptores y la circulación coroidea. Así, el movimiento molecular tiene lugar fundamentalmente a través de las células epiteliales pigmentarias y, por consiguiente, es regulado por las vías metabólicas de estas células (Fig.8). Los mecanismos de transporte iónico dentro de las células del EPR y el paso de agua secundario son los mecanismos más importantes que contribuyen a la deshidratación fisiológica del espacio subretiniano.

El EPR contribuye a la renovación constante de los OS de los fotorreceptores mediante la fagocitosis de los discos más distales en un proceso regulado por el ritmo circadiano⁶. El EPR muestra unas características específicas asociadas al envejecimiento. La proporción de células apoptóticas en el EPR humano aumentan significativamente con la edad y se producen depósitos de material derivado de estas células que se acumulan en la membrana de Bruch. Además, aparece lipofucsina en el citoplasma, que deriva de los OS de los fotorreceptores que no se han digerido completamente, en concreto, cuando el EPR no es capaz de transformar el todo-trans-retinol en 11-cis-retinal⁶. Por todo ello, cualquier deterioro del sistema de degradación y renovación molecular provocará la aceleración de la acumulación de lipofucsina^{6,7}. A su vez, dicha lipofucsina parece tener un rol fundamental en la etiología de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), desestabilizando las células del EPR y aumentando sus susceptibilidad al daño foto-oxidativo⁶.

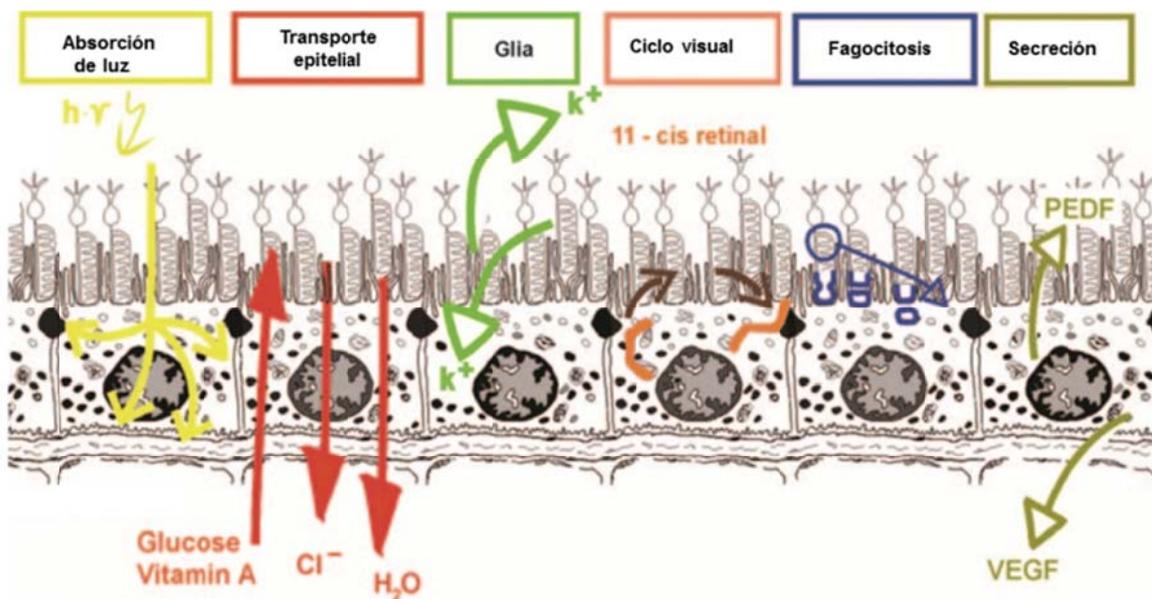


Figura 8. Funciones del EPR.

Tradicionalmente se ha hablado de retina neurosensorial (capas 1 a 9) y EPR, sin embargo podemos matizar aún más. Hablamos de retina sensorial cuando nos referimos a las neuronas de primer orden, es decir, conos y bastones. La retina neural estaría constituida por las neuronas de segundo orden, como las células bipolares. Una mutación a nivel del fotorreceptor produce el deterioro del mismo en enfermedades como la retinosis pigmentaria, en la cual el defecto se origina en los bastones pero con el tiempo afecta también a los conos. El deterioro del fotorreceptor tiene consecuencias graves para la organización de la retina que queda, ya que la retina neural requiere señales de la retina sensorial para mantener la estructura bien organizada. Cuando se desaferecia la retina neural, las neuronas de segundo orden producen nuevas dendritas y germinan profusamente, estableciendo contactos inapropiados e invadiendo otras capas (remodelación de la retina). Esto conlleva a una destrucción casi total de la estructura en capas de la retina⁵.

1.1.3 CICLO VISUAL

En los humanos el estímulo visual es la radiación luminosa del espectro que abarca unas longitudes de onda entre 400 y 760 nm, con un margen de funcionamiento muy amplio, desde la luz más brillante hasta la luz más tenue⁸. La transducción visual o fototransducción es el proceso mediante el cual un fotón de luz genera una respuesta nerviosa en los fotorreceptores^{9,10}. La rodopsina de los bastones y las opsinas de los conos son moléculas de pigmento contenidas en la porción apical de los fotorreceptores que generan una compleja cascada de reacciones enzimáticas y bioquímicas como respuesta a la luz⁹. Este proceso conlleva el cierre de los canales catiónicos de la membrana del fotorreceptor y finalmente su hiperpolarización. El sistema visual es

único en el sentido que el mecanismo de transducción implica en la membrana plasmática una hiperpolarización en vez de una despolarización, lo que significa que su potencial de membrana se vuelve más negativo. Posteriormente, la señal eléctrica se transmite hacia las células bipolares y ganglionares de la retina, para finalmente, procesar estas señales en patrones complejos que son transferidos al cuerpo geniculado lateral y de allí, a la corteza visual de los lóbulos occipitales.

EL ESTÍMULO FÍSICO Y LA PERCEPCIÓN VISUAL

La luz es la radiación electromagnética detectada por nuestros ojos. Esta radiación la podemos describir bien considerando un modelo corpuscular, bien considerando un modelo ondulatorio. En el primer caso podemos considerar que la luz está compuesta por pequeñas partículas denominadas fotones que representan unidades (cuantos) de energía. En el segundo caso la luz, al igual que cualquier otra onda, puede ser caracterizada en términos de su longitud, frecuencia y amplitud. En realidad, la luz posee propiedades tanto de partícula como de onda. Ambas características están cuantitativamente relacionadas, pues cuanto más breve sea la longitud de onda mayor es la energía¹¹. Las características de onda se aplican para entender las propiedades ópticas del ojo y las propiedades de partícula (fotón) se aplican para explicar la estimulación de los fotorreceptores.

FOTOTRANSDUCCIÓN

1. Pigmentos visuales

Los fotorreceptores pueden responder a la luz debido a que contienen altas concentraciones de pigmento visual en las membranas de los discos de sus OS. El pigmento visual de los bastones es la rodopsina (Fig. 9). La rodopsina está

formada por una proteína transmembrana llamada opsina que está unida covalentemente a un cromóforo llamado retinal derivado de la vitamina A.

La opsina es una cadena polipeptídica formada por unos 348 aminoácidos. Consta estructuralmente de tres dominios diferenciados: el dominio citoplasmático, donde se produce la transducción de la señal luminosa, el dominio transmembrana y el dominio extracelular¹².

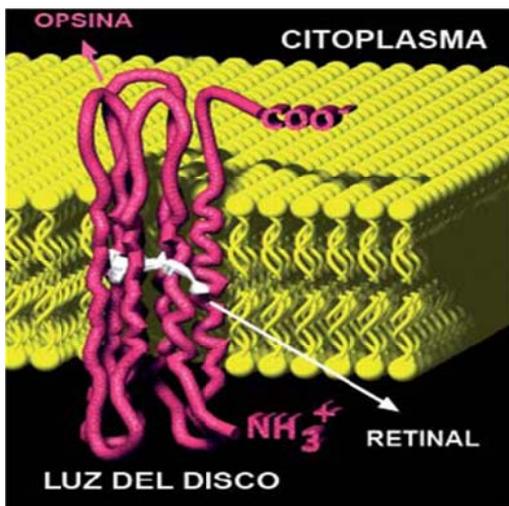


Figura 9. Estructura de la opsina.

El retinal es la parte sensible a la luz y presenta dos conformaciones: una forma cis y una forma trans (Fig. 10). En la oscuridad, el retinal se encuentra en la forma cis, pero cuando un fotón de luz es absorbido, rápidamente cambia a la forma trans, variando no solo la conformación del retinal sino también de la opsina. Este proceso se llama isomerización¹³

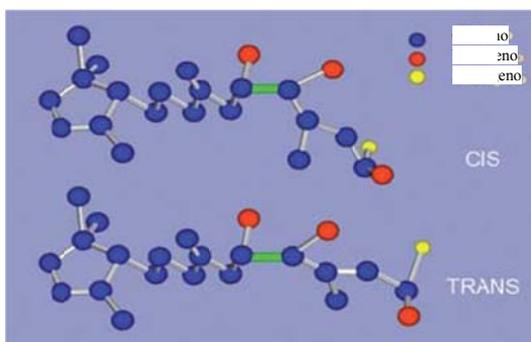


Figura 10. Forma cis/trans del retinal.

2. Oscuridad

El GMPc (monofosfato cíclico de guanidina) es una molécula central en la transducción visual, que actúa como segundo mensajero. Todos los aspectos de señalización de esta cascada catalítica están dominados por el balance entre la síntesis y degradación de esta sustancia en el citoplasma del OS del fotorreceptor. La cantidad de GMPc libre es constantemente monitorizada por unos canales catiónicos localizados en la membrana plasmática del OS¹⁴.

En ausencia de luz el 11-cis-retinal está unido a la rodopsina en los bastones y los niveles de GMPc son relativamente elevados. Dicho GMPc se une a la superficie interna de los canales de sodio y los abre. Se origina de esta forma la denominada corriente oscura que da como resultado la despolarización del fotorreceptor (Fig.12). Es decir, hace más positivo el potencial de membrana del fotorreceptor (-40 mV) y se abren los canales de Ca²⁺ con la consiguiente entrada de estos iones en el interior celular¹⁵. La despolarización del fotorreceptor permite la liberación continua del neurotransmisor glutamato.

3. Luz: activación y amplificación de la cascada

La luz causa la isomerización del retinal, que pasa de 11-cis a la conformación todo-trans y activa la rodopsina. La rodopsina activada (metarrodopsina) cataliza el intercambio de los nucleótidos GDP (guanosildifosfato) por GTP (guanosiltrifosfato) de una proteína G denominada transducina¹⁶, a la que se une formando un megacomplejo. Esto ocurre en el OS del fotorreceptor. Las proteínas G son un grupo de proteínas encargadas de enviar señales desde los receptores de membrana activados (en este caso rodopsina) a las enzimas y a los canales en numerosos procesos sensoriales y hormonales.

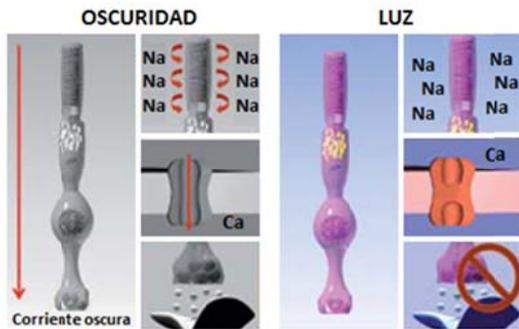


Figura 11. Fisiología del ciclo visual.

La transducina consta de 3 subunidades (alfa, beta y gamma), siendo la alfa ($T\alpha$ -GTP) la utilizada para activar a otra enzima denominada fosfodiesterasa (PDE). Como consecuencia de la activación de la PDE se estimula la degradación de GMPc¹⁷. Por tanto, en presencia de luz, los niveles de GMPc disminuyen, ocasionando el cierre de unos 250 canales de Na^+ por cada cuanto de luz absorbida. Todo ello dura alrededor de un segundo. De esta forma, se acumulan iones Na^+ en el exterior de la membrana plasmática (espacio subretiniano), baja el nivel de K^+ y el potencial de receptor adopta una forma de hiperpolarización¹⁵. Este cambio en el potencial de membrana conduce al cierre de los canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje, que a su vez conlleva una disminución de la entrada de Ca^{2+} en la sinapsis^{18,19}. El resultado final es una disminución de la secreción de glutamato por parte de los fotorreceptores (Fig. 11).

La sinapsis con las células bipolares es inhibitoria, por tanto se deja de inhibir a la célula bipolar, formándose un impulso nervioso que es transmitido a las células ganglionares y, de éstas, al cerebro.

4. Ciclo visual

Debido a que los fotorreceptores deben trabajar durante muchas horas de iluminación es necesario que los pigmentos visuales inactivos sean continuamente regenerados. La

inactivación de la metarodopsina se lleva a cabo mediante su fosforilación por la rodopsino-quinasa y su posterior unión de la arrestina²⁰. Esto provoca su descomposición, generándose opsina y todo-trans-retinal¹⁴, que a su vez es transformado en todo-trans-retinol por una deshidrogenasa en el OS de los bastones. El todo-trans-retinol es transportado al EPR, donde es esterificado por la enzima lecitina-retinol acetil-transferasa (LRAT), de manera que puede unirse a la enzima RPE65 (proteína de 65 kDa específica del epitelio pigmentario de la retina), la cual facilita su isomerización en 11-cis-retinol por una isomerasa.

A partir de aquí el 11-cis-retinol puede seguir dos vías, o bien es reoxidado a 11-cis-retinal por una enzima deshidrogenasa llamada retinol deshidrogenasa (RDH5) y vuelve de nuevo a los bastones para unirse a la opsina libre y regenerar el pigmento visual²¹, o bien puede ser esterificado nuevamente por LRAT y posteriormente almacenado (Fig. 13).

En la actualidad se han identificado mutaciones en genes que codifican para determinadas proteínas del ciclo visual (rodopsina, RPE65, arrestina, LRAT o RDH5) como causantes de diferentes distrofias retinianas, tales como amaurosis congénita de Leber (LCA), fundus albipunctatus y retinosis pigmentaria (RP).

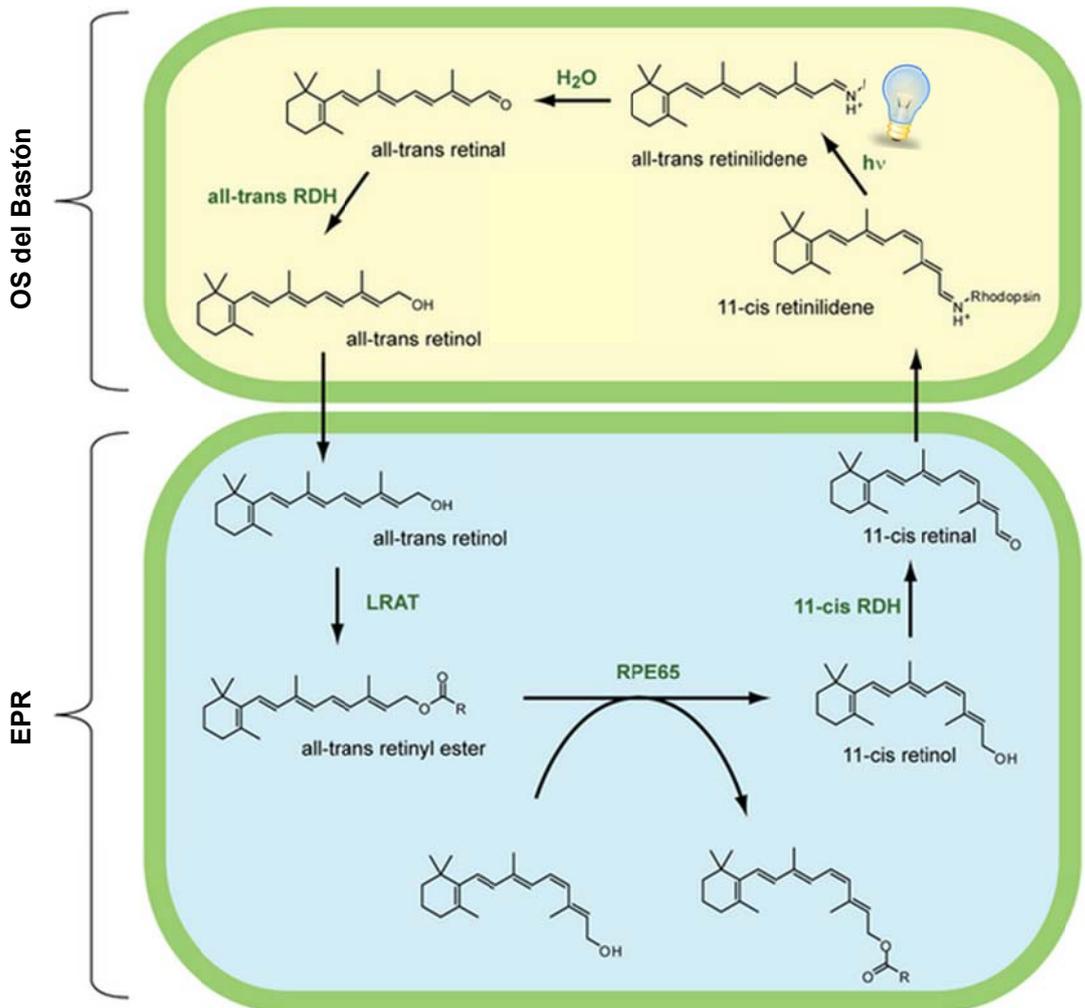


Figura 12. Ciclo de los retinoides

1.2 RETINOSIS PIGMENTARIA

El término RP engloba a un grupo de enfermedades degenerativas de la retina hereditarias, con una base genéticamente heterogénea pero con fenotipo similar. La RP puede ocurrir sola (RP típica) o asociada a alguna enfermedad sistémica.

En conjunto, este grupo de trastornos de la retina, representa la forma hereditaria más común de discapacidad visual en el hombre, con una prevalencia estimada de 1 de cada 3.000 a 1 de cada 5.000 personas en el mundo²². Se calcula que afecta globalmente aproximadamente a 1,5 millones de personas. En España se cree que puede haber unos 15.000 afectados y en la Comunidad Andaluza unos 2.000. La prevalencia de RP asociada a enfermedad sistémica está mucho peor documentada. Un ejemplo es el síndrome de Usher (RP con sordera), cuya prevalencia varía de 1,8 a 6,2 casos por cada 100.000 habitantes.

1.2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

SÍNTOMAS Y SIGNOS CARACTERÍSTICOS DE LA RP

1. Nictalopia

La ceguera nocturna (nictalopía) es el síntoma distintivo de la RP. Aparece a la edad media de 10.7 años cuando la enfermedad es autosómica recesiva y de 23.4 años cuando es dominante. La nictalopia no es patognomónica de la RP, puede acompañar a otras distrofias retinianas como la ceguera nocturna estacionaria congénita o la degeneración macular asociada a la edad (DMAE). También puede ser muy llamativa en la miopía.

2. Pérdida del campo visual

La segunda característica o síntoma principal de la RP es una reducción progresiva e insidiosa de campo visual (CV) periférico. En la gran mayoría de los casos de RP los defectos más precoces del CV son escotomas relativos en la zona media de la periferia, entre 30 y 50° con respecto a la fijación (Fig. 13). En general existe una fuerte tendencia a que la pérdida del campo visual sea simétrica en los 2 ojos, aunque una excepción es la del fenotipo que se expresa en las mujeres portadoras de RP ligada al cromosoma X, donde aparecen patrones de defectos campimétricos en cada ojo de modo escasamente simétrico.



Figura 13. Simulación del campo de visión reducido.

3. Otros síntomas:

Pérdida de visión central: puede verse afectada por edema macular quístico (EMQ), fibrosis prerretiniana macular o alteraciones del EPR foveal.

Defectos de la visión en color: sólo se ve afectada en los casos en los que los conos centrales son anómalos.

Fotopsias: similares a las que describen los pacientes con migraña con aura visual.

4. Aspecto del fondo de ojo

La descripción clásica del aspecto del fondo de ojo en la RP consiste en vasos retinianos atenuados, moteados y granulación del EPR, pigmentación intrarretiniana con espículas óseas y palidez de la cabeza del nervio óptico (Fig. 14B y 14C). En fases avanzadas de la enfermedad se aprecia atrofia del EPR y de la coriocapilar, que producen palidez del fondo de ojo y hacen que se visualicen los vasos coroideos de mayor tamaño. Cuando la enfermedad llega sus últimas fases la atenuación vascular puede ser tan intensa que los vasos retinianos tengan aspecto filiforme.

Casi todas las formas de RP pasan por una fase en la que la retina parece casi normal, incluso habiendo escotomas relativos evidentes en la exploración del CV o una reducción del umbral retiniano en la perimetría estática. Los pacientes con RP muy precoz y sin anomalías pigmentarias en el fondo de ojo reciben el diagnóstico de “retinosis pigmentaria sin pigmento”. La fase sin pigmento puede durar decenios antes de que aparezcan los signos típicos de RP. En casos de miopía magna y RP, las características del fondo de ojo habituales en dicha miopía pueden retrasar la apreciación de otras anomalías retinianas.

Cuando las anomalías de fondo de ojo son evidentes, los datos más precoces son la atenuación de los vasos retinianos y el aspecto de fino moteado o granulación del EPR en la periferia media y lejana. Mediante tomografía de coherencia óptica (OCT) se ha demostrado que el espesor de la retina disminuye en las zonas de pigmentación anómala y que las espículas óseas son hiperreflectantes. La mácula puede presentar un aspecto anómalo, por la existencia de edema macular o fibrosis. La presencia o ausencia de defectos en el EPR macular tiene importancia pronóstica en lo que respecta a la conservación de la agudeza visual en los siguientes años. La ausencia de lesión macular se ha asociado a la pérdida de una sola línea de visión en el periodo de 5 años, mientras que la atrofia geográfica se ha asociado a la pérdida de 3 a 4 líneas. Otras maculopatías asociadas a la RP son la maculopatía en celofán o el agujero macular.

La pigmentación de las espículas óseas representa el desplazamiento, hacia la retina, del pigmento procedente de la desintegración de las células del EPR que se acumula en los espacios intersticiales que rodean a los vasos retinianos, especialmente en las uniones de los vasos, y dan lugar a la aparición de manguitos pigmentarios perivasculariales y depósitos con forma de espículas. La pérdida de pigmento en las células del EPR suele producir un aspecto general del fondo de ojo de color gris, con mayor visibilidad de los vasos coroideos subyacentes a través de un epitelio pigmentado de mayor transparencia.



Figura 14. Aspecto de la retina. (A) retina normal. (B) Espículas óseas. (C) Atrofia óptica. 14

En algunos pacientes la pigmentación anómala y la atrofia quedan confinadas a una zona de la retina, generalmente una faja arqueada de retina inmediatamente por debajo de la mácula. Este aspecto recibe el nombre de RP sectorial (Fig. 15). Los pacientes suelen estar asintomáticos aunque con los años puede extenderse a uno o dos cuadrantes.

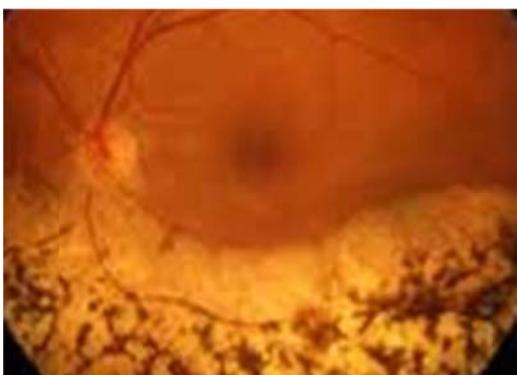


Figura 15. Funduscopy de RP sectorial.

En la RP precoz la papila puede ser normal o mostrar una plenitud cérica con hiperemia o mostrar palidez cérica. A menudo se puede ver un “anillo dorado” o halo blanco-amarillento que rodea a la papila en la RP precoz. Según progresa la enfermedad, este anillo dorado es sustituido por un moteado peripapilar, hiper-pigmentación y atrofia del EPR. Se ha publicado²³ que el cociente entre la depresión de la papila y la papila es significativamente menor en los paciente con RP de todos los tipos (0,19 frente a 0,35 en sujetos normales). En la enfermedad avanzada se aprecia palidez densa de la papila: en parte por la atrofia óptica y en parte por la gliosis suprayacente a las papilas.

En muchos casos de RP leve o moderada la angiografía con fluoresceína (AFG) pone de manifiesto defectos de transmisión del EPR con ulterior escape difuso. Es frecuente ver EMQ angiográficamente significativo en pacientes jóvenes en estadios precoces de la enfermedad y que conservan buena visión. Se ha señalado que este edema puede deberse a inflamación causada

por la extensa degeneración de la retina²⁴. No es frecuente observar vasculopatía retiniana periférica. Se han publicado²⁵ casos de enfermedad parecida al síndrome de Coats en la RP autosómica dominante y autosómica recesiva, pero no en la herencia ligada al X, generalmente en pacientes ancianos. También se ha descrito hemorragia vítrea relacionada con neo-vascularización prerretiniana en casos excepcionales²⁶.

5. Otros signos:

Anomalías del humor vítreo: lo más habitual es encontrar células pigmentadas finas, con aspecto de polvo, secundarias a la degeneración del EPR.

Anomalías del segmento anterior y estado refractivo: las cataratas son complicaciones frecuentes de la RP en el segmento anterior. El tipo de catarata más frecuente es una opacidad subcapsular posterior (Fig. 16). También es frecuente que la RP se asocie a miopía y astigmatismo intensos²⁷.



Figura 16. Catarata subcapsular posterior.

HALLAZGOS PSICOFÍSICOS

1. Perimetría

La evaluación del campo visual es una herramienta valiosísima para tanto para el diagnóstico como para el seguimiento y evolución de la RP (Fig. 17). Massot y Finkelstein²⁸ observaron que podían dividir a sus pacientes en 2 grupos en función de la campimetría: 1) RP de tipo

I, que se asocia a pérdida difusa precoz de la sensibilidad de los bastones con respecto a la de los conos y a ceguera nocturna de la infancia, y 2) RP de tipo II, que se asocia a una pérdida regional y combinada de la sensibilidad de conos y bastones y a ceguera nocturna en adultos. No se ha observado que ningún paciente cambie de un tipo a otro.

Cuando se mide la adaptación a la oscuridad en pacientes con RP, se pueden observar diversos grados de elevación del segmento de los conos, del de los bastones o de ambos. En algunos pacientes que conservan un umbral final de adaptación de los bastones a la oscuridad relativamente bueno también se puede observar un retraso en esta adaptación.

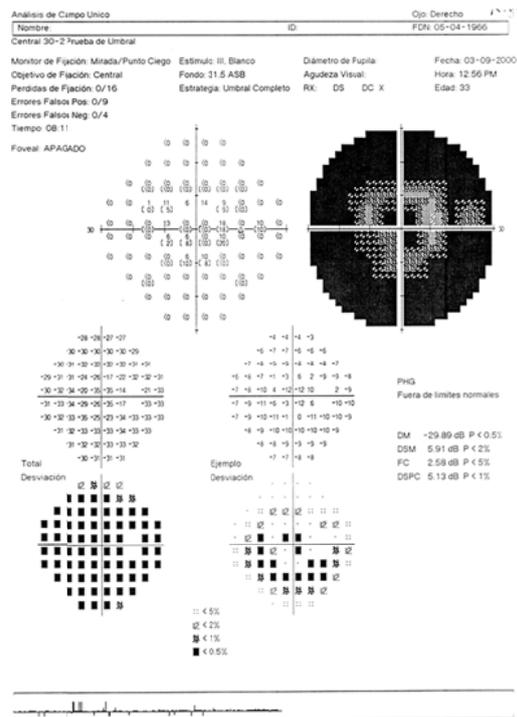


Figura 17. Campimetría: daño severo del campo visual, solo islote de visión central. Aunque no parece que esta clasificación sea reflejo de subtipos genéticos, puede que el fenotipo de las mutaciones específicas de un gen determinado sea relativamente uniforme.

2. Adaptometría a la oscuridad

Cuando se expone a sujetos normales a la oscuridad después de una adaptación con una fuente de luz potente, reducen rápidamente el umbral psicofísico retiniano utilizando el sistema de conos, el cual se estabiliza en 5 minutos aproximadamente. A partir de ese momento la adaptación de los bastones aumenta lentamente, antes de que se produzca una segunda adaptación tras 30 minutos en oscuridad.

3. Electrofisiología

El ERG mide el potencial de acción de la retina. Para que el ERG nos dé una información fiable es vital establecer una estandarización del estímulo y de la luz de fondo, que deberán estar perfectamente calibradas. El ERG estándar incluye las siguientes estimulaciones (luminosidad del flash en $\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2$)²⁹:

- o Escotópico 0,01 ERG (respuesta pura de bastones).
- o Escotópico 3,0 ERG (respuesta máxima o estándar mixta de bastones y conos).
- o Potenciales oscilatorios (escotópico 3,0, dos estímulos seguidos y separados 15 segundos).
- o Fotópico 3,0 ERG (respuesta de conos).
- o Fotópico 3,0 flicker (respuesta pura de conos).

En un paciente con RP las respuestas electrofisiológicas pueden ir de normales a indetectables. En general, la respuesta es mayor cuanto más joven es el paciente o más precoz el estadio de la enfermedad (Fig. 18).

Se ha propuesto que los pacientes con amplitud en el ERG escotópico de 100 μV o más padecen una forma "delimitada" de la enfermedad, que tiene mejor pronóstico. En la mayoría de pacientes con RP avanzada, las respuestas a las técnicas no promediadas con un solo destello son menores de 10 μV (indetectables). Se ha

observado que los pacientes pierden anualmente un promedio del 16 al 18,5% de la amplitud del ERG a los destellos blancos brillantes (respuesta mixta de conos y bastones).

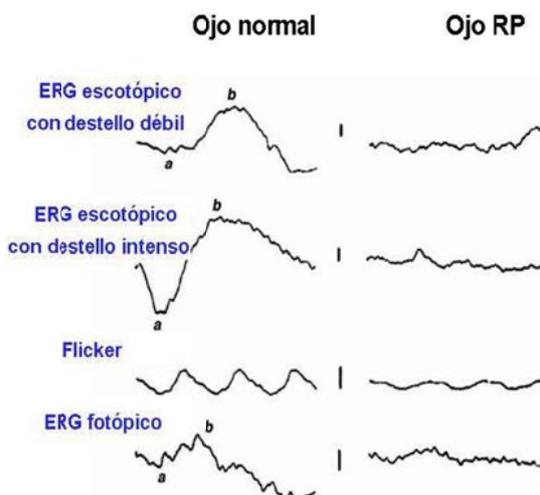


Figura 18. Respuesta electrofisiológica normal y respuesta alterada por RP.

Además, en la RP tipo I el ERG escotópico (dominado por los bastones) está afectado en mucha mayor medida que el ERG fotópico (mediado por los conos); mientras que en la RP tipo II los ERG escotópico y fotópico presentan anomalías más parecidas. Existe cierta correlación entre el campo visual residual y la amplitud del ERG. Dicha correlación es máxima en la RPad y RPar en comparación con la RP ligada a X.

1.2.2 PATRONES DE HERENCIA DE LA RP

Idealmente la RP se debería clasificar en función de la anomalía bioquímica y asociarla a datos clínicos útiles y característicos, pero seguimos lejos de disponer de una subclasificación unificada que sirva para médicos, biólogos y genetistas. Por ello, aunque persiste la validez de las diferentes formas de clasificar la RP - según la edad de inicio, el defecto molecular, el aspecto

del fondo de ojo, etc. - la subclasificación en función del tipo de herencia sigue siendo la más útil (Fig. 19).

La RP típica se puede heredar como RP autosómica dominante, RP autosómica recesiva o rasgo recesivo ligado al cromosoma X. No se han publicado casos de RP no sindrómica asociada a herencia mitocondrial. El porcentaje de cada tipo de herencia varía de un autor a otro y del país de origen del estudio. Aunque la RP típica es siempre una enfermedad genética, es frecuente que falten antecedentes familiares de retinopatías. Estos casos se denominan RP simple y se piensa que un 70% de ellos son de herencia recesiva³¹.

RP AUTOSÓMICA DOMINANTE (RPad)

Es el segundo tipo más frecuente de RP hereditaria. Representa del 15% al 20% de los casos³². En este tipo de herencia, alguno de los padres está afectado y alguno de los hijos se encuentra afectado, y, aunque es una de las formas de retinosis menos graves, dado que los síntomas aparecen de manera más tardía con una progresión más lenta, la probabilidad de transmisión a los descendientes es del 50%.

Generalmente, se establece que la RP es del tipo dominante cuando se observa en 3 generaciones, aunque algunos autores consideran suficientes que se manifieste en 2. La mayoría de los árboles genealógicos de las familias afectadas por RPad muestran una penetrancia completa, sin embargo, se dan casos de familias que presentan una penetrancia incompleta de la enfermedad.

Esta forma de herencia destaca entre las otras por su gran variabilidad fenotípica que puede darse de forma tanto intra como interfamiliar. Hasta la fecha se han identificado 25 genes para RPad³² (tabla 1) y un locus. Entre los genes más prevalentes están el de la rodopsina (*RHO*) y la periferina 2 (*PRPH2* o *RDS*), también se encuentran los genes

asociados con el procesamiento del ARNm (splicing factors; en inglés) *PRPF31*, *PRPF3*, *PRPF8*, como genes asociados a este tipo de herencia.

RP AUTOSÓMICA RECESIVA (RPar)

Es el tipo más frecuente de RP hereditaria, representa aproximadamente del 20% al 30% de los casos (39% de los casos en España)³³ con 48 genes identificados y 3 loci mapeados hasta la fecha (tabla 1). La RPar afecta por igual a hombres y mujeres. La consanguinidad refuerza la probabilidad de que un rasgo recesivo se manifieste. Los padres son sanos pero portadores de la enfermedad, pudiendo transmitir el gen anormal a alguno de los hijos. Su gravedad es mayor, sin embargo las posibilidades de transmisión se reducen al 25%.

RP LIGADA AL CROMOSOMA X (RPx)

Es el tipo menos frecuente de RP hereditaria, representando del 6% al 10% de casos. Hasta la fecha se han identificado 3 genes y 3 loci implicados en este tipo de herencia (tabla 1). Los genes *RPGR* y *RP2* se encuentran entre los más comunes en los casos de RPx, estimándose que representan entre un 70% - 90% y entre un 10% - 20% de los casos de RPx, respectivamente³². La expresión fenotípica del gen está ligada al género, encontrándose el gen recesivo anormal en el cromosoma X. En este tipo de patrón los varones están afectados y las mujeres son las portadoras del gen anómalo. Este tipo de herencia se caracteriza por la no transmisión de la enfermedad de padres varones a hijos varones, puesto que los varones aportan únicamente el cromosoma Y a sus hijos varones. Es la forma más grave de RP, los síntomas comienzan a edades muy tempranas y evoluciona rápidamente.

OTRAS FORMAS DE RP

Esporádica

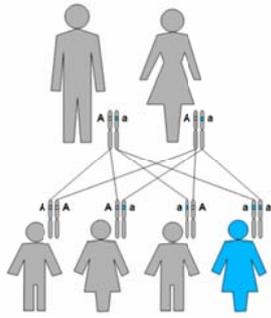
El afectado/a es el primer miembro de la familia que padece la enfermedad y aparentemente no existe ninguna vinculación a la herencia. Es la denominada de RP simple.

RP digénica

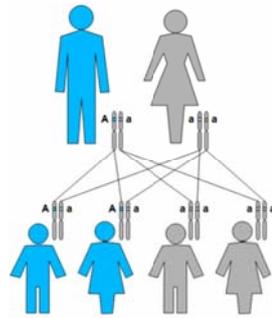
Se produce cuando los genes alterados para la enfermedad se encuentran en dos cromosomas diferentes en el mismo individuo. La interacción entre los dos genes causa la RP. Algunos casos se han asociado con mutaciones heterocigotas simultáneas en los genes *ROM1* y *PRPH2*³².

RP mitocondrial

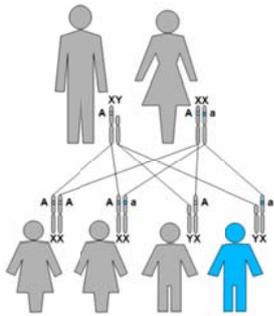
Las mitocondrias tienen su propio ADN, y son heredadas de la madre. Los defectos en el ADN mitocondrial conducen a gran variedad de trastornos sindrómicos. Sin embargo, debido a la complejidad de la genética mitocondrial, la aparición es variable. Algunas formas de RP complicada, como el Síndrome de Kearns-Sayre y algunas formas del Síndrome de Usher se cree que se heredan siguiendo un patrón mitocondrial³⁴.



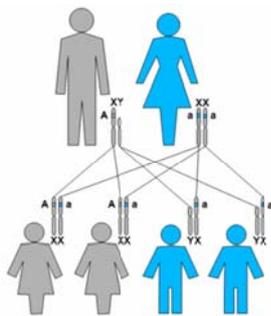
RP autosómica recesiva



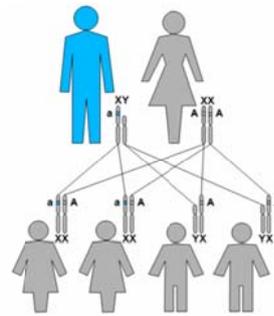
RP autosómica dominante



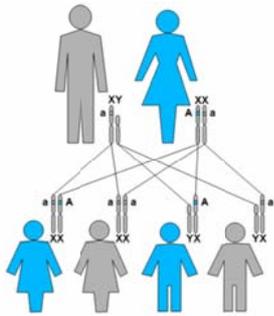
RPx mutación recesiva:
Madre portadora



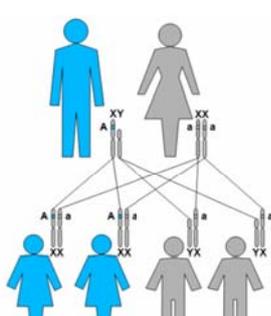
RPx mutación recesiva:
Madre afectada



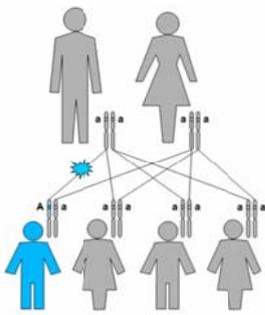
RPx mutación recesiva:
Padre afectado



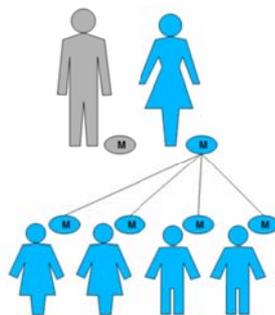
RPx mutación dominante:
Madre afectada



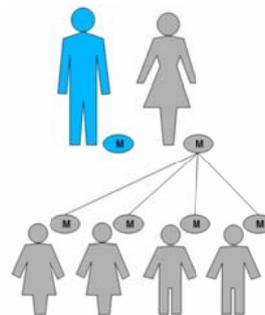
RPx mutación dominante:
Padre afectado



RP esporádica
Madre afectada



RP mitocondrial:
Padre afectado



RP mitocondrial:

Figura 19. Patrones de herencia de la retinosis pigmentaria.

Tabla 1. Genes causantes de RP identificados hasta la fecha³².

	LOCI	GEN
RPad	<i>RPE63</i>	<i>BEST1, CA4, CRX, FSCN2, GUCA1B, HK1, IMPDH1, KLHL7, NR2E3, NRL, PRPF3, PRPF4, PRPF6, PRPF8, PRPF31, PRPH2 (RDS), RDH12, RHO, ROM1, RP1, RP9, RPE65, SEMA4A, SNRNP200, TOPORS</i>
RPar	<i>RP22, RP29, RP32</i>	<i>ABCA4, ARL2BP, BBS1, BBS2, BEST1, C2orf7, C8orf37, CERKL, CLRN1, CNGA1, CNGB1, CRB1, DHDDS, DHX38, EMC1, EYS, FAM161A, GPR125, IDH3B, IMPG2, KIAA1549, KIZ, LRAT, MAK, KERKT, MVK, NEK2, NR2E3, NRL, PDE6A, PDE6B, PDE6G, PRCO, PROM1, RBP3, RGR, RHO, RLBP1, RP1, RP1L1, RPE65, SAG, SLC7A14, SPATA7, TTC8, TULP1, USH2A, ZNF513</i>
RPx	<i>RP6, RP24, RP34</i>	<i>OFD1, RP2, RPGR</i>

1.2.3 DEFECTOS GENÉTICOS QUE CAUSAN RP

El creciente descubrimiento de mutaciones genéticas asociadas a formas de RP está llevando a un incesante crecimiento del conocimiento de estas entidades a nivel molecular. Sabemos que un alelo mutante de un gen puede comportarse de diversas formas, dependiendo de la parte del gen en que se produzca el cambio de secuencia y de la situación del otro alelo. Es el caso de los alelos nulos, que se pueden heredar de forma recesiva, sin causar enfermedad, si basta con una copia correcta del gen para generar producto suficiente para mantener una función normal. Pero los alelos nulos también se pueden asociar a herencia dominante por "haploinsuficiencia", si no basta con una copia buena del gen para generar producto suficiente y mantener una función normal.

Las funciones de los diferentes genes asociados a RP pueden agruparse en cinco categorías principalmente: 1) fototransducción, 2) metabolismo de la

retina, 3) desarrollo y mantenimiento de tejidos, 4) estructura celular y 5) empalme del ARNm.

Se han identificado hasta ahora más de 80 genes y loci asociados a RP³². Algunos de los genes han sido clonados y de su estudio se desprende que en su mayoría se expresan predominante o específicamente en la retina. Sin embargo, el conjunto de estos genes conocidos sólo representan algo más de la mitad de los casos de pacientes afectados con RP. Las mutaciones más comunes encontradas en pacientes con RP ocurren en genes de la fototransducción, como la rodopsina. El gen de RHO fue el primer gen descrito ligado a la RP. Dicho gen codifica para una proteína transmembrana (Fig. 20) de los discos de los bastones. Las mutaciones en dicho gen son responsables del 20% al 25% de los casos de RPad. Se han identificado más de 100 mutaciones en RHO, lo que podría explicar la heterogeneidad clínica de la enfermedad.

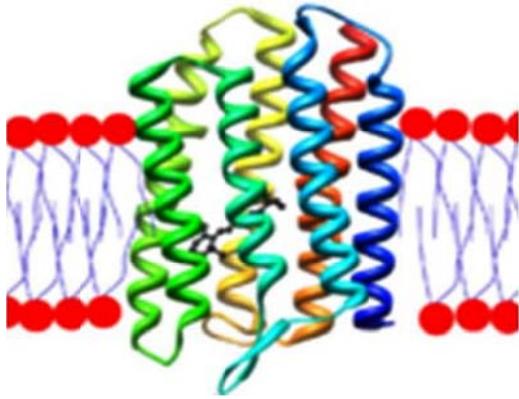


Figura 20. Estructura de la rodopsina.

El gen *USH2A*, que puede estar afectado aproximadamente en el 20% de los casos de RPar, y el gen *RPGR* (gen regulador de la GTPasa en la RP) está mutado en el 70% de los casos de retinosis asociada al cromosoma X y representa el 10-20% de los casos de RP. Mutaciones en estos tres genes, *RHO*, *USH2A* y *RPGR*, representan el 30% de los casos de RP. Analizando cuatro familias mediante clonación posicional se identificó un nuevo gen no descrito previamente, *EYS*, en el locus *RP25*³⁵. Hasta la fecha dicho locus ha sido identificado como el causante de RPar en el 10-20% de los casos en España³⁵. Otra causa común de RPad se atribuye a la mutación en el gen de la periferina 2 (*PRPH2*), que representa el 5% de los casos³². También se han encontrado afectados los genes del ciclo visual, así como los de algunas proteínas estructurales, enzimas críticos para el metabolismo, factores de transcripción y de modificación postranscripcional³⁶.

Recientemente se han identificado 5 genes de RPad que se expresan de modo ubicuo en diferentes tejidos y que están relacionados con el procesamiento del RNA. Cuatro de estos genes no específicos de retina que producen RPad codifican proteínas esenciales para la maduración del pre-ARNm, son los “*pre-ARNm processing factors*” (PRPF); específicamente: *PRPF31* (para RP11)³⁷, *PRPF8* (para RP13)³⁸, *PRPF3* (para RP18)³⁹ y *PRPF4*⁴⁰. Mutaciones en estos

genes son responsables del 12% de los casos de RPad, el 5% de los cuales se deben a *PRPF31*, sin embargo, los mecanismos patogénicos para estas mutaciones no se conocen, más teniendo en cuenta que genes que se encuentran ubicuamente expresados en el organismo sólo producen un fenotipo deletéreo en la retina.

MADURACIÓN DEL ARNm

La mayoría de los genes eucarióticos contienen regiones codificantes (exones) y regiones no codificantes para la proteína (intrones). Tras la transcripción de un gen a una molécula de ARN con la misma organización del ADN, la molécula de ARN debe transformarse de forma que se eliminen correctamente los intrones para que los exones queden unidos formando el ARNm, además de otras modificaciones como la poliadenilación 3' y la adición del cap 5'.

El proceso de eliminación de los intrones y unión de los exones en su correcta secuencia es lo que se conoce por maduración o splicing. Ocurre en el núcleo y se puede dividir en dos partes principales: primero, el reconocimiento de las secuencias consenso y segundo, el corte y la unión de las secuencias de ARN. Esto es llevado a cabo por un megacomplejo enzimático ribonucleoprotéico denominado espliceosoma (Fig. 21). El espliceosoma está formado por proteínas y moléculas de ARN pequeños nucleares (snARN). Los cinco snARNs del espliceosoma son U1, U2, U4, U5 y U6. Cada uno de ellos se asocia con varias proteínas diferentes para formar partículas ribonucleoprotéicas (snRNPs).

Las proteínas están implicadas en la reacción de empalme; toman parte en el ensamblaje de la estructura del complejo o bien ayudan en las conexiones entre snRNPs. Muchas otras proteínas que no forman parte de los snRNP, y que se suelen llamar “splicing factors”, también participan en el ensamblaje del

spliceosoma; más de 200 han sido identificadas mediante espectrometría de masas⁴¹. Los distintos snRNPs tienen que ser ensamblados de antemano en los cuerpos de Cajal, que son unas estructuras no membranosas presentes en el núcleo.

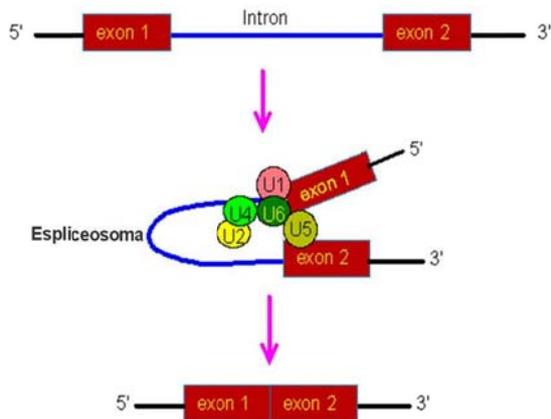


Figura 21. Empalme del ARNm.

El primer paso para la biogénesis del snRNP es la transcripción del snARN, que ocurre en el núcleo; a partir de ahí, todos los snARNs, excepto U6, son transportados al citoplasma, donde son modificados y se unen a las proteínas correspondientes; finalmente vuelven al núcleo. El snARN U6 no pasa por el citoplasma, ya que todas sus modificaciones tienen lugar en el núcleo. Cuando el snARN se ha modificado, es señalizado para ir a los cuerpos de Cajal y se ensambla con varias proteínas para formar la partícula snRNP completa⁴². El reclutamiento del complejo tri-snRNP U4/U6.U5 para el spliceosoma es un paso crucial en el ensamblaje del mismo. Tanto la formación de dicho complejo como su asociación al spliceosoma requieren una serie de factores proteicos que incluyen a *PRPF8*, *PRPF31* y *PRPF3*. Estas proteínas tienen un alto grado de conservación desde levaduras a humanos⁴³.

POSIBLES MECANISMOS PARA EXPLICAR LA RP DEBIDA A MUTACIONES EN FACTORES DE EMPALME

Hasta ahora se desconocen los mecanismos que hacen posible que mutaciones en factores de splicing que se expresan de forma ubicua en todos los tejidos afecten de manera específica a los fotorreceptores. Dado que el splicing es un proceso sumamente dinámico en el que los spliceosomas se ensamblan de nuevo para cada intrón que debe madurar, las condiciones de alta demanda metabólica en los fotorreceptores pudieran ser la causa de la aparición del fenotipo en este tipo celular, a diferencia de otros tipos celulares. Esta hipótesis se basa en la necesidad de renovar continuamente los discos de rodopsina de los fotorreceptores por el desgaste diario de los pigmentos⁴⁴.

Se pueden proponer distintos modelos para tratar de explicar un fenotipo específico de fotorreceptores. Uno de ellos es la haploinsuficiencia^{45,46}, en el que una única copia funcional del gen no sería suficiente para suplir las necesidades de splicing del fotorreceptor. De hecho, ratones que producen sólo el 50% del nivel normal de rodopsina muestran degeneración en la retina. Es posible que las mutaciones en los factores de splicing den lugar a unos niveles reducidos de proteínas funcionales. Otro dato que apoya esta hipótesis es la reducción en la localización nuclear de *PRPF31* cuando se estudian células de mamífero transfectadas⁴⁷ (Fig. 22). Esto podría llevar a una reducción de la proteína en el lugar en el que debe desempeñar su función.

Una característica común de todos los factores de splicing implicados en RP es que todos ellos intervienen en el reclutamiento del tri-snRNP U4/U6-U5 para el ensamblaje del spliceosoma, de

forma que sería posible que sus mutaciones indujeran un descenso en la tasa de activación del spliceosoma⁴⁸, haciendo de la maduración del pre-ARNm un paso limitante en el metabolismo de los fotorreceptores.

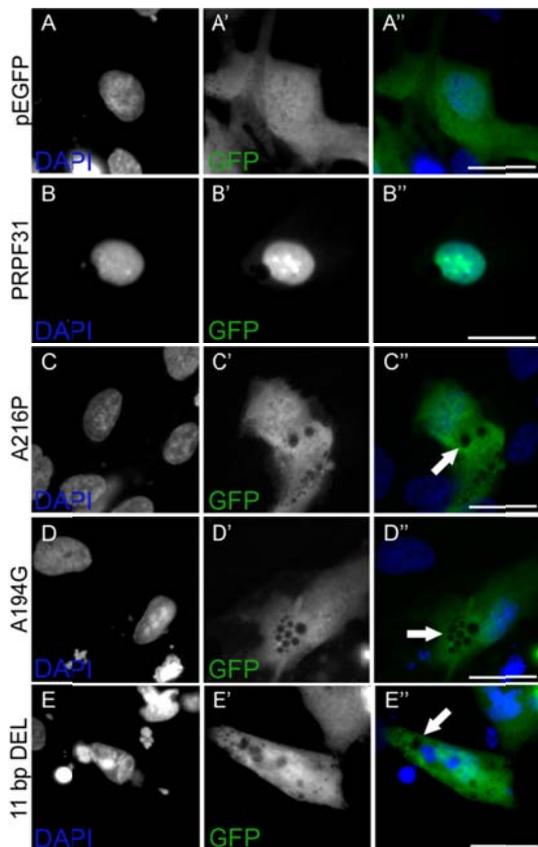


Figura 22. Células transfectadas con GFP (A), *PRPF31* (B) y tres mutaciones de la proteína en humanos (C, D, E). Se observa vacuolización de las células derivadas del EPR y en las 3 mutaciones vemos que no hay traslocación de la proteína al núcleo celular.

Una segunda explicación podría deberse a la presencia de algún factor específico (o varios) en los fotorreceptores que se asocie al proceso de splicing en este tipo celular.

Otra posibilidad es un efecto dominante negativo de ganancia de función que produzca una toxicidad específicamente en los fotorreceptores. Apoyando esta idea está el hecho de que en los pacientes de *RP13* todas las mutaciones

son de cambio de sentido³⁸. La sobreexpresión de AD5 o de la proteína mutante de *PRPF31*, SP117, en cultivos primarios de células de retina produce un incremento significativo en la muerte de las células positivas para RHO^{49,50}. La co-expresión de esta proteína mutante de *PRPF31* con el minigen *RHO* en células en cultivo primario de retina de ratón lleva a la inhibición del splicing del pre-ARNm del intrón 3 de *RHO*. Curiosamente, mutaciones homocigotas en el sitio de splicing del gen *RHO* detectadas en pacientes con RP afectan a la eliminación de este intrón. El hecho de que mutaciones en *PRPF31* afecten al splicing del pre-ARNm de *RHO* sugiere una interacción funcional entre *PRPF31* y *RHO*, dos de los principales genes implicados en RPad⁴⁹. La expresión de la proteína mutante *PRPF31* inhibe el splicing de *RHO* en presencia de la proteína silvestre lo que apoya un mecanismo dominante negativo⁵¹. Esta interacción entre *RHO* y *PRPF31* no ha sido probada aún en humanos y, al igual que *RHO*, mutaciones en *PRPF31* podrían afectar a la maduración de otras proteínas.

Todos estos mecanismos potenciales no son excluyentes entre sí, ya que es posible que distintas mutaciones causen la RPad por medio de diversos mecanismos. El resultado final siempre parece ser el mismo, la muerte de los fotorreceptores.

1.2.4 OPCIONES TERAPÉUTICAS

En la actualidad se desconoce el mecanismo por el que una mutación de un gen conduce a la desorganización completa de las capas de bastones y conos de la retina. Sin embargo, gracias al estudio sobre modelos animales clásicos de degeneración retiniana ya existen algunos datos de lo que puede estar ocurriendo en la retina de los pacientes que sufren esta enfermedad.

La RP se caracteriza por una degeneración progresiva de los fotorreceptores. La naturaleza progresiva de la enfermedad a menudo conduce finalmente a la ceguera funcional. Hasta la fecha no existe un tratamiento eficaz que pueda prevenir o revertir la pérdida de la visión. Se han hecho avances tanto en la ralentización de la degeneración de los fotorreceptores como en la mejora de la función de éstos usando factores neuroprotectores⁵², antioxidantes⁵³, medicamentos⁵⁴, células madre o progenitores celulares⁵⁵. En humanos y en modelos animales, la introducción en el ojo de genes funcionales usando vectores virales (terapia de sustitución génica) restauró la visión de forma notable en una forma recesiva de LCA causada por mutaciones en el gen *RPE65*^{56, 57}. Esto abre las puertas a la posibilidad de restaurar la visión en otras degeneraciones de fotorreceptores a través de terapia génica^{58,60}.

En la actualidad, las diversas disciplinas enfocan el problema de la terapéutica de la RP desde muy diversos prismas. Esta disparidad de criterios se ha interpretado por el colectivo de afectados como un problema de conflicto de intereses entre los diversos profesionales involucrados en el estudio del problema o manejo de los pacientes. La realidad es que ninguna de las alternativas terapéuticas que se barajan para un futuro debe considerarse como definitiva o excluyente del resto, sino complementaria de las demás y aplicable según el estadio y subtipo de la enfermedad que afecte al paciente.

Las posibles terapias futuras para los enfermos de RP incluyen:

- Terapia farmacológica
- Terapia celular
- Retinas artificiales
- Terapia génica

TERAPIA FARMACOLÓGICA

En la actualidad no hay ningún tratamiento con el que se hayan obtenido

resultados contrastados. Tan sólo se hacen una serie de recomendaciones:

- o Protección contra la luz solar con la utilización de filtros específicos.
- o Ejercicio
- o Dieta equilibrada con aporte adecuado de vitaminas, sobre todo vitamina A.
- o Determinados factores de protección:

1. Ácido Decosahexaenoico (DHA)

El DHA es un lípido abundante en los fotorreceptores y parece ser una sustancia esencial en el proceso de la RP. Es un factor trófico y parece inhibir, al menos *in vitro*, la apoptosis, jugando un papel esencial en el metabolismo del calcio y en la isquemia de la retina. El DHA presenta un efecto protector parcial en la retina, donde niveles disminuidos de DHA en los segmentos externos de los bastones aumentan la susceptibilidad al daño en la retina provocado por la luz. El DHA es necesario para el desarrollo de la retina y del cortex cerebral. La deficiencia de DHA en el periodo fetal podría ser esencial en la RP, máxime si la nutrición se realiza con fórmulas artificiales que presentan niveles menores de DHA. Más del 70% de todos los afectados de RP tienen deficiencias de DHA en plasma, eritrocitos y esperma. En un diagnóstico precoz o al inicio de la presencia de signos degenerativos en los fotorreceptores, el suplemento oral de DHA podría tener beneficios e incluso reducir parcialmente la degeneración⁵⁹.

2. Calcioantagonistas

Existen otros tratamientos inhibidores de la apoptosis que pueden inhibir total o parcialmente el proceso de la degeneración de los fotorreceptores, son los calcioantagonistas. En este sentido recientemente se ha estudiado en ratas con distrofia de retinas que el Diltiazem paraliza el proceso degenerativo en la retina⁶⁰.

3. Otros factores de protección

Sustancias tróficas como el Factor Neurotrófico Ciliar, antioxidantes y sustancias hemodinámicas, han demostrado eficacia en la lucha contra la evolución natural de la RP. La administración de Factor Neurotrófico Ciliar a través de células encapsuladas reduce la degeneración de fotorreceptores en modelos animales con RP⁶¹.

TERAPIA CELULAR

Los avances en neurobiología y microcirugía oftalmológica han cosechado importantes avances en el campo de la transferencia de células, bien EPR, bien fotorreceptores (conos y bastones⁶²). La controversia de estas técnicas tal vez aparezca en la necesidad de trabajar con células madre humanas obtenidas a partir de embriones criopreservados, así como el momento de la indicación de los trasplantes. No obstante, el desarrollo de la técnica de producción de células madres pluripotentes inducidas (iPSC) y el estudio de los factores que controlan su diferenciación pueden dar sus frutos los próximos años.

La tecnología de iPSCs fue descrita por primera vez en el laboratorio del Dr. Yamanaka, 2007 quien demostró junto a Takahashi y col. la transformación de fibroblastos humanos en células pluripotentes a través de la expresión ectópica de cuatro factores de transcripción (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*)⁶³. Estos trabajos le hicieron merecedor del premio Nobel de Medicina en 2012.

Las células iPSC pueden cultivarse en laboratorio y mediante reprogramación celular son inducidas a diferenciarse en la población celular deseada. Se distinguen dos fases: la primera consiste en la desdiferenciación de las células somáticas adultas para alcanzar un estado pluripotente, y una segunda fase de diferenciación a otro tipo celular específico. En la actualidad hay varios

protocolos descritos para la obtención de EPR a partir de iPSCs desde fibroblastos e incluso de células sanguíneas^{64,65}.

Durante mucho tiempo, se pensó que los únicos tejidos adultos de donde se podían obtener células madre eran la médula ósea, epitelio de la piel, músculo y del tracto digestivo. Posteriormente, se ha comprobado que se pueden obtener células progenitoras de otros muchos tejidos incluido el ojo. A favor de esta estrategia terapéutica está el hecho de que la retina es desde el punto de vista inmunológico, un sitio privilegiado. Sin embargo, este tipo de trasplantes muestran una baja integración sináptica en la retina huésped y no han funcionado bien en pacientes con RP. Se ha comprobado que la capacidad de integración sináptica depende en gran medida del estado de diferenciación de las células trasplantadas⁶⁶.

En la RP, la función alterada de los fotorreceptores precede a la apoptosis. Además, las alteraciones de los bastones enfermos afectan a los sanos al igual que pasa con los conos que también acaban por sufrir alteraciones y apoptosis. Un trasplante de células sanas en la RP no sería efectivo, ya que las células nuevas sufrirían la apoptosis debido a las células enfermas que se mantienen en la retina. Sin embargo, este tipo de tratamientos abren expectativas, a más largo plazo; una vez controlada la apoptosis de las células es posible trasplantar células sanas sin riesgo a que estas sufran apoptosis. Entonces el trasplante de células adquiriría su aplicación restableciendo la función visual en pacientes cuya cantidad de células muertas es elevada debido al estado avanzado de la enfermedad y que de otra manera tampoco podrían recuperar función visual completa con los factores inhibidores de la apoptosis. Serviría como tratamiento complementario.

RETINAS ARTIFICIALES

Se trata de un microchip (Fig. 23) de minúsculas dimensiones conteniendo microelectrodos capaces de convertir la luz en impulsos eléctricos. Éste se implanta mediante cirugía, a nivel epi o subretiniano, generalmente en el cuadrante supero temporal⁶⁷. Uno de estos dispositivos, Argus® II (SecondSight), ya ha sido aprobado en Europa y E.E.U.U. para su uso en pacientes con RP (figuras 23 y 24). Aunque la visión que se alcanza con este implante es inferior a 20/1200, es un campo en el que las investigaciones están avanzando rápidamente^{68,69}. Actualmente se están realizando estudios en distintas fases con otros dispositivos que, de mostrar resultados positivos, serían comercializados en los próximos años, como IRIS (PixiumVisium) o Alpha IMS (Retina Implant).

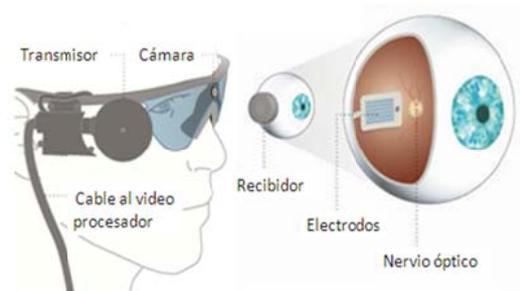


Figura 23. Esquema de Argus II.



Figura 24. Funduscopía de paciente con implante de Argus II.

TERAPIA GÉNICA

La terapia génica se puede definir como el conjunto de técnicas que permiten transportar secuencias de ADN al interior de células diana (Fig. 25), con objeto de modular la expresión de determinadas proteínas que se encuentran alteradas, revirtiendo así el trastorno biológico que ello produce. Puede realizarse en las células germinales, con lo cual todas las demás células llevarían, a priori, el nuevo gen insertado, o en células somáticas, en cuyo caso cualquier modificación y efectos se limitarán a los pacientes individuales, y no serán heredados por la descendencia del paciente o las generaciones posteriores.

Existen diferentes métodos para reemplazar o reparar los genes diana mediante terapia génica. El enfoque más común consiste en que un gen normal puede ser insertado en un lugar no específico en el genoma para compensar al gen que no funciona. Si ésta copia simplemente se introduce en el huésped, se trata de terapia génica de adición. Si tratamos, por medio de la recombinación homóloga, de eliminar la copia defectiva y cambiarla por la funcional, se trata de terapia de sustitución.

En base a los primeros resultados en LCA, el futuro de la terapia génica en enfermedades de degeneración de retina parece prometedor a medio plazo^{57,70,71} pero para su aplicación sistemática se requiere un avance sustancial. La corrección de la mutación en etapas tempranas de la enfermedad podría evitar las alteraciones y la apoptosis de las células. La dificultad estriba en que la cantidad de mutaciones y genes implicados son innumerables³², además, existen datos confusos con respecto a la inducción de la apoptosis mediante la mutación de proteínas específicas. Por otro lado Cideciyan y cols. detectaron en un estudio de terapia génica en pacientes de LCA que aunque estos pacientes mostraron una mejoría duradera de la

función visual con la terapia génica, la degeneración de los fotorreceptores no se detuvo y por ello habría que combinar este tratamiento con técnicas que paralizaran dicha degeneración⁷². Igualmente, en un artículo de revisión⁷³ sobre terapia génica en LCA, publicado a finales de 2014, concluyen que para que la mejora de la función visual sea duradera la terapia ha de llevarse a cabo antes de que el proceso de apoptosis empiece.

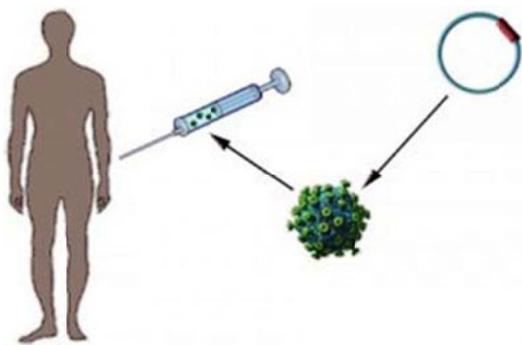


Figura 25. Terapia génica, esquema.

Tal vez, el dato más desalentador sea la reducida tasa de pacientes portadores de RP que podrían entrar en programas de terapia génica, ya que, si nos atenemos a los criterios del comité de vigilancia de protocolos de terapia génica, sólo se pueden tratar aquellas patologías hereditarias en las que se conoce con certeza su base génica, cosa que no ocurre en la inmensa mayoría de los casos.

Por esta razón, es prioritario antes de iniciar cualquier estudio de terapia génica, conocer los mecanismos exactos de la degeneración de la retina asociada a una mutación específica.

1.3 PRPF 31

Hace relativamente poco tiempo que se ha destacado la implicación de un interesante mecanismo bioquímico en la RP debida a las proteínas que codifican tres genes de RP: *PRPF8* (RP13), *PRPF31* (RP11), *PRPF3* (RP18) y *PRPF4*, asociadas a factores de empalme del ARN.

Como se ha comentado previamente, el empalme del ARNm es un proceso esencial que elimina secuencias de intrones del pre-ARNm. De esto se encarga el espliceosoma⁷⁴. La inmensa mayoría de los exones de pre-ARNm son empalmados por el espliceosoma mayor, que está formado por cinco ribonucleoproteínas nucleares ricas en uridina (snRNP), denominadas U1, U2, U4, U5 y U6.

PRPF31 es un gen causante de RPad con penetrancia incompleta RP11. Es un ortólogo del factor de empalme del pre-ARNm de levaduras *Prp31p*⁷⁵. La proteína PRPF31 es específica de la snRNP U4/U6 y participa en la formación de la tri-snRNP, en concreto, del anclaje físico de la snRNP U5 a la snRNP U4/U6. PRPF31 hace de puente entre U4 y U6 junto con PRPF3⁷⁶ y también fija U5 al di-snRNP U4/U6, por medio de su interacción con PRPF6.

Se ha demostrado que la supresión de PRPF31 en extractos nucleares de células HeLa detiene la maduración del espliceosoma. Además, la posterior adición de PRPF31 restaura el ensamblaje y la actividad del espliceosoma⁷⁵.

La preponderancia de mutaciones que producen proteínas truncadas en RP11 sugiere la haploinsuficiencia como base fisiopatológica. Esta idea se refuerza porque aparece penetrancia incompleta

en relación con el nivel de expresión del alelo silvestre³⁷.

La haploinsuficiencia ocurre cuando un organismo diploide tiene una sola copia funcional de un gen (y la otra copia es inactiva por alguna mutación) y dicha copia funcional no es capaz de producir suficiente producto genético (habitualmente una proteína) para mantener una condición normal, conllevando un estado anormal o de enfermedad. Muchas, aunque no todas, alteraciones autosómicas dominantes se explican por este motivo.

Una variación de la haploinsuficiencia se genera por mutaciones en el gen *PRPF31*, causa conocida de RPad. Hay dos alelos normales de este gen, uno con alta expresión y el otro con baja expresión. Cuando el gen mutante es heredado junto al alelo de alta expresión no existe fenotipo de la enfermedad; sin embargo, si el alelo mutante se hereda junto con el alelo de baja expresión los niveles de proteínas bajan hasta no ser suficientes para mantener su función normal y el fenotipo de la enfermedad se manifiesta⁴⁵.

1.3.1 ESTRUCTURA DEL GEN Y LA PROTEÍNA

El gen está localizado en el cromosoma 19. Está compuesto por 14 exones (longitud del transcrito 2126 pb) y codifica para la proteína PRPF 31.

PRPF31 tiene una estructura en doble hélice con tres dominios principales (Fig. 26). Los aminoácidos (aa) 85-120 (hélice α 1) y 181-215 (hélice α 6) forman dos ramas de la espiral principal, que se interrumpe en la punta por un pequeño dominio globular (aa 121 - 180; hélices α 2- α 5). A continuación se encuentra el siguiente dominio, de forma ovalada, dominio Nop (aa 215-333; hélices α 7- α 13) hasta el extremo C terminal. PRPF31 contacta con el RNP principal

exclusivamente a través de su dominio Nop, lo que sugiere que este elemento es la RNP más importante de la proteína PRPF31⁷⁷.

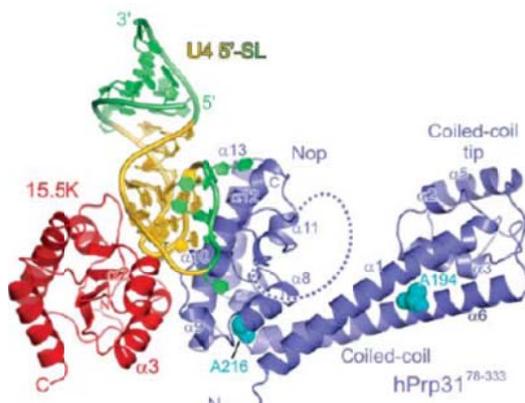


Figura 26. Estructura de la proteína codificada por *PRPF31*.

1.3.2 MUTACIONES EN *PRPF31* ASOCIADAS A RPad

Mutaciones en los genes de los factores de empalme son responsables del 12% de los casos de RPad, uno de los cuales es el gen *PRPF31*. La prevalencia de mutaciones en *PRPF31* está entre 1-8% de los pacientes con RPad dependiendo del origen geográfico, el segundo más importante después de la rodopsina³² implicado en la RP.

El fenotipo, la edad de desarrollo y la severidad de la enfermedad en los pacientes con RPad varían según la presencia de diferentes mutaciones. Además, en algunas familias la misma mutación puede estar asociada a una variación fenotípica acusada⁷⁸.

Por otra parte, distintos estudios revelan que la penetrancia incompleta es común en las familias que presentan mutación en *PRPF31* con portadores asintomáticos que tiene descendientes portadores que manifiestan la enfermedad.

Hasta el momento se han identificado más de 50 mutaciones en *PRPF31*⁷⁹, que incluyen inserciones (desde 1 par de bases (pb) hasta 33 pb), deleciones (entre 1pb y 30kb) y mutaciones de cambio de sentido a lo largo de todo el gen⁸⁰. En cualquier caso, la mayoría de mutaciones en este gen que causan RP se deben a la creación de codones de terminación previos al stop-codon del marco de lectura natural⁸¹. Sin embargo, el mecanismo por el cual estas mutaciones expresadas de forma ubicua causan enfermedad específica del fotorreceptor permanece sin aclarar (tabla 1).

1.3.3 MODELOS ANIMALES PARA *PRPF 31*

Para el estudio de la patología molecular de la enfermedad y la formulación de futuras terapias, se han sido diseñados modelos de ratón apropiados. La estrategia utilizada para la generación de mutantes PRPF 31 fue la utilización de un constructo recombinante por mutagénesis dirigida que podría dar lugar a dos tipos de modelos de ratón⁸².

El primero es un modelo de mutación puntual que imita el cambio patogénico A216P identificado en una de las familias con RP11. La homología entre las proteínas PRPF 31 humanas y del ratón es del 99% y el aminoácido en posición 216 está altamente conservado en todas las especie. El vector que porta la mutación puntual en el exón 7 (A216P) fue desarrollado de tal manera que dos sitios loxP flanquean el exón 7, lo que permite la eliminación de este fragmento con la recombinasa Cre, para obtener el modelo knock-out. La escisión mediada por Cre se ha logrado mediante el cruce de los ratones knock-in con una cepa Cre transgénicos. (Fig. 27).

El modelo de ratón knock-in ya ha sido analizado hasta la edad de 12 meses. Hasta el momento no se han observado cambios en la fisiología ya sea en

general o en la histología de la retina. Sin embargo, se observó un cambio en el ERG, las medidas sugieren un lento desarrollo de la enfermedad en ratones después de 1 año de edad⁸². Vale la pena señalar que cuando se cruzaron ratones heterocigotos knock-in (KI vs KI) se obtuvieron 48 crías nacidas vivas, de las cuales ninguna era homocigótica para la mutación.

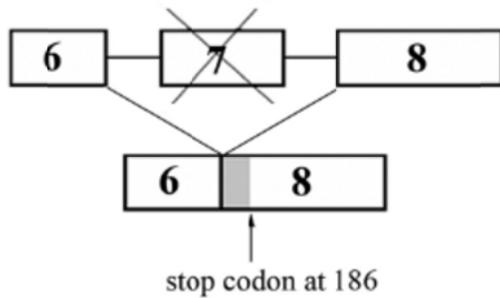


Figura 27. Escisión del exón 7 en los ratones mutantes.

Basándose en estos hallazgos, se piensa que los ratones mutantes homocigotos no son viables, lo que indica que el alelo mutante knock-in en sí mismo debería tener un impacto perjudicial sobre la función celular normal. Una posible explicación de la degeneración lenta puede deberse a la preservación funcional parcial de la proteína mutante PRPF 31.

Tras comprobar que el modelo de ratón knock-in parece tener una lenta degeneración de la retina, se ha generado un ratón knock-out. El ratón knock-out PRPF 31[±] fue generado cruzando ratones PRPF 31^{A216P/+} con una cepa de ratones BALB/c que expresan Cre recombinasa (BALB/c-Tg (CMV-Cre) 1Cgn/J). Para aprovechar las ventajas de los sitios LoxP que flanquean el exón 7 en ratones PRPF 31^{A216P/+}, se generó un heterocigoto creado por la mediación de Cre para la escisión del exón 7 (Fig. 30). Dado que el exón 7 contiene 170 nucleótidos, la eliminación del mismo creó una mutación con desplazamiento del marco de lectura que lleva a la

creación de nueve nuevos codones, seguida de un codón de parada prematuro en el exón 8. Se obtiene así una proteína truncada que contiene 185 aminoácidos y un tamaño de 26 kDa.

Por otra parte, la aparición de un codón de parada prematura en el exón 8 podría haber llevado a la eliminación de la transcripción. Debido a la escisión mediada por Cre, el alelo mutante se espera que sea 897 pb más corto.

Hasta ahora, se han analizado los ratones PRPF 31^{+/-} hasta la edad de 12 meses mediante ERG e histología. No hubo diferencias significativas en ningún análisis entre los ratones de tipo salvaje y knock-out. Como era de esperar, el cruce de PRPF 31^{+/-} no produjo ningún homocigoto descendiente, lo que confirma la letalidad embrionaria en estos ratones⁸².

1.3.4 OTRAS ENFERMEDADES CAUSADAS POR MUTACIONES EN PRPF31

No es raro que mutaciones en un mismo gen puedan causar enfermedades distintas en la retina. Muchas mutaciones producen doble fenotipo, como mutaciones en RPE65, que produce RPar y ACL o mutaciones en ABCA4, que produce RPar y enfermedad de Stargardt³².

Recientemente ha sido publicado un artículo⁸³ en el que se relaciona la mutación en el gen PRPF31 con retinosis pigmentaria así como con degeneración macular. En dicho artículo Lu y cols. describen las alteraciones retinianas halladas en una extensa familia china afectada por una mutación en el gen PRPF31. De 65 miembros estudiados 19 de ellos fueron diagnosticados de RP. Un sujeto fue diagnosticado de degeneración macular juvenil y otros cuatro mostraron alteraciones foveales y atrofia macular.

Tabla 2. Mutaciones en *PRPF31* encontradas en familias con RPad⁷⁹

EXON	CAMBIO NUCLEÓTIDO	EFEECTO PROTEÍNA	PENETRANCIA
Int1	2481 G>T	Defecto splicing	incompleta
2	c79 G>T	p. Glu27X	incompleta
Int 2	c177 + 1G>A	Defecto splicing	simple
3	c 220 C>T	p. Gln74x2	simple
4	c 269_273 del	p. tyr 90CysfsX21	incompleta
4	c 319 C>G	p. Leu107Val	simple
Int 4	c323 -2A>G	Defecto splicing	simple
5	c331_342 del	p. His111_ilu114del	alta
5	c358_359 del AA	p.Lys120Glu120fsX122	simple
5	c390del C	p. Asn131MelfsX67	Segregación 3 afectados
5	c413C>A	p.Thr138Lys	incompleta
6	c421 G>T	p.Glu141X	incompleta
Int6	c527+2 T>C	Defecto splicing	incompleta
Int6	c527+1 G>T	Defecto splicing	incompleta
Int6	c527+1 G>A	Defecto splicing	incompleta
Int6	c527+3A>G	Defecto splicing	incompleta
Int6	c528-1 G>A	Defecto splicing	No testada
Int6	c528-3_45del	Defecto splicing	incompleta
7	C581 C>A	pAla194Glu	simple
7	580-581 dup33pb	Inserción 11 aa	simple
7	c636delG	pMet212IlefsX27	Segregación 2 afectados
7	c646G>C	pAla216Pro	incompleta
7	c666dup	pIle223TyrX56	
8	c709_734dup	pCys247X	incompleta
8	c732_737delins20pb	pMetfsX248	Segregación 2 afectados
8	c758_767del	pGly253AlafsX65	simple
8	c769_770ins A	pThr258AspfsX21	simple incompleta
8	c785delT	pPhe265SerfsX59	
8	c828-829delCA	pHys276GlnfsX2	incompleta
Int8	c856_2A>G	Defecto splicing	Segregación 2 afectados
9	c871 G>C	pAla291Pro	simple
9	c893_897dup	pTyr300GlyfsX32	incompleta
9	c877_910del	pArg293_Arg294>ValfsX17	incompleta
9	c895 T>C	pCys299Arg	incompleta
10	c973 G>T	pGlu327X	simple
10	c997delG	pGlu333SerfsX5	incompleta

10/Int10	1049IVS10+20del/insCC CCT	Defecto splicing	simple
Int10	C1073+1 G>A	Defecto splicing	Segregación 5 afectados
11	c1115_1125	pArg372GlnfsX99	incompleta
11	c1142delG	pGly384GlnfsX32	incompleta
Int11	c1146+2 T>C	Defecto splicing	incompleta
12	C1155_1159delGGACG/ nsAGGGATT	pAsp386glyfsX28	incompleta
Int13	c1374+654 C>G	Defecto splicing	incompleta
Ex1/Int1	Indel Int1/ex1	Pérdida 1 copia de prpf31	
04-ago	Del 4.8kb	Pérdida 1 copia de prpf31	simple
abr-13	Del 11.3 kb	Pérdida 1 copia de prpf31	incompleta
PRPF31;TFPT; NDUFA3; OSCAR parcialmente	Del 59kb	Pérdida 1 copia de prpf31	incompleta
PRPF31;TFPT; NDUFA3; OSCAR parcialmente	Del 32-42 kb	Pérdida 1 copia de prpf31	simple
PRPF31;TFPT; NDUFA3; OSCAR	Del > 44.8 kb	Pérdida 1 copia de prpf31	simple
PRPF31;TFPT; NDUFA3; promotor OSCAR	Del 30 kb	Pérdida 1 copia de prpf31	incompleta

Fuente: <http://www.hgmd.cf.ac.uk>

InDel: Inserción-delección

Del: Delección

NDUFA3: NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 alfa, subcomplejo 3

OSCAR: Osteoclasto asociado al receptor tipo inmunoglobulina

1.4 TERAPIA GÉNICA

1.4.1 GENERALIDADES

DEFINICIÓN

La Agencia Europea del Medicamento define la Terapia Génica como aquella que contiene genes dirigidos para un efecto terapéutico y que funciona mediante la inserción de “genes recombinantes” en células, para tratar diferentes enfermedades, que incluyen cáncer, enfermedades genéticas, o enfermedades crónicas. Así mismo define gen recombinante como un fragmento de ADN creado en el laboratorio y que toma dicho ADN de diferentes fuentes. Por tanto, la terapia génica queda englobada en el grupo conocido como terapias avanzadas, las cuales ofrecen nuevas estrategias para abordar enfermedades que hasta el momento carecen de tratamiento eficaz.

Así pues, el objetivo final de la terapia génica es la transferencia de material genético nuevo a las células de un individuo para modular la expresión de determinadas proteínas que se encuentran alteradas, dando lugar a un beneficio terapéutico para el mismo⁸⁴. Para ello podemos actuar de diferentes maneras:

- Sustituir un gen mutado por una copia funcional de ese gen. Este sistema se usa en enfermedades recesivas o en enfermedades de herencia dominante si el mecanismo que causa la enfermedad es la haploinsuficiencia.
- Inactivar un gen mutado que está funcionando de forma inapropiada o bien introducir un gen enteramente nuevo, en el caso de enfermedades autosómicas dominantes.

- Reparar un gen anormal a través de una mutación selectiva que revierta la situación.
- Regular el grado en el que un gen está sobre o infra-expresado.
- Añadir un nuevo gen cuyo producto origine efectos beneficiosos independientemente del gen dañado originariamente.

Para que una enfermedad sea candidata a ser tratada mediante terapia génica debe conocerse el papel del gen en la fisiopatología de esa enfermedad⁸⁵. También es necesario caracterizar adecuadamente el sistema de administración del gen o vector, para controlar su localización en el organismo y la duración de la expresión génica.

Por otro lado, los recientes avances en el conocimiento de la biología del ARN, como el descubrimiento del proceso de interferencia por ARN, han abierto la puerta a la investigación del ARN como molécula terapéutica (ARNi) en ciertas enfermedades genéticas. Cada tipo celular expresa un conjunto de genes que son transcritos a ARNm. La terapia basada en ARN tiene como finalidad modular la expresión de los genes causantes de la enfermedad empleando moléculas de ARN que reconocen a los ARNm producto de la transcripción de esos genes.

INCONVENIENTES DE LA TERAPIA GÉNICA:

1. Corta duración de la terapia génica

Antes de que la terapia génica pueda convertirse en una cura permanente, el ADN terapéutico introducido en las células diana debe seguir siendo funcional y las células que lo contengan deben hacerlo de forma larga y estable. Problemas con la integración de ADN terapéutico en el genoma o la rápida división de las células hacen que la terapia génica no logre beneficios a largo

plazo. Los pacientes tendrían que someterse a varios ciclos de tratamiento.

2. Respuesta inmune

Cada vez que un objeto extraño se introduce en los tejidos humanos, el sistema inmune se activa para atacar al invasor. El riesgo de estimular el sistema inmunológico es una manera de reducir la eficacia de esta terapia. Por otro lado, la respuesta inmune hace que sea difícil que la terapia génica pueda repetirse en los pacientes.

3. Problemas con los vectores virales

Los virus presentan diversos problemas potenciales para el paciente, la toxicidad, la respuesta inflamatoria, el control de los genes y los problemas de su orientación. Además, siempre existe el temor de que el vector viral, una vez dentro del paciente, puede recuperar su capacidad de causar enfermedad.

4. Trastornos multigénicos

Las condiciones o trastornos que surgen de mutaciones en un solo gen son los mejores candidatos para la terapia génica. Por desgracia, algunos de los trastornos más comunes, tales como la hipertensión arterial, la enfermedad de Alzheimer, la artritis o la diabetes, son causadas por los efectos combinados de las variaciones en muchos genes. Las enfermedades multigénicas o multifactoriales son difíciles de tratar de forma efectiva con terapia génica.

5. Mutagénesis de inserción

Si el ADN se integra en el lugar equivocado en el genoma, por ejemplo un gen supresor de tumor, podría provocar un tumor. Esto ha ocurrido en los ensayos clínicos para la inmunodeficiencia combinada severa (SCID) ligada al cromosoma X, en la que las células madre hematopoyéticas son transducidas con un transgén correctivo

utilizando un retrovirus. Llevó al desarrollo de leucemia de células T en 3 de 20 pacientes en los que se realizó el ensayo.

MARCO HISTÓRICO

El descubrimiento de las enzimas de restricción en el año de 1970 por Arber y Hamilton sentó las bases para transferir genes entre diferentes células u organismos, inclusive pertenecientes a diferentes especies. En 1978 se realizó la primera hormona recombinante insertando el gen de la insulina en una bacteria *E. coli*. De allí en adelante se afianzaron los conocimientos necesarios para transferir genes a células humanas con el fin de alterar el fenotipo patológico y generar una nueva forma terapéutica. La primera transferencia se realizó en 1989 en un paciente con una inmunodeficiencia. Aunque no se encontraron efectos clínicos se explicitó que tampoco había efectos deletéreos como muchos apocalípticamente habían pronosticado.

En 1990 W. French Anderson propone el uso de células de médula ósea tratadas con un vector retroviral que porta una copia correcta del gen que codifica para la enzima adenosina deaminasa (ADA)⁸⁶, la cual se encuentra mutada en una enfermedad que forma parte del grupo de las SCID (inmunodeficiencia severa combinada). Se realizó la transformación ex-vivo con los linfocitos T del paciente, que luego se volvieron a introducir en su cuerpo. Cinco años más tarde, se publicaron los resultados de la terapia⁸⁷, lo que contribuyó a que la comunidad científica y la sociedad consideraran las posibilidades de esta técnica. No obstante, el apoyo a la terapia fue cuestionado cuando algunos niños tratados para SCID desarrollaron leucemia. Las pruebas clínicas se interrumpieron temporalmente a causa del impacto que supuso el caso de Jesse Gelsinger en 1999, la primera persona reconocida públicamente como fallecida a causa de la terapia génica. Su muerte

se debió al uso del vector adenoviral para la transducción del gen necesario para tratar su enfermedad, lo cual causó una excesiva respuesta inmune, con un fallo multiorgánico y muerte cerebral.

En 2003 un equipo de investigadores de la Universidad de California insertó genes en un cerebro usando liposomas recubiertos de un polietilenglicol⁸⁸. La transferencia de genes en este órgano es un logro significativo porque los vectores virales son demasiado grandes para cruzar la barrera hemato-encefálica. Este método tiene potencial para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. También en ese año se planteó la interferencia por ARN para tratar la enfermedad de Huntington⁸⁸.

En 2006 científicos del National Institut of Health (EEUU) trataron exitosamente un melanoma metastático en dos pacientes usando células T para atacar las células cancerosas. Este estudio constituye la primera demostración de que la terapia génica puede ser eficaz en el tratamiento del cáncer⁸⁹. Actualmente el 64,2% de los estudios en terapia génica están desarrollándose para tratar el cáncer⁹⁰. En este sentido los estudios pueden ir enfocados en diversas líneas de trabajo. El gen *P53*, regulador de la apoptosis está mutado en muchos tipos de tumores. Se ha ensayado exitosamente con la introducción del gen *P53* en células tumorales⁹¹. Igualmente en tumores en los que no existe dicha mutación, se ha observado que sí existe una alteración en la función de la vía normal de p53, por lo que se plantea esta terapia como otra opción que puede resultar útil⁹². Otras vías de trabajo van enfocadas en silenciar oncogenes^{93,94,95} o en introducir genes suicidas directamente en las células cancerosas^{96,97}.

1.4.2 TERAPIA GÉNICA EN DISTROFIAS RETINIANAS

El 1 de mayo del 2007, el Moorfields Eye Hospital y la Universidad College London's Institute of Ophthalmology, y un

año después el Hospital de Niños de Filadelfia, anunciaron el primer ensayo de terapia génica en una enfermedad hereditaria de retina, la LCA. La primera operación (en Inglaterra) se llevó a cabo en un varón británico de 23 años, Robert Johnson, a principios de ese año⁹⁸. Mientras, en Filadelfia, Corey Haas fue el primer niño en obtener este tipo de terapia.

La LCA es una enfermedad hereditaria que causa la ceguera por mutaciones en el gen *RPE65*. Experimentos desarrollados en modelos animales de ratón⁹⁹ y perro¹⁰⁰ demostraron mejoría de la visión mediante el tratamiento con terapia génica usando adenovirus en los que se insertó el gen normal *RPE65*. Posteriormente se publicaron en New England Journal of Medicine los primeros resultados en humanos¹⁰¹. Se investigó la transfección subretiniana con el virus recombinante adenoasociado (AAV) llevando el gen *RPE65*, y se encontraron resultados positivos. Los pacientes mostraron incremento de la visión sin efectos secundarios aparentes¹⁰¹. Los ensayos clínicos de esta terapia se encuentran en fase II. Más recientemente fueron publicados los resultados del seguimiento durante tres años de pacientes igualmente tratados. Los resultados mostraron mejoría de la agudeza visual corregida, en los defectos campimétricos y una reducción del nistagmus¹⁰². Trabajos publicados más recientemente han demostrado que aunque la mejoría de la visión persiste en el tiempo, y que no hay alteraciones inmunológicas tras una segunda inyección en el ojo contralateral, el proceso degenerativo no se ha logrado detener⁷². La combinación de terapia génica y terapia celular podría ser una alternativa en estos casos.

En Septiembre de 2009 se publicó en Nature que unos investigadores de las Universidades de Washington y de Florida fueron capaces de proporcionar visión cromática a monos con ceguera

rojo-verde usando terapia génica¹⁰³. Recientemente se han publicado los resultados de la interferencia para silenciar el gen *Gcap1* (que es uno de los responsables de la distrofia de conos y bastones) en un modelo de ratón mutante para dicha enfermedad. La terapia génica ha logrado aumentar la

supervivencia de los bastones y mejorar la función visual en estos animales¹⁰⁴.

En la tabla 3 se muestran los ensayos clínicos con terapia génica en enfermedades oculares actualmente en curso.

Tabla 3. Ensayos clínicos en enfermedades oculares en curso basados en terapia génica⁹⁰.

ID ensayo	Título	Vector
AU-0025	A Phase I/II controlled, dose-escalating trial to establish the baseline safety and efficacy of a gene therapy product into the eyes of patients with exudative age-related macular degeneration (AMD).	AAV
AU-0029	A Phase I/II Controlled Dose-escalating Trial to Establish the Baseline Safety and Efficacy of a Single Subretinal Injection of rAAV.sFlt-1 Into Eyes of Patients With Exudative Age-related Macular Degeneration (AMD)	AAV
CA-0026	Clinical Trial of Retinal Gene Therapy for Choroideraemia Using an Adeno-associated Viral Vector (AAV2) Encoding Rab-escort Protein 1 (REP1)	AAV
CA-0027	An Open Label Clinical Trial of Retinal Gene Therapy for Choroideremia Using an Adeno-associated Viral Vector (AAV2) Encoding Rab-escort Protein-1 (REP1)	AAV
CN-0025	Safety and Efficacy Study of a Single Intravitreal Injection of rAAV2-ND4 Treatment of Leber Hereditary Optic Neuropathy	AAV
FR-0059	A phase I/IIa, non randomized, escalating dose, open-label study to evaluate safety and efficacy of GS010 (rAAV2/2-CMV-ND4) in patients suffering from Leber Hereditary Optic Neuropathy due to mutations in the mitochondrial NADH Dehydrogenase 4 gene	AAV
FR-0060	A Phase I/IIa Dose Escalation Safety Study of Subretinally Injected UshStat? Administered to Patients with Retinitis Pigmentosa Associated with Usher Syndrome Type 1B	Lentivirus
IL-0008	Phase I Trial of Ocular Subretinal Injection of a Recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV2-hRPE65) Gene Vector to Patients With Retinal Disease Due to RPE65 Mutations	AAV
SA-0001	Phase I Trial of Ocular Subretinal Injection of a Recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV2-VMD2-hMERTK) Gene Vector to Patients With Retinal Disease Due to MERTK Mutations	AAV

UK-0192	An open label dose escalation study of retinal gene therapy for choroideraemia with an adeno-associated viral vector (AAV2/2) expressing Rab-escort protein 1 (REP-1)	AAV
UK-0200	An Open Label Dose Escalation Phase 1 Clinical Trial of Retinal Gene Therapy for Choroideraemia Using an Adeno-associated Viral Vector (AAV2) Encoding Rab-escort Protein 1 (REP1)	AAV
US-0677	Phase I Trial of Ocular Subretinal Injection of a Recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV-RPE65) Gene Vector in Patients with Retinal Disease Due to PE65 Mutations	AAV
US-0487	An Open-Label, Phase I, Single Administration, Dose Escalation Study of ADGVPEDF.11D (ADPEDF) in Neovascular Age-Related Degeneration (AMD)	Adenovirus
US-0539	Phase I/II Evaluation of Safety and Efficacy of a Matrix-Targeted Retroviral Vector Bearing a Dominant Negative Cyclin G1 Construct (Mx-dnG1) as Adjunctive Intervention for Superficial Corneal Opacity/Corneal Scarring	Retrovirus
US-0575	A Phase I Study of NT-501, an Implant of Encapsulated Human NTC-201 Cells Releasing CiliaryNeurotrophic Factor (CNTF), in Patients with Retinitis Pigmentosa	Plásmido desnudo de ADN
US-0589	A Phase 1 Study in Glaucoma Subjects Receiving SCH 412499 (rAd-p21) Administered as a Single Injection into the Subconjunctival Space Prior to Primary Trabeculectomy	Adenovirus
US-0677	Phase I Trial of Ocular Subretinal Injection of a Recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV-RPE65) Gene Vector in Patients with Retinal Disease Due to RPE65 Mutation	AAV
US-0740	Subretinal (Phase I, Retinal Disease Due to RPE65 Mutations)	AAV
US-0745	A Phase II Study of Implants of Encapsulated Human NTC-201 Cells Releasing CiliaryNeurotrophic Factor (CNTF), in Participants with Visual Acuity Impairment Associated with Atrophic Macular Degeneration	Plásmido desnudo de ADN
US-0795	A Phase II Study of Encapsulated Human NTC0201 Cell Implants Releasing CiliaryNeurotrophic Factor (CNTF) for Participants with Retinitis Pigmentosa Using Visual Acuity as the Primary Outcome	Plásmido desnudo de ADN
US-0796	A Phase II Study of Encapsulated Human NTC0201 Cell Implants Releasing CiliaryNeurotrophic Factor (CNTF) for Participants with Retinitis Pigmentosa Using Visual Field Sensitivity as the Primary Outcome	Plásmido desnudo de ADN
US-0918	A Multiple-Site, Phase 1/2, Safety and Efficacy Trial of a Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Expressing RPE65 (rAAV2-CB-hRPE65) in Patients with Leber Congenital Amaurosis Type 2	AAV

US-0948	A Phase 1, Open-Label, Multi-Center, Dose Escalating, Safety and Tolerability Study of a Single Intravitreal Injection of AAV2-sFLT01 in Patients With Neovascular Age-Related Macular Degeneration	AAV
US-1005	A Safety and Efficacy Study in Subjects with Leber Congenital Amaurosis (LCA) using Adeno-associated Virus Vector to Deliver the Gene for Human RPE65 to the Retinal Pigment Epithelium (RPE) [AAV2-hRPE65v2-301]	AAV
US-1047	A Follow-On Study to Evaluate the Safety of Re-Administration of Adeno-Associated Viral Vector Containing the Gene for Human RPE65 [AAV2-hRPE65v2] to the Contralateral Eye in Subjects with Leber Congenital Amaurosis (LCA) Previously Enrolled in a Phase 1 Study	AAV
US-1061	A Phase I Dose Escalation Safety Study of Subretinally Injected RetinoStat?, a Lentiviral Vector Expressing Endostatin and Angiostatin, in Patients with Advanced Neovascular Age-Related Macular Degeneration	Lentivirus
US-1085	A Phase I/IIa Dose Escalation Safety Study of Subretinally Injected StarGen?, Administered to Patients with Stargardt?s Macular Degeneration	Lentivirus
US-1102	A Phase I/IIa Dose Escalation Safety Study of Subretinally Injected UshStat?, Administered to Patients with Retinitis Pigmentosa Associated with Usher Syndrome Type 1B	Lentivirus
US-1252	A Phase 2 Multicenter Randomized Clinical Trial of CiliaryNeurotrophic Factor (CNTF) for Macular Telangiectasia Type 2 (MacTel)	Plásmido desnudo de ADN
US-X001	Phase I Cand5 Anti-VEGF RNAi Evaluation	*ARNi
US-X002	Cand5 Anti-VEGF RNAi Evaluation (CARE) trial	*ARNi
US-X003	RNAi Assessment of Cand5 in Diabetic Macular Edema (RACE) trial	*ARNi
US-X004	Phase 1 Open-Label, Dose-Escalation Single Dose Trial With Sirna-027 in Patients With Age-Related Macular Degeneration	*ARNi
US-X007	A Study Using Intravitreal Injections of a Small Interfering RNA in Patients With Age-Related Macular Degeneration	*ARNi

Fuente. www.abedia.com/wiley

*ARNi: Terapia de interferencia, no usa vector

1.4.3 IDONEIDAD DEL OJO PARA LA TERAPIA GÉNICA

Existe un amplio número de enfermedades que pueden llegar a tratarse con terapia génica, desde enfermedades monogénicas como la fibrosis quística, hasta enfermedades más complejas como el cáncer¹⁰⁵. Un grupo de afecciones que está despertando un gran interés es el relacionado con los problemas oculares. El ojo presenta una serie de ventajas para la aplicación de este tipo de terapia debido a:

- Su anatomía bien definida
- Su fácil accesibilidad, evitándose la administración sistémica y las barreras que se han de superar para llegar al lugar de acción.
- La reducida dimensión del tejido ocular y la baja difusión a la circulación sistémica, que permite utilizar bajas dosis.
- La posibilidad de utilizar métodos no invasivos y poder comprobar la recuperación mediante la evolución de la función visual.
- El privilegio inmunológico del que goza este órgano¹⁰⁶.

El principal problema que se plantea es que la vía de administración que se ha mostrado más eficiente es la subretiniana, de manera que inducimos un desprendimiento seroso yatrógeno, ya que las barreras hematorretiniana y hematoacuosa hacen que los vectores administrados por vía intravenosa penetren en el ojo en muy poca cantidad y lo mismo ocurre si se opta por la administración tópica.

1.4.4 VECTORES

Los vectores son sistemas que ayudan en el proceso de transferencia de un gen exógeno a la célula, facilitando la entrada y biodisponibilidad intracelular del mismo, de tal modo que este pueda expresarse

correctamente. Existen vectores virales y no virales. Tradicionalmente se han utilizado los vectores virales ya que con ellos se conseguían mejores niveles de trasfección y expresión del gen terapéutico. Sin embargo, los recientes avances en la tecnología de los vectores no virales han cedido el paso a novedosas moléculas y técnicas con eficiencia similar a la de los virus, que además cuentan con la ventaja de poderse producir a mayor escala y su baja inmunogenicidad.

VECTORES NO VIRALES

1. Inyección directa de ADN

Por este método, el ADN o ARN puro circular y cerrado covalentemente es directamente inyectado dentro del tejido deseado. Este método es simple, económico, y un procedimiento que no es tóxico comparado con la entrega mediante virus. El potencial para llevar largas construcciones de ADN es también ventajoso. De cualquier manera, los niveles y persistencia de la expresión de genes es demasiado corta (días).

2. Métodos físicos

Se han realizado esfuerzos en la investigación para mejorar la eficiencia de la inyección directa de ADN, y se ha experimentado con diversos métodos físicos que facilitan el paso del ADN al interior de las células. Algunos de estos métodos son:

Electroporación: utiliza pulsos de alto voltaje para facilitar el paso del ADN a través de la membrana celular.

Sonoporación: en este caso se produce una disrupción de la membrana celular mediante la cavitación producida con ultrasonidos.

Bombardeo de partículas: En este método físico el plásmido de ADN es revestido de gotas de 1 a 3 micras de

diámetro de oro o tungsteno. Estas partículas son aceleradas por una descarga eléctrica o por un pulso de gas y son "disparadas" hacia el tejido. La fuerza física del impacto supera la barrera de la membrana celular. Sin embargo, la rigidez de los diferentes tejidos, la procedencia del ADN extraño, y la capacidad de transcripción intrínseca conducen a grandes variaciones en la eficiencia de la expresión de los genes en conjunto.

3. Métodos químicos

Liposomas catiónicos: La técnica recae en las propiedades de carga eléctrica del ADN (negativo debido a la cadena de fosfatos en la doble hélice), lípidos catiónicos (carga positiva) y la superficie celular (una red de cargas negativas debido a los residuos del ácido siálico). Los complejos transfectantes, con carga neta positiva, se fijan a la célula mediante proteínas azucaradas de la membrana plasmática. Luego, las interacciones electrostáticas les permiten la penetración. Aunque han sido ampliamente utilizados, se ha observado cierta toxicidad dependiente de la dosis que puede limitar su uso terapéutico.

Transferencia de genes mediante receptores: Este método utiliza unas moléculas específicas (ligantes) que serán reconocidas por los receptores presentes en el tejido diana. La naturaleza de los ligantes es muy variada, azúcares, péptidos, hormonas, etc. Las células absorben los elementos del medio exterior por endocitosis: su membrana se repliega hasta formar una vesícula, el endosoma. Los complejos de transfección aprovechan este mecanismo para penetrar en sus objetivos celulares. El interior del endosoma se acidifica progresivamente y luego se fusiona con otra clase de vesícula llamada lisosoma, que contiene enzimas que degradan su contenido. Por tanto, una vez en el endosoma, los complejos deben escapar de él antes de ser vertidos en los

lisosomas y sufrir el ataque enzimático. Por esto, a los vectores sintéticos se les asocia unas moléculas, llamadas fusiógenas, que desestabilizan las membranas del endosoma y les permite evadirse. A fin de que la actividad fusiógena se manifieste únicamente después de la entrada en el endosoma, se eligen unas moléculas cuya actividad sólo tiene lugar cuando el medio se acidifica.

Una vez en el citoplasma, en células en crecimiento, el ADN penetra en el núcleo durante la división celular, cuando se rompe la envoltura nuclear. Pero en las células en reposo - estado en el cual se encuentran la mayor parte de las células del organismo- la envoltura nuclear constituye una barrera que únicamente deja pasar por difusión moléculas cuyo tamaño sea inferior a 9 nm. A través de los poros de la membrana nuclear pasan moléculas de 9 a 25 nm. La mayoría de los complejos de transferencia miden más de 25 nm. Actualmente, esta etapa del transporte nuclear es la más difícil de resolver.

Nanopartículas: Aunque las nanopartículas han sido definidas como estructuras con un tamaño comprendido entre 1-100 nm en algunos campos, en realidad no existe un consenso sobre tal definición. Sin embargo, cuando nos referimos a una aplicación terapéutica podrían definirse como una ultradispersión de estructuras supra-moleculares, generalmente poliméricas y que pueden exhibir un tamaño de hasta unos cientos de nanómetros. Para llevar a cabo una eficiente liberación sistémica, las nanopartículas deben ser lo suficientemente grandes para evitar el rápido aclaramiento renal vía filtración glomerular, y lo suficientemente pequeñas para ser capaces de atravesar el endotelio capilar con el fin de alcanzar el tejido diana^{107,108,109}.

Dependiendo del procedimiento utilizado para la preparación de los nanosistemas,

éstos pueden clasificarse en nanoesferas (nanoestructuras tipo matricial) o nanocapsulas (nanoestructuras tipo reservorio), pudiendo encontrarse las moléculas terapéuticamente activas dentro de la matriz del nanosistema, atrapadas en el núcleo o adsorbida.

El diseño de nanosistemas ha experimentado, con el paso de los años, grandes avances entre los que cabe citar el paso de sistemas basados en polímeros no biodegradables, tales como poliacrilamida o polimetilmetacrilato, al empleo de materiales tales como albúmina, quitosano, poliláctico-glicólico o compuestos lipídicos.

Para mejorar el direccionamiento, inicialmente se propuso la decoración de estos nanosistemas con anticuerpos, sin embargo, esta estrategia no resultó ser una solución adecuada, por dar lugar a sistemas con tamaños muy grandes y, además, porque eran captados mayoritariamente por el sistema retículo endotelial y el hígado. A continuación las nanopartículas fueron decoradas con ligandos para facilitar su direccionamiento (ej. péptidos), los cuales reconocen sitios específicos de un determinado grupo celular e, incluso, pueden controlar el tráfico intracelular de las nanopartículas

VECTORES VIRALES

Todos los virus se unen a sus células diana e introducen su material genético en la célula huésped como parte de su ciclo de replicación. Este material genético básico contiene "instrucciones" de cómo producir más copias de estos virus y llevar a cabo el secuestro de la maquinaria de la célula normal de producción para satisfacer las necesidades del mismo. Algunos tipos de virus insertan físicamente sus genes en el genoma del huésped (característica típica de los retrovirus) con lo cual los genes de ese virus permanecen entre los genes de la célula huésped durante la

vida útil de la célula. Gracias a esta capacidad los virus pueden ser utilizados como vehículos para transferir genes 'sanos' a una célula humana. En primer lugar, habría que eliminar los genes del virus que causan enfermedad y posteriormente se sustituirían con los genes que codifican el efecto deseado. Este procedimiento debe hacerse de tal manera que los genes que permiten al virus insertar su genoma en el núcleo de la célula huésped permanezcan intactos¹¹⁰.

Consideramos los sistemas de vectores virales basados en cuatro grupos de virus diferentes: retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados y herpesvirus¹¹¹.

1. Retrovirus

Los retrovirus (Fig. 28) comprenden un gran grupo de virus desarrollados que contienen ARN de cadena sencilla como genoma viral. Durante el ciclo de vida vírico normal, el ARN vírico se transcribe a la inversa para producir ADN de cadena doble (gracias a la acción de la enzima retrotranscriptasa) que se integra en el genoma de la célula hospedadora y se expresa en períodos prolongados. Como resultado, las células infectadas vierten virus de forma constante sin daño aparente en la célula hospedadora. El genoma viral es pequeño (aproximadamente 10 kilobases), y su organización prototípica es muy sencilla.

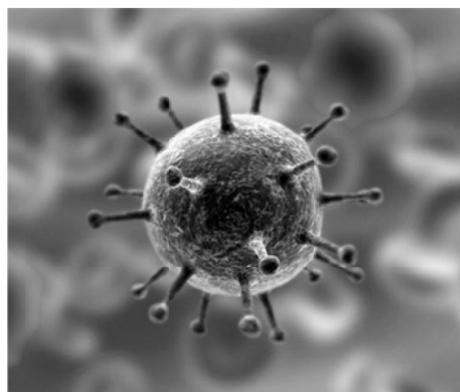


Figura 28. Retrovirus

La principal ventaja de los vectores de retrovirus es que se integran y son capaces de una expresión a largo plazo. Además pueden ser desarrollados en cantidades relativamente grandes. Sin embargo, la mayoría de los retrovirus se pueden integrar sólo en células que se replican (el virus de la inmunodeficiencia humana parece ser una excepción). Esta propiedad, poseída por la mayoría de los retrovirus, restringe claramente su uso como vector para la terapia génica.

2. Herpesvirus

El herpesvirus (Fig. 29) presenta un material genético compuesto por ADN bicatenario lineal que en el virus del herpes simplex ronda las 50 Kb y las 220 Kb en el citomegalovirus. El potencial de estos virus como vectores génicos recae en la habilidad de llevar grandes secuencias de ADN extraño insertadas y su habilidad para establecer infecciones latentes de larga duración en las cuales el genoma del virus existe como un episoma con efectos no aparentes en la célula hospedadora.

Un inconveniente mayor al uso de estos virus en terapia génica, de cualquier manera, es su relación con diferentes patologías. Los Gamma-herpesvirus están asociados con daños linfoproliferativos y en algunos momentos con malignidad. Los Beta-herpesvirus o citomegalovirus, pueden tener potencial como vectores génicos para la terapia génica, pero el desconocimiento de la biología de estos virus, y en particular la naturaleza de la infección latente, es escasa.

En contraste, los Alfa-herpesvirus, no pueden mantener una infección latente en células en división, la herencia de los genes repartidos a las células hijas de la siguiente generación sólo podría ocurrir como resultado de una fortuita integración no específica.

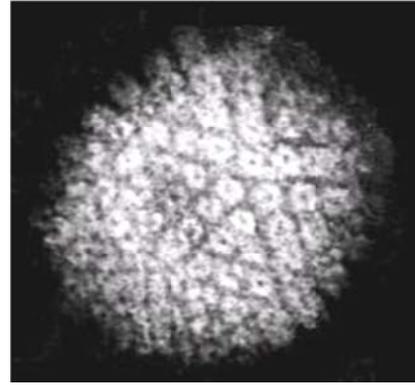


Figura 29. Herpesvirus

3. Adenovirus

Este grupo (Fig. 30) comprende una gran clase de virus no desarrollados que contienen ADN lineal de cadena doble. Los vectores de adenovirus son algo más grandes y complejos que los retrovirus, en parte porque solamente una pequeña fracción del genoma vírico es eliminada de los vectores más corrientes.

Las principales ventajas de los vectores de adenovirus se resumen en que son capaces de transferir el gen episomal de forma eficiente en una amplia cantidad de células y tejidos y que son fáciles de producir en grandes cantidades. La principal desventaja es que la respuesta del hospedador al virus parece limitar la duración de la expresión y la capacidad de repetir la dosis, al menos con altas dosis de vectores de primera generación.

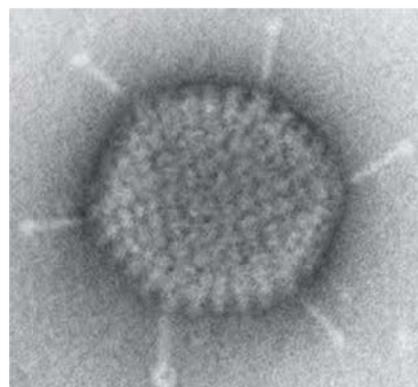


Figura 30. Adenovirus

3. Virus adenoasociados

El AAV (Fig. 31) es un virus muy pequeño, no autónomo, que contiene ADN lineal de cadena sencilla. Requiere la coinfección con adenovirus u otros virus para replicarse. El AAV está extendido en la población humana, como evidencian los anticuerpos frente al mismo, pero no se asocia a ninguna enfermedad conocida.

La ventaja potencial del vector AAV es que parece capaz de una expresión a largo plazo en células que no se dividen, posiblemente aunque no necesariamente porque el ADN vírico lo integra. Los vectores son estructuralmente simples, y pueden provocar menos respuesta de la célula hospedadora que del adenovirus. Su principal limitación en el presente es que los vectores son difíciles de desarrollar en grandes cantidades.

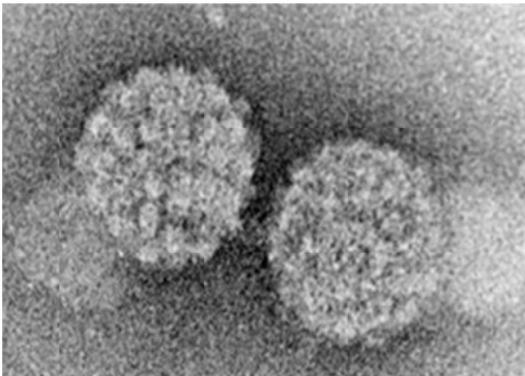


Figura 31. Virus adenoasociados

La organización del genoma del AAV es extremadamente simple, comprendiendo sólo dos genes:

rep, que codifica una familia de proteínas superpuestas involucradas en la replicación e integración.

cap, que codifica una familia de tres proteínas estructurales víricas.

Los extremos del genoma comprenden repeticiones terminales (ITR) de cerca de 145 nucleótidos. Los AAV de tipo salvaje

pueden integrar su ADN en el cromosoma del hospedador en ausencia del virus ayudante. Esta integración puede ocurrir con más frecuencia en regiones del cromosoma 19 y está involucrada la proteína rep.

Los vectores basados en AAV son extremadamente simples. Contienen sólo las secuencias víricas ITR que bordean la unidad de transcripción de interés. Estos dan las secuencias necesarias para la replicación y el empaquetamiento del vector de ADN.

Como ventajas en el uso de estos vectores encontramos:

- Se integra en el genoma de la célula huésped y persiste su expresión a largo plazo en células que no se dividen, como es el caso de los fotorreceptores¹¹².
- No causan mutagénesis de inserción.
- Infecta tanto células en división como quiescentes.
- No supone un peligro para humanos.

Entre los principales inconvenientes destacamos:

- Titulado vírico muy bajo.
- Limitación del inserto a 4.9Kb, no puede exceder mucho de la longitud del genoma viral.

El único problema parece ser que la longitud del vector ADN no puede exceder mucho de la longitud del genoma viral con 4680 nucleótidos. Generalmente, el desarrollo de vectores AAV es voluminoso y lleva consigo la introducción en la célula hospedadora, no solo del propio vector, sino también de un plásmido que codifica rep y cap para proveer las funciones de virus ayudante.

DISEÑO DEL VECTOR

Todos los vectores víricos están hechos al menos de dos componentes, el genoma vírico modificado y la estructura del virión que lo rodea. Esta estructura

envuelve y protege al ácido nucleico viral y provee los medios para unirse y entrar en las células dianas. De todas formas, el ácido nucleico del virus en un vector diseñado para la terapia génica es modificado de muchas formas. Los objetivos de estas modificaciones son (1) discapacitar el crecimiento del virus en las células diana mientras se mantiene su capacidad para desarrollarse en forma de vector (bien en un envase específico o bien en una célula auxiliar), (2) dar espacio en el genoma vírico para la inserción de secuencias de ADN exógeno y (3) incorporar nuevas secuencias que codifiquen y capaciten la expresión apropiada del gen de interés. De esta forma, podemos considerar que los ácidos nucleicos del vector comprenden dos elementos: las secuencias víricas esenciales que permanecen y la unidad de transcripción para el gen exógeno.

Ya que cualquier secuencia que permanezca del virus que codifica podría ser expresada, incluso por un vector viral discapacitado, todas las secuencias víricas no esenciales deberían ser eliminadas.

Dado que los vectores virales que utilizamos en este trabajo fueron vectores adenoasociados, se describe a continuación con mayor detalle el diseño del mismo así como otras características propias de los virus adenoasociados.

ESTRUCTURA Y ELEMENTOS VÍRICOS ESENCIALES

La organización del genoma es ADN lineal de cadena sencilla de 4,6Kb de sentido positivo y negativo, comprendiendo 4 genes superpuestos que codifican las proteínas Rep, necesarias para el ciclo vital del AAV, y el gen *cap* que codifica para las proteínas que forman una cápside de simetría icosaédrica.

Las únicas secuencias esenciales para un vector AAV son los 145 nucleótidos ITRs en el 5' y 3' al final del vector. Éstos dan las secuencias necesarias para la replicación y el empaquetamiento del vector de ADN. Estas ITR o secuencias de repetición invertida terminal tienen la capacidad de formar una horquilla, lo que contribuye al llamado auto-cebado, que permite la síntesis de la segunda cadena de ADN independiente de primasa. La ITR se requiere tanto para la integración del ADN en el genoma de AAV de la célula huésped (cromosoma 19 en humanos) como para el rescate de ella, así como para una encapsidación eficiente del ADN del AAV en combinación con la generación de partículas AAV completas resistentes a desoxirribonucleasa¹¹³.

Con respecto a la terapia génica, las ITR, parecen ser las únicas secuencias necesarias en cis próximas al gen terapéutico; los genes estructurales (*cap*) y de embalaje (*rep*) pueden ser integrados en trans. Con esta premisa se establecieron muchos métodos para la producción eficiente de vectores AAV recombinantes. Sin embargo, algunos grupos de investigación han identificado una secuencia designada como elemento dependiente de *rep* activado en cis (CARE) dentro de la secuencia codificante del gen *rep*. CARE puede aumentar la replicación y encapsidación cuando está presente en cis¹¹⁴⁻¹¹⁶.

Genes *rep*: En el "lado izquierdo" del genoma, hay dos promotores llamados p5 y p19, que producen dos ARN mensajeros (ARNm) solapados de diferente longitud. Cada uno de estos contiene un intrón que puede ser eliminado o no. Teniendo en cuenta estas posibilidades, pueden ser sintetizados cuatro ARNm distintos, y por tanto cuatro proteínas rep cuyos nombres vienen dados por sus tamaños en kilodaltons (kDa): Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40.

Rep78 y 68 se puede unir específicamente la horquilla formada por el ITR en el acto de auto-cebado y se unirá a una región específica: sitio de resolución terminal, dentro de la horquilla. Las cuatro proteínas rep se unen a ATP y poseen actividad helicasa¹¹⁷.

Genes cap: El “lado derecho” de la cadena positiva del genoma, se codifican las secuencias de tres proteínas superpuestas, VP1, VP2 y VP3, que parten de un promotor, designado p40. La cápside de AAV está compuesta por 60 subunidades de dichas proteínas, VP1, VP2 y VP3, que se organizan en una simetría icosaédrica en proporción 01:01:10, con un tamaño estimado de 3.900 Kd.

PRODUCCIÓN DEL VECTOR

Los vectores de AAV no tienen todas las secuencias que codifican virus. En consecuencia, los genes cap y rep deben ser introducidos en las células como plásmidos al mismo tiempo que el plásmido del vector que contiene el ADN circular flanqueado por ITR. Los métodos de transfección usados para este propósito son ineficientes y difíciles de cubrir. Además, las células transfectadas requieren una coinfección con adenovirus para dar funciones auxiliares adicionales.

Los esfuerzos para mejorar la eficiencia de los métodos de producción son obstaculizados porque rep es tóxica para las células. Aunque se han considerado muchos métodos para solventar este problema, como fabricar un adenovirus auxiliar para expresar rep y cap, esto queda como un hecho significativo.

El conjunto mínimo de genes adenovirales necesarios para la generación eficiente de las partículas de AAV, fue descubierto por Matsushita et al¹¹⁸. Este descubrimiento permitió nuevos métodos de producción de proteínas recombinantes AAV que no requieren co-infección por adenovirus en las células productoras AAV. En ausencia de virus auxiliar o factores genotóxicos, el ADN de AAV puede integrarse en el genoma del huésped (integración mediada por las proteínas Rep78 y Rep68, que requiere la presencia de ITRs que flanquean la región donde se integren) o persistir como episoma. En ratones, el genoma AAV se ha observado que persiste durante largos períodos de tiempo en los tejidos en reposo, como los músculos esqueléticos, en forma episomal (conformación circular cabeza-cola)¹¹⁹.

UNIDAD DE TRANSCRIPCIÓN PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN EXÓGENO

Para algunas aplicaciones, el tamaño del vector de ADN es problemático. El ADN mayor de 4800 nucleótidos es difícil de replicar y empaquetar. Cuando el tamaño del ADN introducido no es problemático, como el caso de *PRPF31*, se pueden utilizar unidades de transcripción convencionales. Éstas (Fig. 32) pueden incluir varios promotores exógenos y, en algunos casos, marcadores seleccionables. Para introducir la especificidad de expresión en tejidos, también han sido introducidos segmentos de regiones de control del locus, pero con un éxito limitado¹¹⁰.

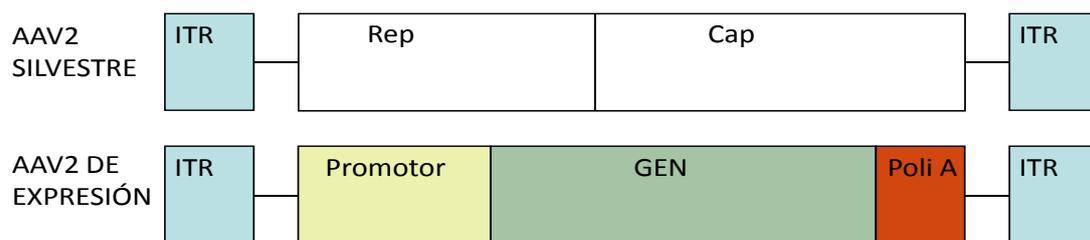


Figura 32. Estructura del vector AAV2 silvestre y de expresión del gen diana.

SEROTIPOS AAV

Se han descrito 11 serotipos del AAV¹²⁰; todos ellos pueden infectar las células de múltiples y diversos tipos de tejidos. La especificidad por un tejido viene determinada por el serotipo de la cápside, por tanto el pseudotipado de los vectores AAV para alterar su rango de tropismo ha sido muy importante para su utilización en terapia génica¹²⁰.

El serotipo 2 (AAV2) ha sido uno de los más estudiados. Presenta un tropismo natural por las células musculares¹¹⁰, neuronas⁵⁹, músculo liso vascular¹¹⁷ y los hepatocitos. A nivel ocular se ha visto que en primates presenta mayor eficiencia de transfección en el EPR que en los fotorreceptores¹²¹. Se han descrito tres receptores en las células humanas para AAV2: el proteoglicano heparán sulfato, la integrina $\alpha V\beta 5$ y el factor 1 del receptor del crecimiento de los fibroblastos. El primero funciona como receptor primario, mientras que los dos últimos tienen una actividad co-receptora y permiten al AAV entrar en la célula por endocitosis mediada por receptor.

Aunque AAV2 es el más utilizado en la investigación basada en AAV, hay otros serotipos que pueden ser más eficaces. AAV6 parece mucho mejor al infectar células epiteliales de las vías respiratorias y muestra menor inmunogenicidad que AAV2. AAV7 presenta una tasa muy alta de transducción en células del músculo esquelético murino (similar a AAV1 y 5), AAV8 es excelente en la transducción en hepatocitos y AAV1 y 5 demostraron ser muy eficientes en la transmisión de genes a células endoteliales vasculares. Además, los serotipos pueden diferir con respecto a los receptores a los que son enlazados. Por ejemplo la transducción de AAV4 y AAV5 puede ser inhibida por ácido siálico soluble y se ha demostrado que AAV5 penetra en las células a través del receptor del factor crecimiento derivado de plaquetas.

CICLO DE INFECCIÓN DEL AAV

Hay varios pasos en el ciclo de infección por AAV¹¹⁷:

- unión a la membrana celular
- endocitosis
- tráfico endosomal
- escapar del endosoma tardío
- translocación al núcleo
- formación de la forma replicativa de doble hélice de ADN del genoma
- expresión de los genes *rep*
- replicación del genoma
- expresión de los genes *cap*, síntesis de partículas de ssADN
- ensamblaje de los viriones completos, y
- liberación de la célula infectada.

Algunos de estos pasos puede ser diferente según el tipo celular, lo que, en parte, contribuye al tropismo definido y limitado de AAV. La replicación del virus también varía en función de la fase del ciclo celular en la que se encuentre.

El rasgo característico de los AAV es una deficiencia en la replicación y por lo tanto su incapacidad para multiplicarse en las células infectadas. El primer factor que fue descrito para proporcionar la generación exitosa de nuevas partículas de AAV, fue el adenovirus, del cual se originó el nombre de AAV. Se demostró entonces que la replicación de AAV puede ser facilitada por algunas proteínas seleccionadas derivadas del genoma del adenovirus, y por otros virus como el VHS, o por agentes genotóxicos, como la irradiación UV o hidroxiurea.

INMUNOLOGÍA DEL AAV

AAV es de particular interés para la terapia génica debido a su limitada capacidad para inducir respuesta inmune en el ser humano, factor que influye positivamente en la eficiencia de la transducción de vectores y reduce el riesgo de cualquier patología asociada. Respuesta innata

La respuesta inmune innata a los vectores AAV se ha caracterizado en los modelos animales. La administración intravenosa en ratones provoca la producción transitoria de citoquinas pro-inflamatorias y alguna infiltración de neutrófilos y otros leucocitos en el hígado, lo que parece capturar un gran porcentaje de las partículas virales inyectadas. Ambos niveles de los factores solubles y la infiltración de células parecen volver a los valores basales dentro de las seis horas. Por el contrario, los virus más agresivos producen respuestas innatas que duran 24 horas o más¹²².

Respuesta Humoral

Se sabe que el virus estimula una inmunidad humoral robusta en modelos animales y en la población humana, donde se cree que hasta un 80% de las personas son seropositivos para AAV2. Los anticuerpos son neutralizantes y esto puede tener un impacto en la eficiencia de transducción del vector, dependiendo de la vía de administración. De los ensayos clínicos de sensibilización y refuerzo en animales se desprende que la memoria de los linfocitos B es fuerte. En los seres humanos seropositivos, los anticuerpos circulantes para AAV2 responsables de la respuesta tardía, son fundamentalmente IgG (subclases IgG1 e IgG2)¹²³.

Respuesta mediada por células

La respuesta celular contra el virus y contra los vectores está pobremente caracterizada y ha sido ampliamente ignorada en la literatura hasta hace relativamente poco tiempo. Los ensayos clínicos utilizando un vector basado en AAV2 para el tratamiento de la hemofilia B indican que puede ocurrir la destrucción selectiva de células transducidas. Junto con los datos que muestran que células T CD8 + pueden reconocer elementos de la cápside del AAV in vitro, parece que puede haber

una respuesta de los linfocitos T citotóxicos a los vectores AAV.

Respuestas citotóxicas implicarían la participación de las células T helper CD4 + en la respuesta a AAV y datos in vitro a partir de los estudios en humanos sugieren que el virus realmente puede inducir a respuestas tales como respuestas de memoria Th1 y Th2.

Se han identificado un número de epítomos candidatos en la proteína VP1 de la cápsida del AAV que estimulan las células T, que pueden ser blancos atractivos para la modificación de la cápsida del virus, si va a ser utilizado como un vector para terapia génica¹²³.

ENSAYOS CLINICOS MEDIADOS POR AAV

Hasta la fecha los AAV se han utilizado en ensayos clínicos en fase I y II para el tratamiento de la fibrosis quística y en fase I en casos de hemofilia. También se han encontrado resultados prometedores en ensayos clínicos en fase I en la enfermedad de Parkinson, mostrando una buena tolerancia del vector AAV2 en el sistema nervioso central. Otros ensayos que están en fase de iniciación, concernientes a la seguridad del virus AAV son el tratamiento de la distrofia muscular, la enfermedad de Canavan y la lipofuscinosis neuronal.

En enfermedades oculares existen actualmente 17 ensayos clínicos en marcha en los que se utiliza como vector de transmisión del gen el AAV^{90,124, 125} (Tabla 3). AAV2 se ha utilizado como vector en ensayos clínicos en pacientes con LCA.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICACIÓN

La RP es una distrofia hereditaria de la retina, caracterizada por una degeneración progresiva de los fotorreceptores. Hasta ahora se han identificado más de 80 genes³² asociados con la enfermedad, siendo la mayoría de ellos expresados exclusivamente en la retina. Sin embargo, algunos de los genes asociados a la RP se expresan de manera ubicua en el organismo, pero producen un fenotipo exclusivo en la retina. Uno de estos genes no específicos de la retina es el gen *PRPF31* (precursor del factor 31 de procesamiento de ARN) y causante de RPad. Se localiza en el cromosoma 19q13.4, locus RP11 y codifica la proteína PRPF31, factor de empalme necesario para la maduración de pre-ARNm.

Las familias afectadas por esta mutación genética muestran penetrancia incompleta, lo cual ha sido explicado en base a un mecanismo de haploinsuficiencia⁸¹, ya que la mayoría de las mutaciones en *PRPF31* producen proteínas truncadas. Además, se ha observado que los pacientes con una elevada expresión del alelo normal no desarrollan la enfermedad. Para el estudio de la fisiopatología de la enfermedad asociada a esta mutación se han creado dos modelos de ratón, *Prpf31*^{A216P/+} knock-in (KI) y *Prpf31*^{+/-} knock-out (KO)¹²⁶.

La evaluación de estos animales no ha mostrado un fenotipo claro de degeneración de retina y la única observación de alteración morfológica, descrita por microscopía electrónica, es que en los KO hay vacuolización de las células del EPR y depósito de un material amorfo entre el EPR y la membrana de Bruch¹²⁷.

Actualmente se desconocen tanto la causa de estos cambios morfológicos observados en el EPR de estos ratones como los mecanismos moleculares exactos que conducen a la muerte de los fotorreceptores en pacientes con mutaciones en el gen *PRPF31*.

La RP sigue siendo hasta ahora una patología crónica, incapacitante y sin ningún tratamiento curativo. Durante la última década la terapia génica ha surgido como una alternativa terapéutica novedosa y prometedora para tratar enfermedades que hasta el momento no tenían cura. Por tal motivo decidimos realizar una prueba de concepto para determinar si la terapia génica puede ser considerada como una opción terapéutica para la RP causada por mutaciones en el gen *PRPF31*.

En vista que el fenotipo de los ratones modelo de esta enfermedad es poco demostrativo y difícil de cuantificar, decidimos profundizar en la caracterización fenotípica de los ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI, enfocándonos principalmente en cambios morfológicos y funcionales del EPR de estos animales. La caracterización fenotípica es útil no solo para encontrar signos que permitan cuantificar el efecto terapéutico de cualquier nuevo medicamento, sino que también sirve para establecer las bases moleculares de la enfermedad, y este conocimiento es esencial para poder encontrar la verdadera diana terapéutica en cualquier ensayo clínico de terapia génica.

2.2 HIPÓTESIS

Las dos hipótesis (H) fundamentales sobre las que se apoya esta investigación son las siguientes:

H1: Conociendo que la mutación en el gen *PRPF31* puede causar tanto RPad como otras alteraciones degenerativas de la mácula⁸³ y dado que en el modelo mutante *Prpf31*^{-/+} KO se ha observado engrosamiento de la membrana de Bruch¹²⁷, una de las características de la degeneración macular, nos hemos planteado si el fenotipo expresado por el ratón *Prpf31*^{A216P/+} KI estará más relacionado con un modelo de degeneración del EPR macular que con uno de RP y podría usarse como modelo de DM.

H2: Dado que la haploinsuficiencia es considerada como el principal mecanismo por el cual las mutaciones en el gen *PRPF31* conducen a la degeneración de la retina⁸¹ y conociendo que la terapia génica utilizando AAV2 es segura y eficaz para el tratamiento en humanos de otras enfermedades degenerativas de la retina como la LCA^{102,124}; nos hemos planteado si la terapia génica a través de la sobre-expresión del gen *PRPF31* podrá ser segura y eficaz para mejorar la función visual de ratones heterocigotos *Prpf31*^{A216P/+} KI adultos.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 OBJETIVOS GENERALES

La experimentación animal en el diseño de nuevas terapias es un requisito imprescindible de los ensayos pre-clínicos. Por ello es de suma importancia contar con los modelos animales que simulen la enfermedad del humano y que tengan características clínicas que se puedan cuantificar¹²⁸. Por tal motivo, la investigación experimental de esta tesis se ha dividido en dos objetivos generales (OG):

OG1: caracterizar el fenotipo de los ratones mutantes *Prpf31*^{A216P/+} KI para su uso como modelo experimental de distrofia retiniana para la evaluación de terapias avanzadas.

OG2: evaluar la seguridad y eficacia de la liberación del gen *PRPF31* en la retina de los ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI.

2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para desarrollar los dos objetivos generales nos planteamos los siguientes objetivos específicos (OE) en cada uno de ellos:

OE1: CARACTERIZAR EL FENOTIPO DE LOS RATONES K.I.

OE1.1: Examinar el fondo de ojo a través de funduscopia.

OE1.2: Describir la respuesta del reflejo OKR a través del test optomotor.

OE1.3: Evaluar la amplitud y frecuencia de las ondas a, b y c del ERG.

OE1.4: Cuantificar el grosor de la retina a través de TCO.

OE1.5: Realizar el estudio histológico de la retina y de expresión de diferentes proteínas a través de WT.

OE1.6: Observar los cambios morfológicos y funcionales posteriores a la exposición a la luz y electroporación.

OE1.7: Determinar la distribución de la expresión de la proteína PRPF31 en la retina del ratón.

OE1.8: Cuantificar la expresión de diferentes genes del ciclo visual en condiciones de luz y oscuridad.

OE2: EVALUAR LA SEGURIDAD Y EFICACIA DE LA LIBERACIÓN DEL GEN PRPF31 EN RETINA DE RATONES

OE2.1: Construir los plásmidos y producir los AAV2 portando el gen *PRPF31* o solo con la proteína fluorescente verde humanizada (EGFP)

OE2.2: Purificar, concentrar y titular las partículas virales.

OE2.3: Valorar la capacidad de infección de los AAV2 y determinar los efectos citotóxicos en cultivos celulares.

OE2.4: Realizar la inyección subretinal en ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI con los vectores AAV2-GFP, AAV2-*PRPF31*.

OE2.5: Evaluar a los animales inyectados por medio de funduscopia, ERG, test optomotor, TCO, histología y WB.

OE2.6: Utilizar nanopartículas como alternativa a los vectores virales y evaluar su eficacia.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

3.1.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los experimentos descritos en este trabajo han sido realizados de acuerdo con la Directiva Europea 2010/63/UE de protección de los animales utilizados para fines científicos y Real Decreto 53/2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Los métodos experimentales para la manipulación de los animales han sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de CABIMER y el Gobierno Andaluz. Se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar el número de animales usados y su sufrimiento.

3.1.2 GENOTIPADO Y MANTENIMIENTO DE LA COLONIA

Los ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI y *Prpf31*^{-/+} KO en la cepa C57BL/6 fueron obtenidos del “Institut de la Vision”, Université Pierre et Marie Curie-Paris, Francia. La mayoría de los experimentos para realizar esta tesis fueron realizados con el modelo heterocigoto *Prpf31*^{A216P/+} KI ya que el ratón *Prpf31*^{-/+} KO ha seguido siendo estudiado por Farkas y col.¹²⁹. Los ratones homocigotos *Prpf31*^{A216P/A216P} y *Prpf31*^{-/-} fueron embrionariamente letales como ha sido descrito por Bujakowska y col.¹²⁶. Las parejas reproductoras y sus crías se mantuvieron individualmente en cajas de plástico transparente ventiladas de 15 x 16 x 30 cm (ancho x alto x largo) en la Unidad de Recursos Biológicos de CABIMER, con temperatura (23 ± 1°C) y humedad (35 ± 5%) controladas y un ciclo de luz-oscuridad fue de 12h (7:30h-19:30h). Los ratones tuvieron libre acceso en todo momento a comida y agua.

Para realizar el genotipado se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es una técnica de biología molecular que permite obtener amplificar un fragmento de DNA en particular, “purificando” esa región del resto del genoma. La reacción consta de 20 a 30 ciclos en los que la secuencia se multiplica y el producto de cada ciclo sirve de plantilla para el siguiente ciclo (Fig. 33).

Se eligen dos grupos de nucleótidos de ADN que flanquean la secuencia que queremos amplificar y se generan los oligonucleótidos complementarios que sirven de cebadores para la síntesis in vitro de ADN, que es llevada a cabo por una enzima que es la ADN polimerasa.

Al inicio de la PCR hay un primer paso, llamado desnaturalización, en el que la doble hélice de ADN se abre y las cadenas se separan. A continuación los cebadores se unen con sus secuencias complementarias en cada cadena de ADN. Este paso se llama hibridación o alineamiento. Entonces ocurre síntesis de nuevo ADN. Mediante la incubación con las enzimas polimerasas, se generan nuevas cadenas de ADN comenzando desde cada cebador en sentido 5'→3'. De nuevo vuelve a repetirse todo el proceso durante el número de ciclos que hayamos programado. Al final, generalmente, se lleva a cabo una última etapa que se llama elongación final con la que se pretende que cualquier ADN de cadena simple sea amplificado¹³⁰.

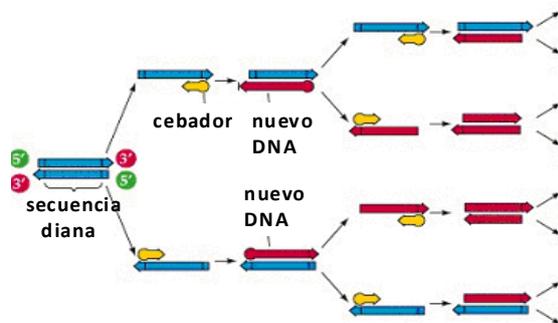


Figura 33. Reacción en cadena de la polimerasa.

Para el genotipado de los ratones mutantes *Prpf31* se realizó la PCR (anexo I) a partir de ADN genómico, utilizando como cebador directo 5'-AGT GTC ACT GCC TCT ACT ACC CAG- 3' dirigido al exón 6 y como cebador reverso 5'-AGC CGC TCT AGC TCC TCA TC- 3' dirigido al exón 7. De esta forma en el ratón heterocigoto *Prpf31*^{A216P/+} el producto de la PCR incluiría uno de los sitios loxP ausente en el ratón *Prpf31*^{+/+} wild type (WT). Para genotipar los ratones *Prpf31*^{+/+} se utilizó el cebador directo 5'- CTC CTG AGT ACC GAG TCA TTG TGG ATG C- 3' del exón 4 y el reverso 5'- GTA GAA GAG AAG CCA GAC AGG GTC TTG C- 3' del exón 8. La presencia de dos bandas en el gel de agarosa sirvió para identificar a los ratones *Prpf31*^{A216P/+KI} y *Prpf31*^{-/-} KO (Fig. 34). También, se descartó la presencia de la mutación rd8 en el gen *Crb1*, los detalles se describen en resultados.

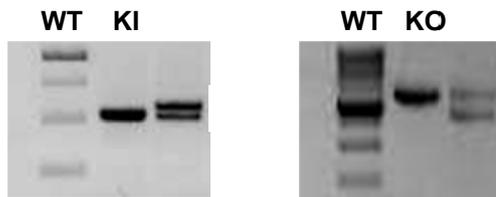


Figura 34. Gel de agarosa 1% mostrando el genotipado de los ratones KI y KO.

Para mejorar la visualización del EPR en los estudios morfológicos se utilizaron ratones albinos *Prpf31*^{A216P/+} KI en la cepa CD1 los cuales fueron generados en nuestro laboratorio. Para obtener ratones albinos con la mutación cruzamos un C57BL/6 *Prpf31*^{A216P/+} KI con un albino CD1 WT. De la camada se obtuvieron ratones grises, algunos de ellos portando la mutación. Estos ratones grises KI se cruzan entre ellos para obtener ratones negros, blancos y grises. Algunos de los blancos presentan la mutación *Prpf31*^{A216P/+} y son los que se utilizaron en este estudio.

3.1.3 FUNDUSCOPIA

Las retinas de los ratones fueron exploradas exploradas *in vivo* mediante el microscopio MICRON III para la valoración del fundus en pequeños roedores (Phoenix research Laboratories, Inc.). Se obtuvieron imágenes de los modelos WT y *Prpf31*^{A216P/+KI} de 2, 4, 6 y 8 meses de edad. Los animales fueron anestesiados mediante inyección subcutánea de solución de clorhidrato de ketamina/xilacina (80/12 mg/kg peso). Además, se utilizó anestesia tópica (tetracaina/oxybuprocaina 0,1/0,4 %) a los ojos de los ratones. Para la dilatación de la pupila se aplicó 1 gota de fenilefrina 10% y otra de tropicamida 1%. Inmediatamente tras sedar a los animales se les aplicó una generosa cantidad de metilcelulosa 1% sobre la córnea para prevenir la desecación de la superficie ocular.

Tras comprobar la correcta dilatación pupilar, se procedió a contactar la lente de la cámara del microscopio con la córnea del ratón, manteniendo un correcto alineando con el centro de la pupila. Se tomaron imágenes de la retina central y periférica. Para detectar la señal de autofluorescencia del EPR se utilizó un filtro excitador de onda corta (banda de transmisión Tavg > 90% 451.5–486.5 nm) y un filtro de emisión de paso largo (banda de transmisión Tavg > 93% 504.7–900 nm).

3.1.4 TEST OPTOMOTOR

Este test evalúa la funcionalidad del reflejo optoquinético (OKR) en el mamífero. Éste reflejo se origina en la retina, desde donde se envía la información visual. Las células ganglionares proyectan la información al núcleo del tracto óptico¹³¹ y las neuronas de este núcleo, que responden a estímulos visuales móviles, la proyectan al núcleo vestibular medial. La señal se transforma, vía subcortical, en una respuesta motora¹³². Si asumimos que las funciones cerebrales son normales el test optomotor es un buen

indicador de la función visual. A nivel más práctico podemos decir que el reflejo optomotor evalúa la visión espacial, que es el resultado de la combinación de 2 medidas: la agudeza visual y la sensibilidad al contraste.

Además, el test optomotor ha probado ser una herramienta fiable y reproducible para medir la percepción visual en el ratón en condiciones fotópicas y escotópicas^{133,134}. Comparado con otros test para medir la visión espacial en el ratón, como los comportamentales basados en sistemas de recompensa o el test en piscina, el test optomotor cuenta con la ventaja de que al ser un reflejo no necesitamos entrenamiento previo del animal¹³⁴.

Para valorar la visión espacial a través del test optomotor se siguió el procedimiento descrito por Prunsky y col¹³⁵. El equipo para realizar el test fue el OptoMotry (Cerebral Mechanics, Lethbride, Canadá). Este equipo consta de un espacio cúbico cerrado por cuatro monitores laterales dónde se proyectaba un cilindro virtual tridimensional consistente en una onda sinusoidal de bandas verticales blancas y grises que se movían en sentido horario o antihorario (Fig. 35 A).

Para la valoración de la visión espacial (agudeza visual y sensibilidad al contraste) se utilizaron 6 diferentes frecuencias espaciales de 0.272, 0.194, 0.103, 0.092, 0.062, 0.031 ciclos/grado (c/d) y a 3 diferentes grados de sensibilidad al contraste (100%, 75% y 50%). Así mismo se realizaron medidas de los umbrales de visión al 100, 75 y 50% de sensibilidad al contraste en ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+} de 2, 4, 6 y 8 meses de edad. En cada test el sentido de rotación del cilindro virtual así como las frecuencias espaciales de las barras se presentaban en forma aleatoria al animal evaluado. Mientras que la sensibilidad al contraste se mantenía constante y solo se variaba en cada nuevo test. Esto quiere decir que cada animal fue evaluado tres veces, una vez para cada nivel de contraste. Todos los test se

realizaron durante las horas de luz del ciclo del ratón (10:00-13:00).

Los ratones se colocaron de uno en uno en la plataforma central circular de 5,3 cm de diámetro. A continuación se cerraba la caja y se dejaba al ratón moverse libremente unos 5 minutos para que se adaptara a la plataforma. Si durante el test el animal saltaba o se caía de la plataforma, simplemente se volvía a colocar sobre la misma y se continuaba el test.

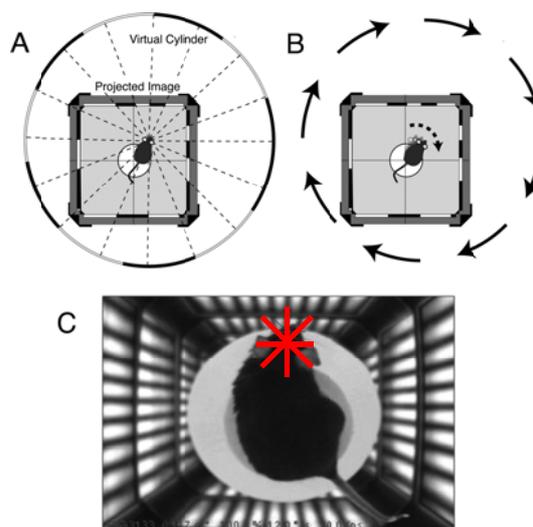


Figura 35. Test optomotor.

Los movimientos de cada animal se visualizaban a través de una cámara de video acoplada al software del equipo (Fig. 35 B). Sobre la imagen de video y utilizando el software del equipo se fijaba un cursor en forma de estrella (Fig. 35 C) sobre la cabeza del animal. Este cursor permitía visualizar los movimientos de la cabeza del animal y también servía para fijar el centro del cilindro virtual a una distancia constante de la posición de visión del animal. Cuando las bandas del cilindro virtual eran visibles para el ratón, éste normalmente fijaba la vista en los monitores y desplazaba la cabeza en el sentido de la rotación de las bandas con un movimiento lento y continuo (Fig. 44 B). El movimiento de seguimiento producido por el estímulo de las barras era considerado positivo cuando la cabeza del ratón

cruzaba una de las líneas del cursor en forma de estrella. Para incrementar la sensibilidad del test dos observadores independientes registraban los movimientos del ratón, uno de ellos desconocía el genotipo del ratón.

Además, previo al estudio con los ratones *Prpf31^{A216P/+}* KI y para descartar si la realización de varios test en el mismo animal influía en la cantidad de respuestas positivas, un grupo de 3 animales WT fueron valorados en dos ocasiones distintas, con un mes de diferencia entre ambas, sin observarse diferencias significativas en el número de respuestas positivas en ambas observaciones.

4.1.5 ELECTORRETINOGRAMA

El electrorretinograma (ERG) mide el potencial eléctrico generado por la retina como respuesta a un destello de luz. Constituye una excelente herramienta para

el estudio de la función de la retina, además puede registrarse de forma no invasiva en la superficie corneal en condiciones fisiológicas. La respuesta del ERG a un destello de luz es la suma de la respuesta de todas las células de la retina, que consiste en potenciales con componentes negativos y positivos que se solapan y que se originan en diferentes fases del procesamiento de la retina.

El ERG se genera por corrientes radiales que se originan en las neuronas de la retina o como consecuencia del efecto en las células de la glía de la retina que tienen los cambios en la concentración extracelular de potasio. Un factor importante que afecta a la contribución al ERG de una determinada célula es su orientación en la retina. Las neuronas orientadas radialmente (fotorreceptores y células bipolares) y las células de la glía (células de Müller y células del EPR) aportan mucho más al ERG que las células orientadas irregular o lateralmente. Otros factores importantes son las características

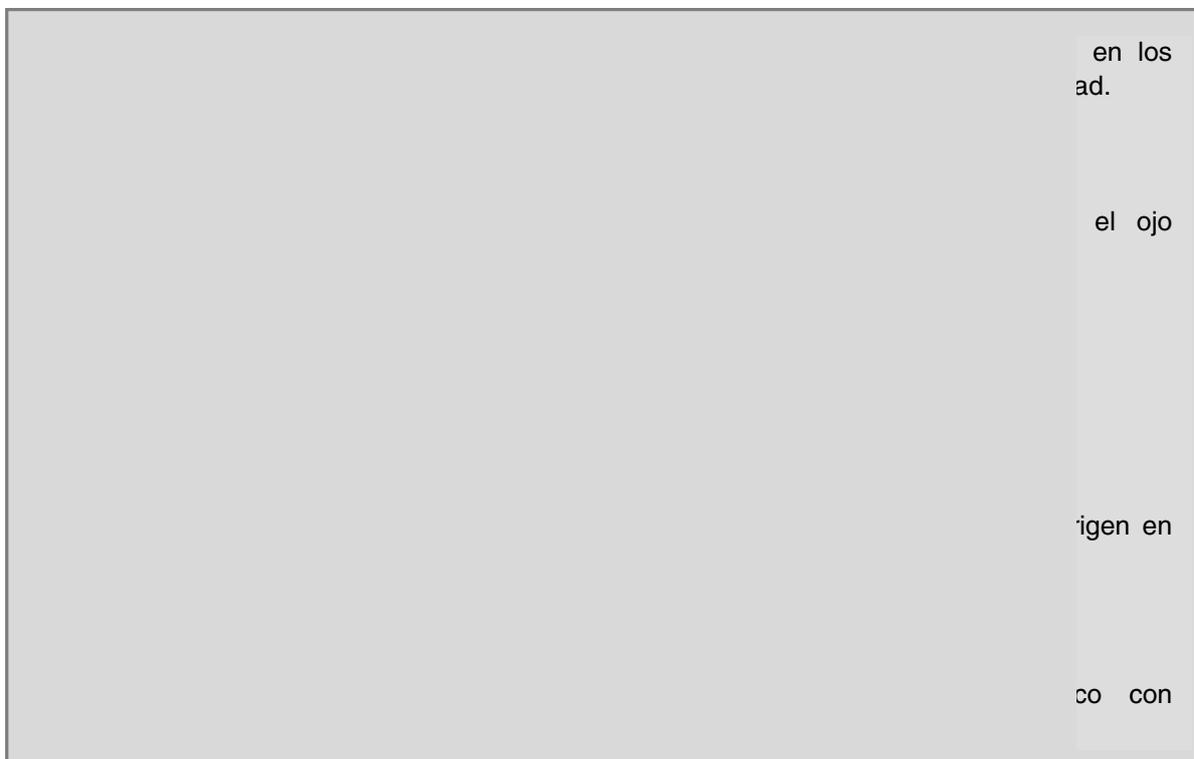


Figura 36. Pruebas de ERG que recomienda la ISCEV

del estímulo (energía, longitud de onda, iluminación de fondo, etc.) y la localización de los electrodos¹³⁶.

Las pruebas de ERG que recomienda la ISCEV (International Society for the Clinical Electrophysiology of Vision) se pueden ver en la figura 36.

INTERPRETACIÓN DEL ERG:

Para que el ERG sea una herramienta eficaz es necesario conocer la aportación de las diferentes células de la retina.

1. Onda a

Se asocia principalmente con los fotorreceptores (Fig. 37) y se origina en los segmentos internos. Adaptada a la oscuridad, esta onda negativa inicial se produce como respuesta a un estímulo intenso que depende de los bastones, es decir, escotópica. Cuando el fondo satura los bastones, la onda a depende de los conos, es decir, fotópica.

En oscuridad, los canales de los cationes de sodio, calcio y magnesio del OS del fotorreceptor están abiertos, lo que supone un punto de salida de corriente al espacio extracelular, el potasio sale fuera del IS, creándose un dipolo de corriente. Este dipolo produce un potencial corneal (y vítreo) que es positivo con respecto al lado escleral de la retina. La supresión de la corriente de oscuridad disminuye el potencial córnea-positivo, creando la onda a negativa.

En la adaptación, tanto a la luz como a la oscuridad, la onda a está truncada por la elevación de la onda positiva b

2. Onda b

La onda b, positiva, es el componente de mayor tamaño del ERG con destello difuso y tiene origen postreceptor. Nace en la retina interna, concretamente en células bipolares despolarizantes (Fig. 37). Existen también estudios experimentales sobre la

contribución de las células de Müller a la onda b, que parece ser menor de lo que se pensaba inicialmente. En el ratón adaptado a la oscuridad y con baja intensidad del destello la onda b mide la actividad sola de los bastones y en animales adaptados a la luz mide los conos.

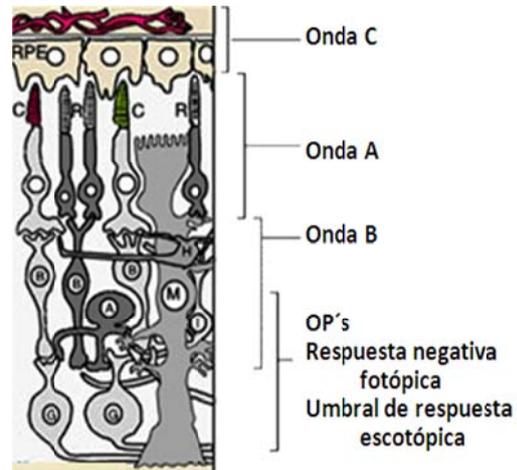


Figura 37. Origen de las ondas del ERG

3. Onda c

La onda c positiva corneal que sigue a la onda b es la suma de los voltajes de dos subcomponentes principales: 1) un voltaje negativo corneal generado por la retina neural, y 2) un voltaje positivo corneal de latencia y curso temporal similares, generado por el EPR (Fig. 37). La onda c es positiva en la córnea cuando el componente del EPR es mayor que el componente de la retina neural. Si los componentes son de la misma amplitud, la onda c estará ausente.

La onda c es la respuesta a la disminución de la concentración de potasio (K^+) en el espacio subretiniano provocada por la luz. Existen unos canales llamados K_{ir} (rectificadores de la entrada de potasio) que regulan la concentración de potasio en el sistema nervioso central y también en la retina. Los canales K_{ir} están presentes en la membrana apical de las células del EPR y se caracterizan por rectificar la entrada de K^+ , es decir, permiten un mayor flujo

hacia el interior celular que hacia el exterior. Esto se traduce en un control de la homeostasis de K^+ en el espacio subretiniano. Como ya se ha descrito previamente, el EPR mantiene a los fotorreceptores regulando el transporte de fluidos, iones y metabolitos, por ellos, estos canales juegan un papel fundamental en la interacción EPR-fotorreceptor. Durante oscuridad se produce una disminución de la concentración de K^+ en el espacio subretiniano, lo que hiperpolariza las células del EPR y hace que aumente la conductancia en estos canales y se produce un eflujo de $K^{+137-139}$.

En la figura 38 puede observarse el registro simultáneo del ERG de la retina de la rana y el "potasio-retinograma" (KRG) medido con microelectrodos sensibles a potasio. En la gráfica la respuesta KRG está invertida, por lo que en esta figura una depleción positiva significa una reducción en la concentración de potasio iónico extracelular. Se puede apreciar la relación entre el KRG y la onda c del ERG.

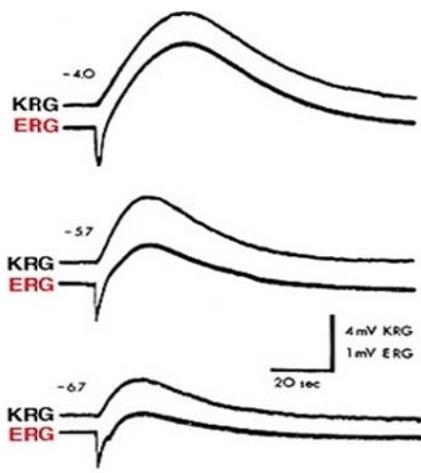


Figura 38. Relación entre onda c y KRG.

4. Potenciales oscilatorios (OP's)

Los OP's son una serie de ondas oscilatorias de alta frecuencia y baja amplitud que aparecen superpuestas al principio de la onda b tras un estímulo brillante. Estos potenciales son claramente postfotorreceptor (Fig. 37) y van a tener su

origen en retina interna, incluidas las células amacrinas¹⁴⁰.

Se registró la respuesta del ERG de campo completo con una cúpula de Ganzfeld (Dyagnosis LCC, Lowell, MA, E.E.U.U.). Para evaluar la respuesta en condiciones escotópicas (visión en niveles muy bajos de iluminación), los ratones fueron adaptados a la oscuridad durante toda la noche. La anestesia y dilatación pupilar de los animales se realizó como se ha descrito previamente para la valoración del fundus. Un electrodo circular de alambre de oro (electrodo activo) se colocó en la superficie corneal, previamente tratada con metilcelulosa al 1%. Dos electrodos (agujas de acero inoxidable) se colocaron uno en la frente (electrodo de referencia) y otro en la cola (electrodo de tierra). El filtro de paso bajo se ajustó a la frecuencia de 0.312 y el de paso alto a 300 Hz. Un único flash (6500 K) se utilizó como estímulo, dividido en 6 etapas de intensidad progresiva a 0.01, 0.05, 0.2, 1, 3 y 10 candela (cd) s/m^2 . Se registraron 15 respuestas en cada etapa, con un intervalo de 15 segundos entre cada estímulo.

Para evaluar la respuesta fotópica (visión en niveles iluminación diurnos), los ratones fueron adaptados a la luz durante 10 minutos con una iluminación de fondo de 30 cd/m^2 . La intensidad del estímulo fue de 3, 5, 10, 15, y 20 $cd s/m^2$. Fueron evaluadas tanto la amplitud y como la frecuencia de las ondas a y b en cada una de las condiciones. Para determinar la amplitud y frecuencia de los potenciales oscilatorios (OPs), el filtro de paso bajo se ajustó a 75 Hz para filtrar los componentes de la onda a y b. La duración del estímulo fue de 4 ms en condiciones escotópicas y el registro se realizó durante 55 ms.

Para determinar la amplitud y frecuencia de la onda c se ajustaron los filtros de pase bajo y alto a 0,1 Hz y 30 Hz, respectivamente. El estímulo utilizado fue un solo pulso de luz verde de 64 cd/m^2 durante 200 ms y el registro se realizó durante 4000 ms.

3.1.6 TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA

Esta prueba se basa en interferometría de baja coherencia y ofrece imágenes del espesor del material a estudio, en este caso de la retina. El funcionamiento es análogo al de la ecografía, mide la latencia y la intensidad de la onda que se refleja tras incidir sobre el tejido, con la diferencia de que la ecografía emplea ultrasonidos y la OCT radiación luminosa.

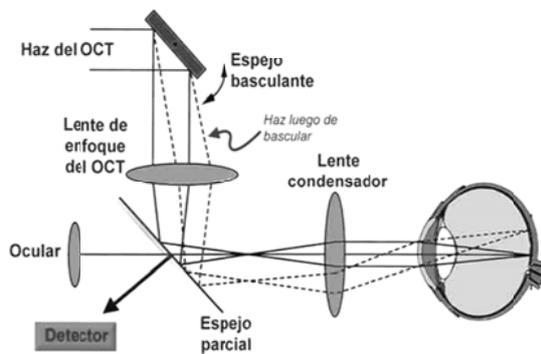


Figura 39. Sistema óptico del OCT

Existen dispositivos que basan su tecnología en el dominio temporal, en el que un espejo de referencia en el interferómetro se mueve para coincidir con el retraso que sufre la señal de la muestra en las diferentes capas de la retina (Fig. 39). La velocidad de la obtención de las imágenes está limitada por la velocidad de oscilación de dicho espejo.

Para salvar este inconveniente surge la OCT de dominio espectral, en el que el espejo se mantiene fijo, permitiendo la ausencia de elementos mecánicos y un gran aumento en la velocidad de adquisición¹⁴¹.

La representación de los diferentes tejidos se realiza mediante una escala cromática de modo que las regiones tisulares que producen mayor dispersión o reflexión de la luz son aquellas que se disponen en capas perpendiculares al haz de luz (membrana limitante interna, capa de fibras nerviosas, etc.) o que está compuesta por uniones intercelulares (unión de segmentos internos y externos de los fotorreceptores, membrana limitante externa, etc.). Estos tejidos se representan en blancos y rojos. Por otro lado, los tejidos compuestos por elementos que se sitúan paralelos al haz de luz presentan menor dispersión o reflexión de luz, y se representan en color azul o negro¹⁴¹ (Fig. 40).

De las imágenes obtenidas pueden realizarse dos tipos de análisis:

1. Análisis cuantitativo: Permite describir e identificar cambios morfológicos y anomalías estructurales de la retina. Generalmente el software de cualquier OCT es capaz de identificar las diferentes capas de la retina, por lo que se puede medir la distancia entre ellas, proporcionándonos así el espesor retiniano.

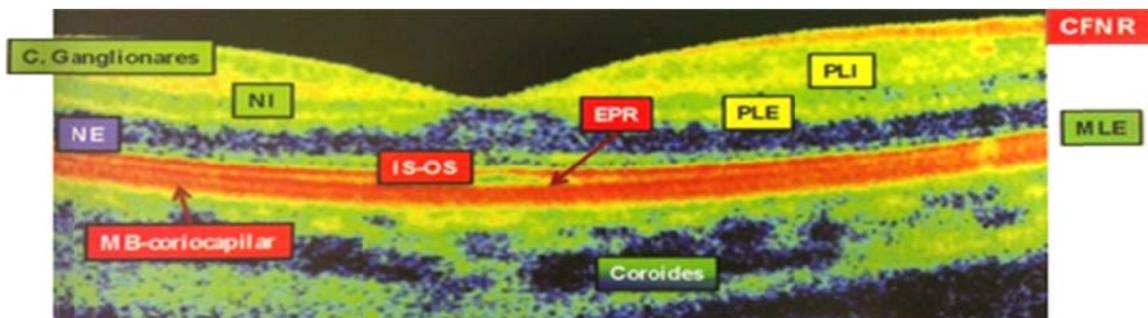


Figura 40. Representación de las capas de la retina en la OCT. NI: nuclear interna, NE: nuclear externa, EPR: epitelio pigmentario, IS-OS: unión de segmento interno y externo de los fotorreceptores, PLE: plexiforme externa, PLI: plexiforme interna, MB: membrana de Bruch, CFNR: capa de fibras nerviosas de la retina, MLE: membrana limitante externa.

2. Análisis cualitativo: estos protocolos constituyen un recurso importante para mejorar la calidad de las imágenes retinianas obtenidas durante la prueba y facilitar su interpretación. Aplican algoritmos matemáticos que ayudan a analizar visualmente la imagen tomográfica, cambiando su aspecto pero sin cambiar los datos tomográficos sin procesar. Se facilita así la identificación de los cambios en la refringencia de alguna de las capas.

Bajo midriasis farmacológica y sedación se tomaron escáneres retinianos de los ratones con el tomógrafo de dominio temporal Stratus (Carl Zeiss, Germany). El protocolo de adquisición fue realizar una serie de 6 barridos lineales y equidistantes entre sí a través de un eje central común. Los cortes se ajustaron para explorar los 3 mm de la retina central y el enfoque en +12 dioptrías.

El protocolo de análisis cuantitativo incluyó el grosor de la retina entre el inicio de la zona de EPR y coroides (EPR/C) y la membrana limitante interna. La cuantificación del grosor de la retina se realizó a partir de los valores obtenidos del mapa circular de espesor retiniano. Además se realizó en análisis cualitativo de hiperrefringencia del EPR/C.

3.1.7 HISTOLOGÍA

Evaluamos los cambios morfológicos de la retina mediante tinciones especiales para lipofuscina y colesterol libre y técnicas de inmunofluorescencia (IF).

La IF es una técnica de inmuno-marcación que consiste en demostrar la presencia de una determinada molécula (antígeno) a través de anticuerpos unidos a alguna sustancia fluorescente. De este modo se consiguen identificar moléculas específicas en una célula. Existen diversas variantes de esta técnica. En la inmunofluorescencia directa (IFD) un anticuerpo unido a un fluoróforo se une al antígeno. En cambio,

la inmuno-fluorescencia indirecta (IFI) hace uso de dos anticuerpos, el primero reconoce al antígeno y el secundario, que es el que va marcado con un fluoróforo, reconoce al anticuerpo primario (Fig. 41).

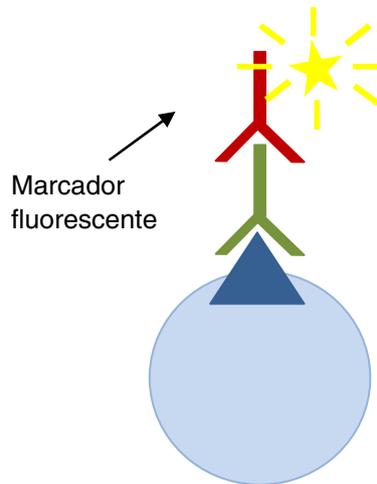


Figura 41. Inmunofluorescencia. Marcaje en IFI.

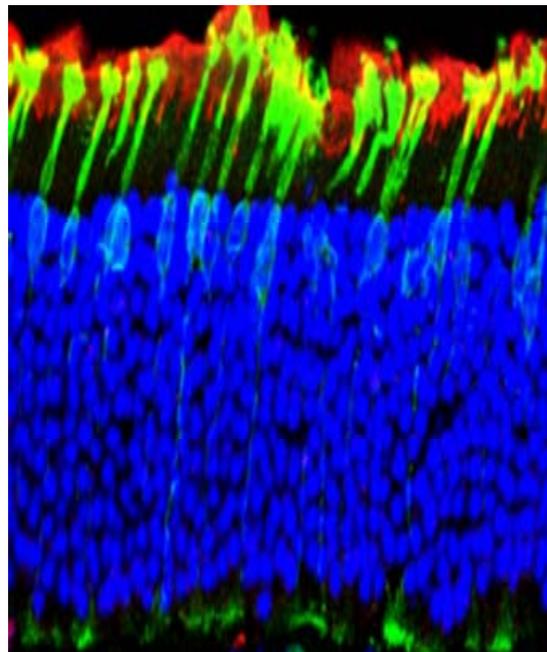


Figura 42. Inmunofluorescencia. Corte de retina.

Las partículas fluorescentes absorben la luz a una determinada longitud de onda y la emiten a otra. Pueden ser visualizadas en microscopio de fluorescencia o

microscopio confocal gracias a filtros específicos que solo dejen pasar la luz a una determinada longitud de onda sobre un fondo negro¹³⁰. Algunos de los marcadores fluorescentes más comúnmente usados son:

- DAPI (marcador ultravioleta específico para ADN) (Fig 42.)
- Opsina (verde para conos) (Fig 42.)
- Rodamina (rojo) (Fig 42.)
- Fluoresceína (naranja)
- Ficoeritrina (rojo)

Para realizar los estudios histológicos se utilizaron ratones adultos de 2 y hasta 8 meses de edad. Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical, después se procedía a realizar la enucleación de los ojos completos, que fueron rápidamente fijados en 4% paraformaldehído-PBS (tampón fosfato salino) durante toda la noche a 4°C. Los tejidos fijados fueron criopreservados con 20 y 30% de sacarosa-PBS (Anexo II). Con un criostato se realizaron cortes seriados de 18 µm de espesor. Las muestras se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) para observar la morfología de las capas de la retina.

Para detectar lipofuscina se utilizó la tinción de carbolfuscina de Kinyoun y ácido pícrico del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de EE.UU (AFIP). Además, la autofluorescencia del EPR fue observada a través de un microscopio confocal (Leica CS SP5) y la excitación fue realizada con un láser de ion de argón de 64 mW entre 457 y 488 nm y barrera entre 615-715 nm. Para evaluar la presencia de colesterol libre depositado entre la membrana de Bruch y el EPR se utilizó la tinción de filipina. Esta tinción usa un antibiótico poliénico natural fluorescente que se une al colesterol libre, pero no a los esteroides esterificados. La fluorescencia de la tinción de filipina se observa con luz UV con una excitación alrededor de 360 nm y de emisión de alrededor de 480 nm.

La distribución y expresión de diferentes proteínas a nivel del EPR y de los fotorreceptores fue observada a través de IF utilizando diferentes anticuerpos primarios tales como: anti-laminina, anti-RPE65, anti-Kir7.1, anti-C3, anti-opsina, anti-rodopsina (anexo II). Para determinar la expresión de la proteína PRPF31 se realizó inmunohistoquímica con anticuerpos anti-PRPF31 y anti-rodopsina como control positivo.

3.1.8 WESTERN BLOT

El western blot (WB) es una técnica utilizada para identificar, con anticuerpos específicos, proteínas que han sido aisladas en función de su tamaño mediante electroforesis en gel.

Las proteínas habitualmente tienen una carga neta, positiva o negativa, dependiendo de los aminoácidos que contengan. Cuando se aplica un campo eléctrico a una solución que contenga moléculas proteicas, éstas van a migrar en función de su tamaño y su carga. Ésta técnica se conoce como electroforesis (Fig.43) y actualmente se realiza en geles de poliacrilamida.

Para realizarlo, las proteínas se encuentran solubilizadas en un detergente (sodio-dodecil-sulfato (SDS)) que tiene una fuerte carga negativa y mediante su unión a las regiones hidrofóbicas de la moléculas proteicas hace que dichas proteínas rompan sus estructuras secundarias y terciarias quedando como cadenas polipeptídicas desnaturalizadas.

Posteriormente son transferidas a una membrana absorbente (generalmente de nitrocelulosa o de PVDF) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella. La membrana se coloca junto al gel, se cubre con un material absorbente y se sumerge en un tampón.

De nuevo mediante un campo eléctrico conseguimos que las proteínas migren y pasen a la membrana donde quedan fijadas. A continuación se bloquean los lugares de unión que han quedado libres tras la transferencia a la membrana para prevenir que material no específico de los anticuerpos primario y secundario se fijen a la membrana.

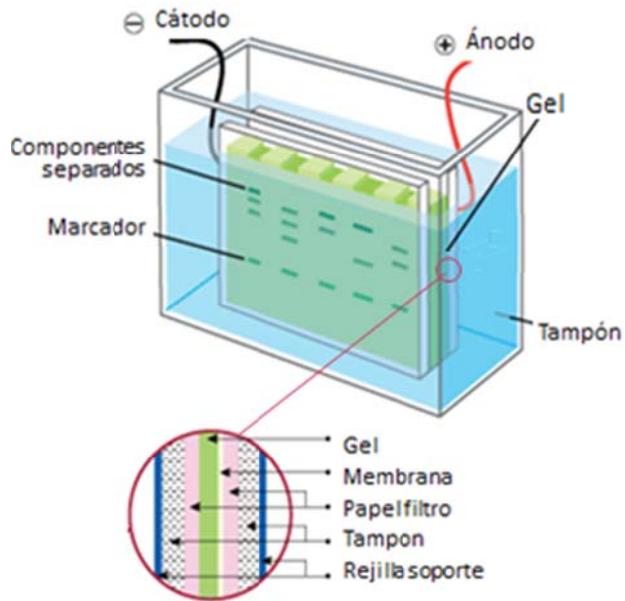


Figura 43. Western Blot. Gel sometido a campo eléctrico. Transferencia húmeda.

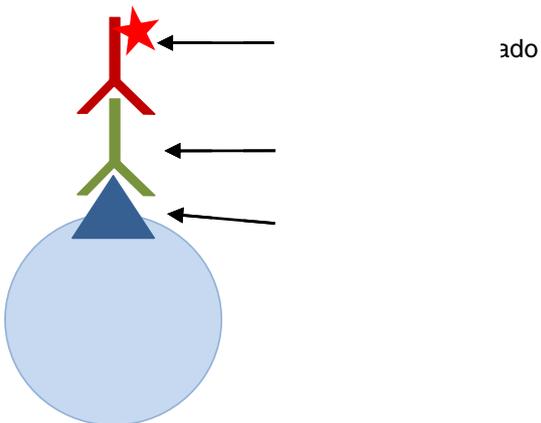


Figura 44. Marcaje con anticuerpos.

Finalmente, se incubaba la membrana con un anticuerpo primario (contra la proteína

buscada) y posteriormente con un anticuerpo secundario (contra el anticuerpo primario, marcado con una enzima que permite su detección) (Fig. 44). Podemos visualizar el resultado a través de imagen digital o con películas fotográficas¹³⁰.

Para la extracción de los extractos de proteína se sacrificaron ratones adultos C57BL/6, tanto WT como *Prpf31*^{A216P/+} KI, mediante dislocación cervical. Los ojos fueron rápidamente extraídos. Se eliminaron el cristalino, el vítreo, la córnea y el iris. Mediante cuidadosa disección mecánica se procedió a la separación de la neurorretina del EPR, que quedó adherido a la coroides y que se utilizó por separado para obtener los extractos del EPR. Las muestras fueron rápidamente congeladas en nitrógeno líquido a -80°C hasta su uso.

La extracción de proteínas se realizó mediante buffer RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Los extractos proteicos fueron separados por electroforesis en geles de gradiente de acrilamida (4 al 20%). Luego se realizó la transferencia semi-húmeda a membranas de PVDF y las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primario y secundario. El revelado se realizó por quimioluminiscencia y el resultado se registró sobre una película fotográfica (anexo III). La distribución y expresión de la proteína PRPF31 fue determinada mediante WB en ratones C57 WT y en muestras de retinas de un donante humano. Para determinar la expresión del transgen se utilizaron anticuerpos anti-PRPF31, anti-FLAG y anti-GFP.

3.1.9 EXPOSICIÓN A UNA FUENTE DE LUZ INTENSA Y ELECTROPORACIÓN

Al buscar una técnica que mejorase la eficiencia de la terapia génica ensayamos con la electroporación para transfectar las células del EPR. Curiosamente, observamos que los animales sometidos a esta técnica sufrían una exacerbación del fenotipo, caracterizado principalmente por

el aumento de la autofluorescencia del EPR. La electroporación surge como una modalidad para permeabilizar membrana celular y mejorar la llegada de medicamentos o xenobioticos al espacio intracelular. Sin embargo se ha observado que los efectos de la exposición de cultivos celulares a un campo eléctrico no se limitan a la electroporación, sino también a la formación de radicales libres de oxígeno (ROS), que pueden derivar en daño celular¹⁴².

La exposición a una fuente de luz intensa ha sido utilizada para acelerar la aparición de determinados fenotipos de degeneración de la retina en diferentes ratones mutantes. Sin embargo, el uso de la electroporación no ha sido descrito como técnica para exacerbar la aparición de un determinado fenotipo. Por ello, decidimos realizar la electroporación en ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+} KI no inyectados, para determinar si el fenotipo de nuestro modelo mutante era exacerbado por esta técnica.

Ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+} KI fueron anestesiados siguiendo el mismo protocolo que se ha descrito para hacer la funduscopy. Se colocó siempre el polo positivo del electrodo humedecido en PBS sobre el ojo derecho (Platinum Tweezertrode, 3mm (BTX Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, EE.UU). Cada animal fue expuestos a 5 pulsos de 50 ms a 87 Voltios con el electroporador Electro Square Porator™ (BTX Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, EE.UU). A continuación se realizó exploración del fondo de ojo y estudios histológicos de la retina.

Como hemos mencionado anteriormente, en diferentes estudios se ha observado que la exposición a una fuente de luz intensa deriva en la muerte de fotorreceptores mediante la activación de factores de apoptosis y liberación de ROS. Remé y cols.¹⁴³ observaron que el umbral para inducir apoptosis mediante la luz depende de los niveles de rodopsina, mientras que la tasa de regeneración

celular depende de los niveles de otra proteína, RPE65 en el EPR^{143,144}. Por otro lado, la luz induce la activación de la señal del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que a nivel del EPR conlleva una ruptura de la barrera hemato-retiniana. Esta hiper-permeabilidad a su vez conduce también a un aumento de la apoptosis de los fotorreceptores¹⁴⁵.

Los ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+} KI fueron colocados en una caja de plástico transparente de 24 x 14 x 38 cm (ancho x alto x largo) y fueron expuestos durante 5 días consecutivos a una fuente de luz intensa (2.500 lux) producida por 5 bombillas de 9 W. A continuación se realizó ERG estándar y registro de la onda c así como estudios histológicos.

3.2 EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD Y EFICACIA DE LA TERAPIA GÉNICA

Para investigar si la transferencia de la copia normal del gen humano *PRPF31* sería segura y efectiva para revertir el fenotipo de los ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI, realizamos un ensayo de terapia génica usando vectores virales (AAV2) o no virales (nanopartículas) constituidas por ésteres de sorbitán (Span 80) y poli-L-arginina (SP-PA) cedidas por el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela (USC). Los resultados obtenidos con la terapia génica utilizando las nanopartículas SP-PA como vector del gen *PRPF31* ya han sido presentados en una tesis de la USC, por tal motivo solo mencionaremos los resultados más relevantes de estos experimentos como anexos.

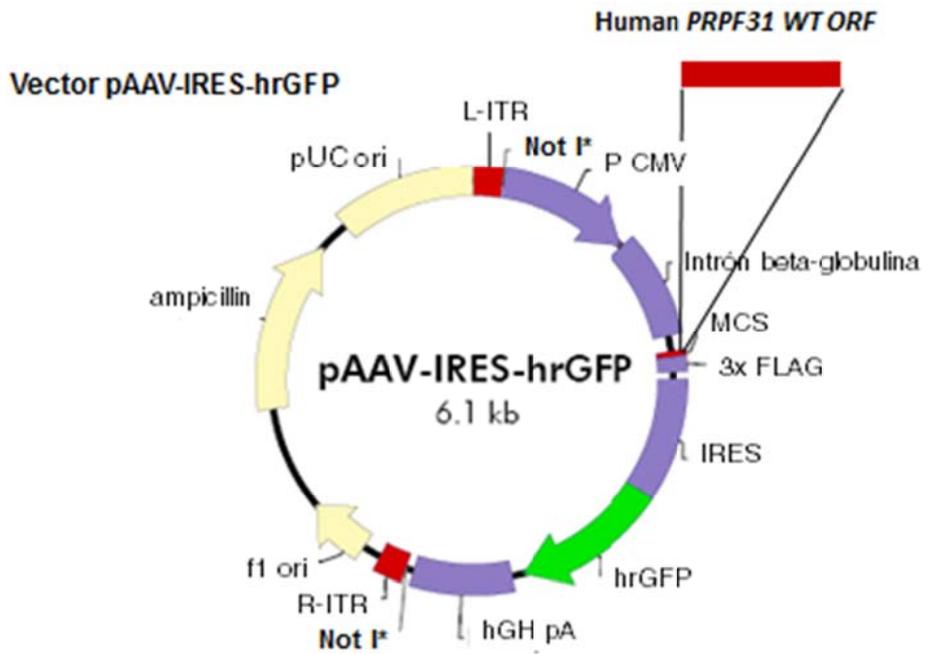
3.2.1 PRODUCCIÓN, CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS VECTORES VIRALES

La producción de los AAV2 se realizó bajo estrictas normas de bioseguridad nivel 2 siguiendo las recomendaciones del “National Institute of Health” de EE.UU. En este proyecto se utilizó el vector viral pAAV-IRES-hrGFP del kit AAV Helper-Free System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU) (AAV2-hrGFP) para la clonación del gen de interés *PRPF31* (AAV2-*PRPF31*) (Anexo IV). El vector pAAV-IRES-hrGFP (Fig. 45) contiene el promotor de citomegalovirus (CMV) y otros elementos para la expresión de genes a un alto nivel en células de mamífero. El vector también contiene ITR para la replicación y

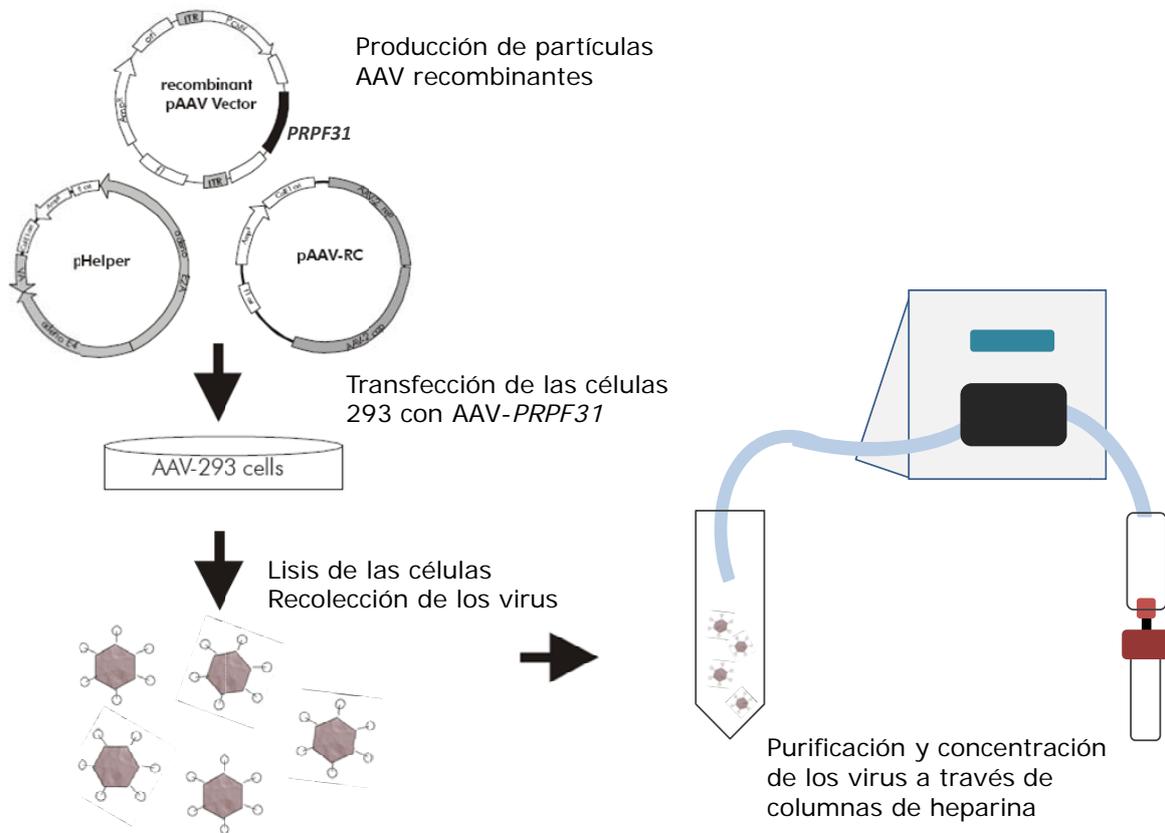
ensamble viral además de contener una casete de expresión dicistrónico para la expresión de la proteína verde fluorescente recombinante humanizada (hrGFP). La secuencia que codifica la proteína PRPF31 humana (ADNc) se obtuvo a partir de un plásmido preparado previamente en nuestro laboratorio (pEGFP-C1-*PRPF31*), y se clonó en el sitio de clonación múltiple del AAV2-hrGFP, utilizando los sitios de restricción BamHI y XhoI. Además, la secuencia del *PRPF31* por su C-terminal se fusionó a la secuencia de FLAGx3, por lo que la sobre-expresión inducida por la infección del virus pudo ser detectada con un anticuerpo anti-FLAG, manteniendo también la señal de hrGFP.

Para la producción del AAV (Fig. 46) se necesitó una transfección triple con la construcción AAV2-*PRPF31* junto con dos plásmidos auxiliares (RC y Helper) que reúnen todos los genes virales necesarios para el empaquetamiento de las partículas del virus. La línea celular necesaria para el embalaje viral es la AAV-293. Estas células se derivan de la HEK293 (células embrionarias de riñón humano) que han sido transformadas con ADN de adenovirus tipo 5 que expresan en forma estable el gen E1 en trans y permiten la producción de partículas virales cuando las células son co-transfectadas con los tres plásmidos del AAV Helper-Free System. Los protocolos de cultivo celular, así como también de transfección, producción de AAV2 y purificación a través de columnas de heparina se describen en detalle en el anexo V¹⁴⁶.

Para realizar la titulación de las partículas virales se transfectó la línea celular AAV-HT1080 (precursoras de fibroblastos) y la titulación se calculó midiendo la fluorescencia de hrGFP por citometría de flujo y también por titulación del DNA viral utilizando el kit proporcionado por Agilent Technologies (Anexo VI). Obtuvimos 10⁹ partículas virales/ml. Los viales fueron criopreservados.



VIRES-



3.2.2 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSFECCIÓN Y CITOTOXICIDAD DEL VECTOR AAV-2-PRPF31 EN CULTIVO CELULAR

Para determinar la capacidad de transfección se utilizó la línea celular HT1080 crecida sobre cubre-objetos en placas de 6 pocillos utilizando medio DMEM con 10% de FBS. Las células se incubaron por 24 h a 37°C y atmósfera húmeda con 5% CO₂. Las células se infectaron con las construcciones AAV2-GFP o AAV2-PRPF31 y después de 48 h las muestras se fijaron en paraformaldehído-PBS y se estimó el porcentaje de células GFP positivas sobre el total de núcleos teñidos con DAPI.

Para determinar la citotoxicidad de las construcciones, las células HT1080 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de $1,5 \times 10^5$ células/cm². Después de 24 h de incubación se procedió a infectar las células con 20 µL de una suspensión viral conteniendo la construcción control de AAV2-GFP 1×10^9 partículas virales (pv)/mL o AAV2-PRPF31 1×10^9 pv/mL, así como también un grupo control con PBS. Después de 48 h se llevó a cabo el protocolo detallado en el anexo VII para determinar la toxicidad celular. Se utilizó el kit ApoTox-Glo™ Triplex Assay, (Promega, G6321, Madison, WI, EE.UU). El kit Triplex ApoTox-Glo combina tres ensayos para evaluar la viabilidad, la citotoxicidad y la apoptosis en un mismo cultivo celular. En primer lugar, la viabilidad y la citotoxicidad se determinan mediante la medición de la actividad de dos proteasas. La viabilidad celular se mide a través de un sustrato fluorogénico que atraviesa la membrana celular (GF-AFC sustrato) y la citotoxicidad se mide a través de un sustrato que solo puede ser degradado por las proteasas que se vierten al medio de cultivo al romperse la membrana celular (sustrato bis-AAF-R110). La apoptosis se mide a través del DEVD-péptido luminógeno que es un sustrato para la caspasa-3/7.

3.2.3 INYECCIÓN SUBRETINIANA

En primer lugar se procedió a la sedación y anestesia de los animales así como a la dilatación pupilar. Para ello se siguió el mismo protocolo descrito previamente para la exploración de fondo de ojo. A continuación se procedió a inyectar diferentes grupos de animales con sólo el vector, el vector con EGFP o el portador del gen PRPF31. La técnica que seguimos para realizar la inyección subretiniana constó de los siguientes pasos (Fig. 47):

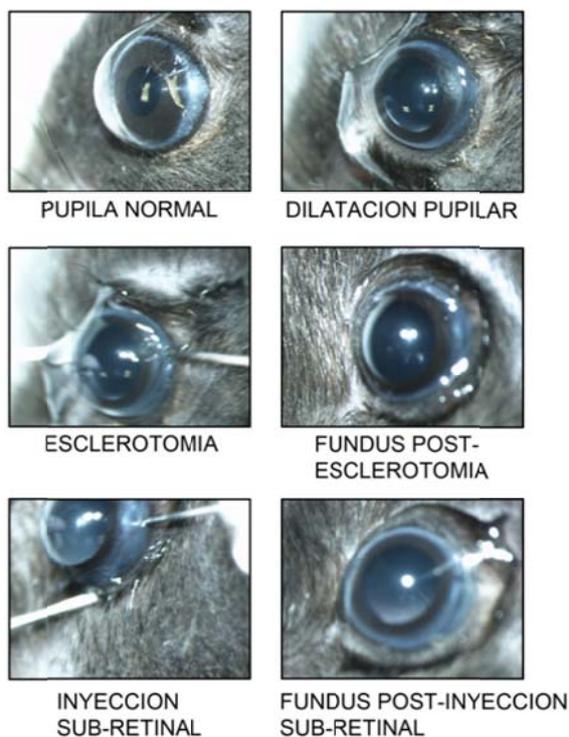


Figura 47. Fases de la inyección subretiniana.

En primer lugar se realiza una esclerotomía con aguja de 32G sobre la conjuntiva y esclera temporal, adyacente al limbo esclero-corneal. A continuación se fija el ojo mediante sujeción con pinzas de Castroviejo (con dientes oblicuos de 0,2 mm) y se introduce una aguja de 33G roma (Hamilton®) unida a una inyectadora de 10 µL, modelo 1701 RN SYR (Hamilton®) a través de la esclerotomía. La inyectadora se acopló previamente a una ultra-microbomba (World Precision Instruments, EE.UU). Al introducir la aguja, ésta se

orienta hacia el polo posterior del ojo, para no lesionar el cristalino, y cuando se alcanza el espacio subretiniano se procede a inyectar 1 μ l de la solución que correspondiese en cada caso a una velocidad de 0,05 μ l/seg. Por último, se aplica una gota de colirio antibiótico (0,3% ciprofloxacino) en cada ojo y los animales fueron mantenidos en una manta térmica a 37°C hasta que se recuperaron de la anestesia.

3.2.4 EVALUACIÓN DE LOS ANIMALES TRAS LA INYECCIÓN

Pasados 1, 2 y 4 meses tras realizar la inyección se realizó funduscopia, ERG, test optomotor y OCT de los animales inyectados para comprobar la seguridad y la eficacia de la terapia. Para realizar estos test se siguieron los mismos protocolos descritos previamente en los apartados 4.1.3 al 4.1.8 para la caracterización fenotípica de los animales.

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa IBM SPSS statistics 22. Los valores fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media (EEM). La diferencia estadística entre grupos se calculó a través *t*-test o análisis de la varianza (ANOVA) dependiendo del número de grupos a comparar. El test de Dunnett o el test de Tukey fueron utilizados para el análisis *post hoc*. Un valor de *p* menor que 0,05 fue tomado como diferencia estadísticamente significativa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 FENOTIPADO DE LOS RATONES MUTANTES K.I.

4.1.1 LOS RATONES *Prpf31*^{A216P/+} KI PRESENTAN UN FUNDUS SIMILAR AL DESCRITO EN OTROS MODELOS DE DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD (DMAE)

La evaluación del fundus en modelos murinos de degeneración retiniana, al igual que en el humano, es una herramienta muy útil, ya que aporta una gran cantidad de información visual directa necesaria para iniciar la caracterización fenotípica del ratón o para realizar el diagnóstico clínico en un paciente. Por tal motivo, realizamos la funduscopia *in vivo* a ratones *Prpf31*^{+/+} (WT) y ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI entre 2 y 18 meses de edad (Fig. 48). Para la realización de este estudio utilizamos un microscopio especialmente diseñado para realizar la valoración del fondo de ojo en pequeños roedores (MICRON III), siguiendo el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos.

En la figura 48 (imágenes A-D) se observa el aspecto normal de la retina de un ratón WT de 8 meses de edad. Se muestra claramente la homogeneidad en la superficie de la retina central (A) y periférica (B), así como también los contornos delimitados y tamaño normal de la papila (C), así como también el grosor normal de los vasos (C y D). En la misma figura 48 (imágenes E-H) se aprecian lesiones blanco-amarillentas pequeñas no confluentes dispersas por toda la retina de un ratón mutante *Prpf31*^{A216P/+} KI de 8 meses de edad. Las lesiones midieron una quinta parte del diámetro del disco óptico y algunas de ellas eran auto-fluorescentes

de aspecto similar a depósitos drusenoides (Fig.48 I-J; flechas).

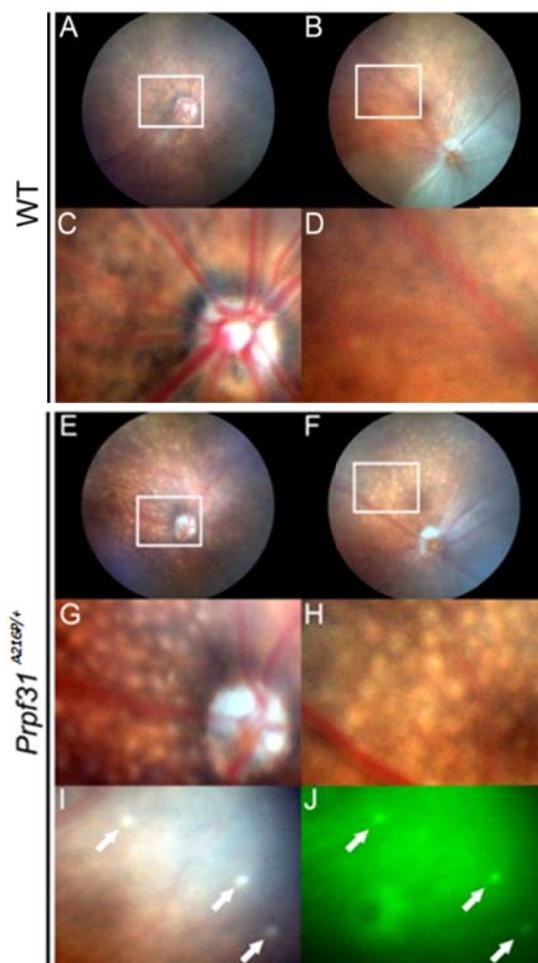


Figura 48. Funduscopia de un ratón WT (A-D) y un ratón *Prpf31*^{A216P/+} KI de 8 meses de edad (E-H). En el panel se muestran las imágenes amplificadas de una porción de la retina central (C y G) y periférica (D y H). También se muestra la auto-fluorescencia de los depósitos drusenoides en el ratón mutante (I-J; flechas).

Este fenotipo se observó en el 37,5% (6 casos de 16 ratones KI evaluados) Las lesiones se comienzan a observar a partir del sexto mes de edad, haciéndose más evidentes a los ocho meses y sin presentar nuevos cambios hasta el decimoctavo mes. No observamos en ningún ratón afecto por la mutación acúmulos de pigmento en forma de espículas óseas, afilamiento vascular o atrofia de la papila; los cuales son hallazgos típicos en la RP

descrita en humanos y en modelos experimentales de degeneración retiniana como el descrito en los ratones *Pde6b^{rd1}* (*rd1*), *Prph2^{rd2}* (*rd2*) o *Pde6b^{rd10}* (*rd10*)¹⁴⁷.

El aspecto del fundus en los ratones que mostraban este fenotipo nos recuerda más a la imagen retiniana de un *fundus albipunctatus* producido por mutaciones en el gen *RDH5* o a las lesiones blanco-amarillentas con depósitos drusenoides observadas en modelos animales de DMAE como en el ratón *Ccl2^{-/-}* o ratones transgénicos *Cfh Y402H*^{128,148,149}. No debemos olvidar que los ratones, como otros animales nocturnos, carecen de mácula y ello podría explicar el hecho de que las lesiones estén distribuidas por todo el fondo de ojo y no concentradas en una región específica de la retina.

Por otro lado, se ha descrito que la mutación en el gen *Crb1^{rd8}* (*rd8*) puede ser frecuentemente encontrada en los ratones WT de la cepa CD57BL/6, la cual es la cepa basal utilizada para producir nuestros ratones mutantes. La presencia espontánea de una delección simple en un nucleótido del gen *Crb1*, puede producir degeneración de la retina con lesiones retinianas similares a las observadas en nuestros ratones¹⁵⁰. Por tal motivo decidimos descartar la presencia de la mutación *rd8* mediante genotipado (anexo IA) en nuestros ratones mutantes (Fig. 49).

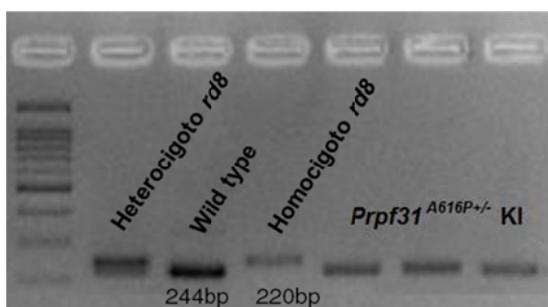


Figura 49. Resultados de la PCR que descarta la mutación *rd8* en los *Prpf31^{+/+}* KI.

Hasta ahora, no se había descrito ningún cambio en el aspecto de la retina en los

ratones *Prpf31^{A216P/+}* KI¹²⁶. Es posible que en el estudio previo de Bujakowska, et. al¹²⁶ no se observaran cambios en la retina porque se evaluaron un número pequeño de animales, escapando la observación de algún ratón con el fenotipo ya que, como hemos mencionado, este fenotipo está presente en aproximadamente el 40 % de los animales; o bien porque el fenotipo esperado de RP no fue observado, por lo que se pudo haber descartado o infravalorado la presencia de otro fenotipo distinto al esperado.

4.1.2 LA VISIÓN ESPACIAL EN LOS RATONES *Prpf31^{A216P/+}* KI ESTA MARCADAMENTE AFECTADA

La visión espacial se define como la capacidad de resolución o la capacidad para discriminar dos objetos o características separadas entre sí por un espacio determinado. La visión espacial de un individuo depende tanto de la agudeza visual como de la percepción del contraste. En pequeños roedores se puede valorar la visión espacial por diferentes técnicas. El test para valorar la respuesta optomotora o reflejo optocinético es uno de ellos, y este permite valorar tanto la agudeza visual como la sensibilidad al contraste.

Para valorar la respuesta optomotora utilizamos 5 ratones WT y 5 ratones *Prpf31^{A216P/+}* KI adultos de 8 meses de edad. La visión espacial se midió con 6 diferentes frecuencias espaciales (0,272, 0,194, 0,103, 0,092, 0,062 y 0,031 ciclos/grado) y a 3 diferentes grados de sensibilidad al contraste (100%, 75% y 50%). Así mismo se realizaron medidas de los umbrales de agudeza visual al 100% de sensibilidad al contraste en ratones de 2, 4 y 6 meses de edad.

Como se observa en la figura 50, la visión espacial se afecta significativamente en los ratones *Prpf31^{A216P/+}* KI, dado que el porcentaje de respuestas positivas en el test optomotor al 100% de contraste cae sobre todo en las frecuencias espaciales

más altas (Fig. 50 A). Además, la caída en el porcentaje de respuestas es más severa cuanto menor es la sensibilidad al contraste llegando incluso a observarse diferencias significativas entre los ratones WT y mutantes a frecuencias espaciales más bajas (Fig. 50 B-C).

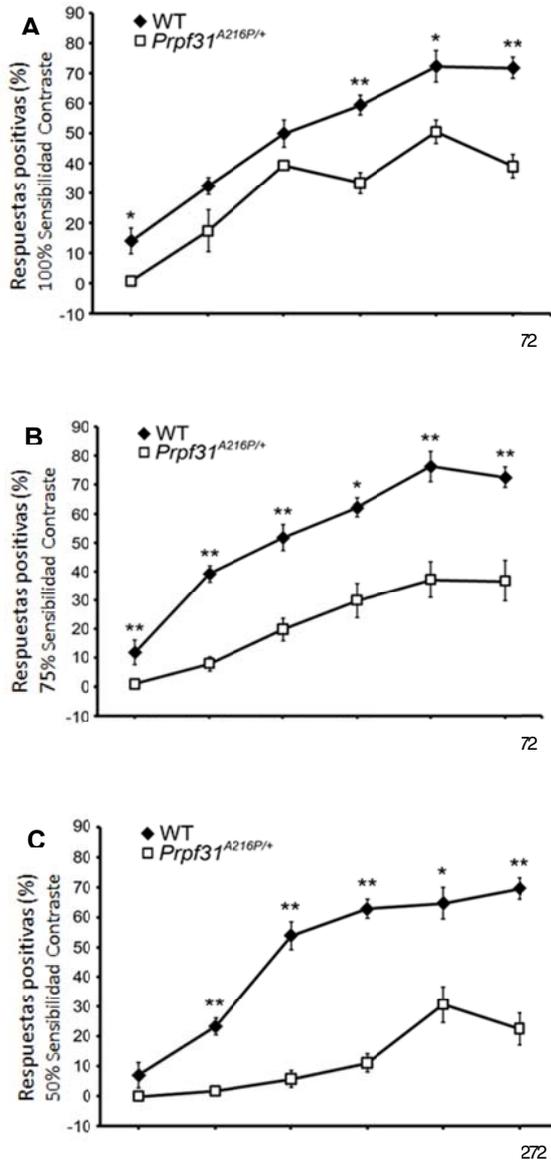


Figura 50. Porcentaje de respuestas positivas del test optomotor en ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+} KI de 8 meses a 100% (A), 75% (B) y 50% (C) sensibilidad al contraste. Los valores representan el promedio de 5 ratones en cada grupo \pm EEM. Estadística *t*-test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Para poder discriminar las barras presentadas a una alta frecuencia espacial

se necesita una mayor resolución del sistema óptico, es decir, una mejor agudeza visual^{151,152}. Por otro lado cuanto mayor contraste tiene una imagen más fácil es visualizarla. En los ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI se observó que tanto la agudeza visual como la percepción del contraste estaban alteradas, siendo este último parámetro el que más se afectó. En otras enfermedades de la retina, como la DMAE, también existe una disminución significativa de la sensibilidad al contraste^{153,154}. Curiosamente, estos hallazgos fueron independientes de la presencia o ausencia de los depósitos drusenoides en la retina de los ratones.

Los ratones *Prpf31*^{-/+} KO también fueron evaluados con el test optomotor y presentaron el mismo déficit en la visión espacial. Por otro lado, quisimos evaluar los umbrales de visión espacial en ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI y WT de 2, 4 y 6 meses de edad. Este experimento lo realizamos siempre al 100% de sensibilidad al contraste y fuimos aumentando la frecuencia espacial hasta que ya no obtuvimos ninguna respuesta positiva. Observamos que dicho umbral empieza a caer a los 6 meses de edad en los mutantes, lo que sugiere el carácter de degeneración progresiva en este modelo animal (Fig. 51).

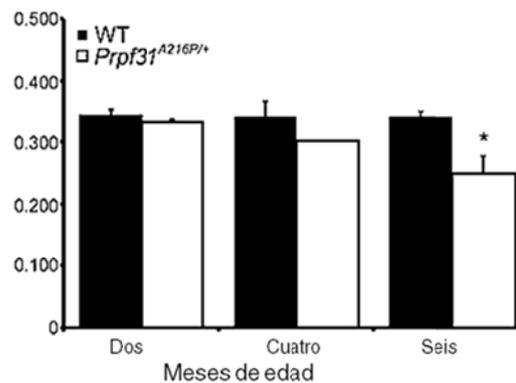


Figura 51. Umbrales de visión espacial en ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+} KI de 2, 4 y 6 meses al 100% de sensibilidad al contraste. Los valores representan el promedio de 5 ratones en cada grupo \pm EEM. Estadística *t*-test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.1.3 LA AMPLITUD DE LA ONDA C DEL ERG DISMINUYE SIGNIFICATIVAMENTE EN LOS RATONES *Prpf31*^{A216P/+} KI

El ERG es una herramienta muy útil para evaluar la respuesta eléctrica de la retina a estímulos visuales, permitiendo discriminar que tipo celular pudiera estar más afectado dependiendo de la amplitud y la frecuencia de ciertas ondas. Se registró la respuesta estándar (ondas a y b) así como la onda c mediante ERG de campo completo con una cúpula de Ganzfeld en 7 ratones WT y 7 ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI adultos tanto en la cepa basal CD57BL/6 como CD1. Para evaluar la respuesta en condiciones escotópicas, los ratones fueron adaptados a la oscuridad durante toda la noche. Para evaluar la respuesta fotópica, los ratones fueron adaptados a la luz durante 10 minutos.

En la figura 52 se observa el registro electroretinográfico de la onda c en ambos ojos (OD y OS) de un ratón *Prpf31*^{+/+} (WT) (Fig. 52 A) y en un ratón *Prpf31*^{A216P/+} KI (Fig. 52 B) de 8 meses de edad severamente afectado. Se observa claramente que la amplitud de la onda c disminuye en el ratón mutante en comparación con el ratón WT.

La cuantificación de los resultados de la amplitud de la onda c y de la onda b se muestran en la figura 53 A. Se observó que sólo la amplitud de la onda c disminuye en los ratones mutantes y que esta disminución es estadísticamente significativa al normalizarla con la amplitud de la onda b (razón amplitud onda c/b) (Fig. 53 B). Este hallazgo se observó en los ratones mutantes a partir de los seis meses de edad. Los ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI examinados a los dos y a los cuatro meses de edad no mostraron alteraciones electroretinográficas estadísticamente significativas. (Fig. 54).

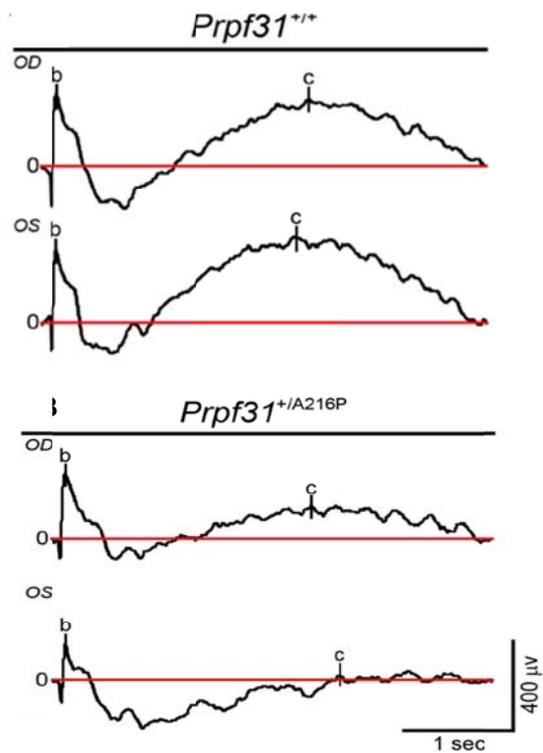


Figura 52. Registro ERG y amplitud de la onda c en un ratón WT (A) y de un ratón mutante *Prpf31*^{A216P/+} KI (B).

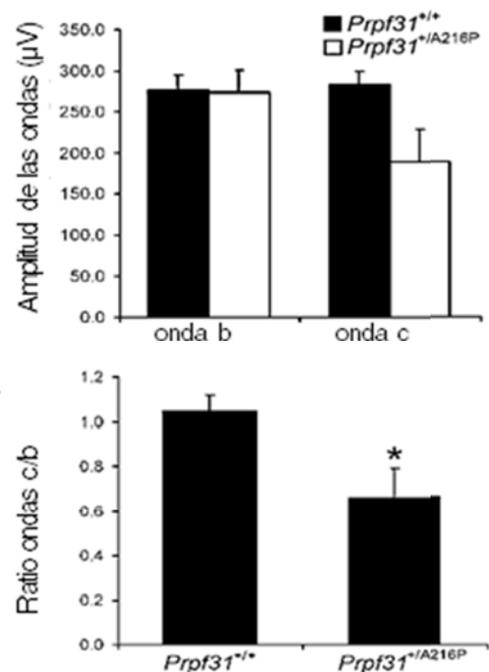


Figura 53. Cuantificación de la amplitud de las ondas b y c en el ERG de los ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+} KI (A). Y resultado del cálculo de la razón de la amplitud onda c/b (B). Los valores representan el promedio de 7 ratones en cada grupo ± EEM.

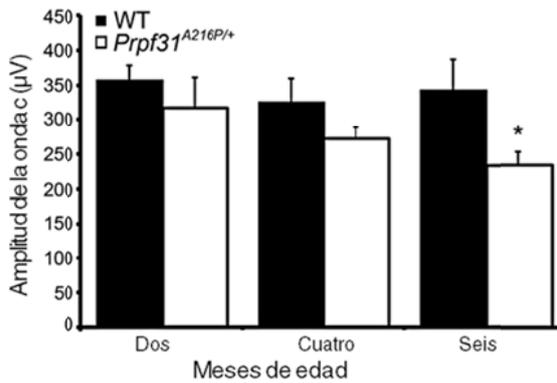


Figura 54. Cuantificación de la onda c del ERG de los ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+} KI de 2, 4 y 6 meses de edad. Los valores representan el promedio de 5 ratones en cada grupo \pm EEM. Estadística *t*-test. * $p < 0,05$.

El ERG para evaluar la respuesta de los bastones, conos-bastones y conos en los ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI no mostró diferencias significativas al compararlos con ratones WT (ver figura anexa 1). Hasta ahora no se habían descrito alteraciones significativas en el registro estándar del ERG en este modelo de ratón¹²⁶; sin embargo, hemos demostrado que la amplitud de la onda c sí está afectada a partir de los 6 meses de edad. Resultados similares a los nuestros han sido observados en el ratón *Ahr*^{-/-}, el cual es reconocido como un modelo experimental de DMAE^{155,156}. Estos ratones *Ahr*^{-/-} al igual que nuestro modelo *Prpf31*^{A216P/+} KI presentaron disminución de la amplitud de la onda c, con poca o ninguna afectación de la amplitud de las otras ondas, siendo atribuido este fenómeno principalmente a la degeneración del EPR^{155,156}.

La evaluación de la onda c es un estudio que no se realiza de forma rutinaria en la práctica clínica. Sin embargo, dado que la degeneración del EPR es una de las principales características de los pacientes con DMAE, el estudio de este parámetro debería ser considerado para valorar la progresión de la enfermedad en pacientes con DMAE.

4.1.4 LOS RATONES KI MUESTRAN DISMINUCIÓN DEL ESPESOR RETINIANO E HIPERREFLECTIVIDAD DEL EPR

Bajo midriasis farmacológica se tomaron escáneres retinianos de 6 ratones WT y 6 ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI con el tomógrafo Stratus (Carl Zeiss, Germany). El protocolo de adquisición consistió en realizar una serie de 6 barridos lineales de 3 mm cada uno y equidistantes entre sí a través de un eje central común.

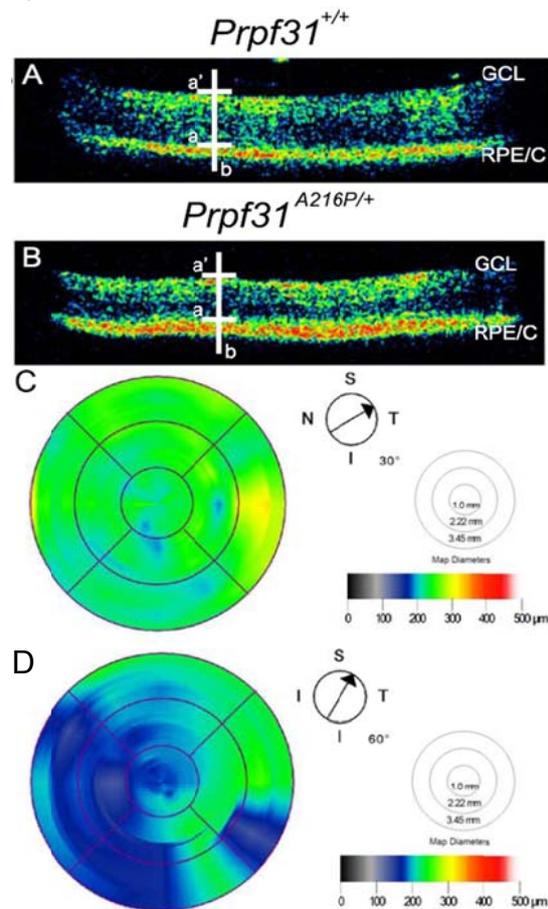


Figura 55. Imagen de OCT (A) y mapa de espesor retiniano de un ratón WT (C). Imagen OCT (B) y mapa de espesor retiniano de ratón *Prpf31*^{A216P/+} KI (D). El espesor retiniano fue medido desde la membrana limitante interna (a') en el inicio de la capa de células ganglionares (GCL) hasta el inicio del EPR/coroides (EPR/C) (a). También se evaluó la hiperreflectividad del EPR/C (b). La escala de colores representa el grosor retiniano medido en μm y se utilizó como referencia para la valoración de los mapas de espesor retiniano.

En la figura 55 puede observarse el adelgazamiento en el espesor retiniano en los ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI tanto en la imagen de OCT (Fig. 55 B) como en el mapa de espesor retiniano (Fig. 55 D). Además, los ratones mutantes presentaron un aumento de la reflectividad del EPR (Fig. 55 B). La media de espesor retiniano que obtuvimos en los ratones WT fue de 218 μm ($\pm 4,7 \mu\text{m}$) y 196 μm ($\pm 3,9 \mu\text{m}$) en los *Prpf31*^{A216P/+} KI, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Fig. 56 A). Existen algunos artículos en los que se ha evaluado el espesor de la retina en ratones silvestres CD57 a través de OCT, aproximándose el valor normal a las 210 μm ^{157,158}, cifra muy similar a la obtenida en los ratones WT de este estudio.

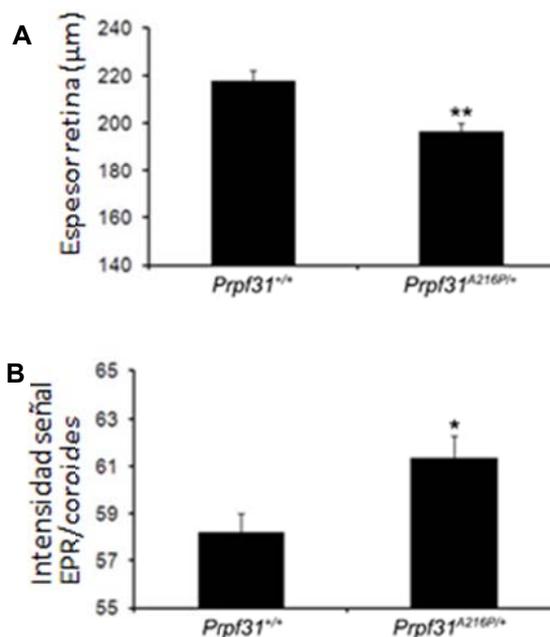


Figura 56. Cuantificación del espesor retiniano (A) y de la reflectividad del EPR/C (B) en ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+} KI. Los valores representan el promedio de 5 ratones en cada grupo \pm EEM. Estadística *t*-test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Los hallazgos en las imágenes de OCT y su respectiva cuantificación demostraron que la retina de los ratones mutantes presentaba una disminución en su espesor de aproximadamente el 10%. Aunque no

tenemos claro aún cuál es el mecanismo fisiopatológico que lleva a dicho adelgazamiento, pensamos que no se debe a una pérdida en el número de núcleos celulares en las capas de la retina, ya que estas capas parecen normales en los cortes histológicos (Fig. 57 A). Estudios publicados con anterioridad y realizados en los ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI y *Prpf31*^{-/+} KO tampoco han mostrado pérdida de núcleos en las capas de la retina¹²⁶. Es posible que el adelgazamiento retiniano se deba a una atrofia de los axones de la capa plexiforme interna (CPI), ya que hemos podido observar un adelgazamiento de esta capa en los cortes histológicos (Fig. 57 B). Creemos que dicho adelgazamiento podría deberse a una disfunción de la retina que se inicia por un defecto en el EPR. Por otro lado, la hiperreflectividad del EPR probablemente se deba a un efecto ventana, por adelgazamiento de la retina neurosensorial suprayacente (aumento indirecto de la reflectividad). Estos hallazgos nos recuerdan a los signos de degeneración macular atrófica en el humano¹⁵⁹.

4.1.5 LOS RATONES *Prpf31*^{A216P/+} KI PRESENTAN ATROFIA DEL EPR Y DE LA CPI DE LA RETINA

La evaluación histológica de la neuroretina y EPR realizada con hematoxilina-eosina (Fig. 57 A-D), mostró que en los ratones mutantes la CPI estaba atrofiada en algunas regiones de la retina (Fig. 57 B), lo que pudiera explicar porque observamos un 10% de disminución del grosor retiniano en la OCT. Curiosamente, el hundimiento de la CPI y de la capa plexiforme externa (CPE) son características descritas en pacientes con DMAE, las cuales pueden ser detectadas a través de OCT incluso antes de que se produzca atrofia geográfica (AG) asociada a drusas¹⁶⁰. Esta observación morfológica en la retina de los pacientes con DMAE seca mantiene abierto el debate sobre dónde se inician los cambios de la AG, si es a nivel del EPR o por el contrario en la retina neurosensorial.

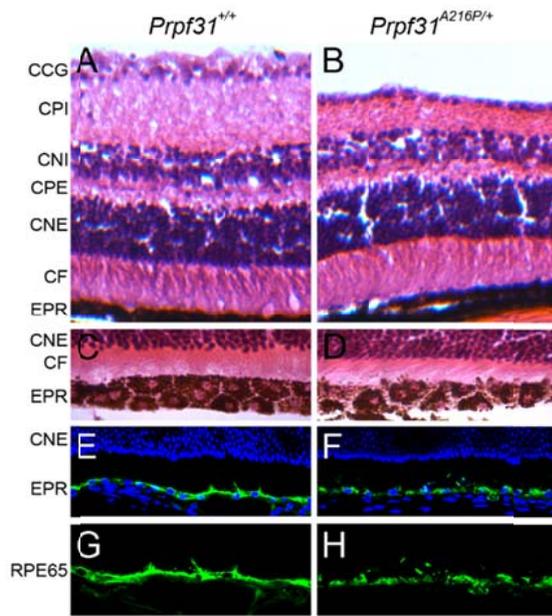


Figura 57. Cortes histológicos de la retina (A, B) y sección tangencial del EPR teñidos con hematoxilina-eosina (C, D) de ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+} KI. Inmunofluorescencia de EPR marcado con RPE65 (E-H; verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (E, F; azul). Las figuras G y H muestran solo la señal de RPE65 magnificada. CCG= capa de células ganglionares; CPI= capa plexiforme interna; CNI= capa nuclear interna; CPE= capa plexiforme externa; CNE= capa nuclear externa; CF= capa de fotorreceptores; EPR= epitelio pigmentario de la retina.

Además de la atrofia de la CPI, los ratones mutantes presentaron atrofia del EPR. Al realizar los cortes tangenciales del EPR observamos que uniones estrechas entre las células del EPR se perdían en el ratón *Prpf31*^{A216P/+} KI (Fig. 57D). Además, la intensidad de la señal de la proteína RPE65 disminuía en estos ratones mutantes, así como también se perdía la continuidad y homogeneidad de la expresión de RPE65 (Fig. 57 F y H). La pérdida de la integridad de la barrera hemato-retiniana debido a la pérdida de la uniones celulares del EPR ha sido descrita en la fisiopatología de la DMAE y en varios modelos animales de degeneración macular¹⁵⁵.

4.1.6 LOS RATONES *Prpf31*^{A216P/+} KI PRESENTAN VACUOLOZACIÓN DEL EPR Y ENGROSAMIENTO DE LA MEMBRANA DE BRUCH

Para ver con más detalle la morfología de las células del EPR y la membrana de Bruch realizamos un estudio de microscopía electrónica en ratones WT y mutantes. En los ratones WT se observó la morfología normal descrita para el EPR con la presencia de los OS de los fotorreceptores siendo fagocitados por el EPR (Fig. 58 A; SE, flecha), gránulos de melanina y lipofuscina (Fig. 58 A; Me, Lf), repliegues de la membrana celular del EPR (Fig. 58 A; Re) y la membrana de Bruch (Fig. 58 A; MB) con la substancia fundamental bien definida (Fig. 58 C; Sf) entre la lámina basal del EPR y la lámina basal endotelial (Fig. 58 C; Lb, cabezas de flecha).

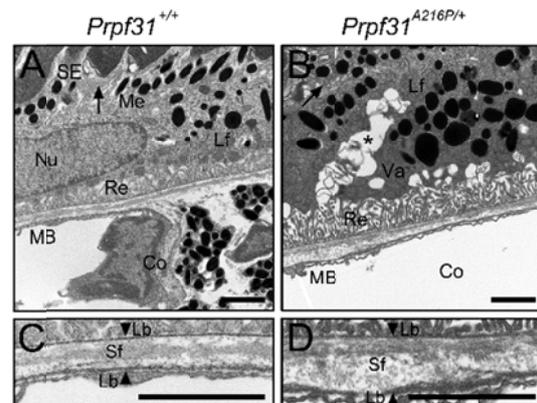


Figura 58. Microscopía electrónica del EPR en un ratón WT (A, C) y un ratón *Prpf31*^{A216P/+} KI (B, D). Las imágenes en C y D muestran una imagen ampliada de la membrana de Bruch. SE= segmentos externos; Me= gránulos de melanina; Lf= gránulos de lipofuscina; Nu= núcleo; Re= repliegues de la membrana celular del EPR; MB= membrana de Bruch; Co= coroides; Lb= lamina basal; Sf= substancia fundamental; Va= vacuolas. Las flechas muestran membranas de los SE fagocitados por el EPR. Las cabezas de flecha muestran el límite anterior y posterior de la MB. El asterisco representa la posible separación entre células del EPR o acumulo de vacuolas. Las barras de escala representan 2 μ m.

En los ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI se observó gran acumulación de membranas de los OS en el citoplasma del EPR (Fig. 58 B; flecha), acumulación de gránulos grandes de lipofuscina (Fig. 58 B; Lf), vacuolas y separación entre células del EPR por posible pérdida de las uniones estrechas o acumulación de vacuolas (Fig. 58 B; Va y asterisco), atrofia marcada de los repliegues de la membrana celular con aumento del espacio entre dichos repliegues (Fig. 58 B; Re), y finalmente engrosamiento de la membrana de Bruch y pérdida de la homogeneidad de la sustancia fundamental (Fig. 58 B; MB y D; Sf). El grosor de la membrana de Bruch en el ratón WT midió aproximadamente 400 nm y en el ratón mutante en su parte más ancha 800 nm medido entre la lámina basal del EPR y del endotelio (Fig. 58 C y D; Lb, cabezas de flecha).

El engrosamiento de la membrana de Bruch es una característica de la DMAE y del envejecimiento normal de la retina, dañina para los conos en los ratones KI. Este modelo pudiera ser muy útil para estudiar la interacción entre los factores ambientales, como la exposición a la luz, y la genética en el desarrollo de la DMAE.

4.1.7 LOS RATONES *Prpf31*^{A216P/+} TIENEN ACUMULACIÓN DE LIPOFUSCINA EN LAS CÉLULAS DEL EPR

Al igual que muchos otros tipos de células post-mitóticas, el EPR puede acumular lipofuscina durante el proceso normal de envejecimiento. Los fluoróforos que constituyen la lipofuscina de EPR sirven como una fuente de auto-fluorescencia que puede ser detectada por oftalmoscopia láser confocal¹⁶¹. Al evaluar los cambios morfológicos del fundus observamos que la retina y algunos de los depósitos blanco-amarillentos presentaban incremento de la auto-fluorescencia (Fig. 48 J). Esta descrito

que la lipofuscina tiene un pico de excitación entre 450-490 nm y un pico máximo de emisión de aproximadamente 600 nm¹⁶¹.

Por tal motivo decidimos analizar en el microscopio confocal láser la auto-fluorescencia del EPR de ratones WT y ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI. Los cortes histológicos conteniendo el EPR fueron excitados con un láser de argón a 457 y 488 nm y la barrera se fijó entre 615-715 nm (Fig. 59). Se observó claramente como la auto-fluorescencia de EPR se encontraba incrementada en los ratones mutantes (Fig. 59 C). Al observar con mayor aumento las muestras de EPR apreciamos que existían acúmulos de pequeños gránulos peri-nucleares auto-fluorescentes similares a los gránulos de lipofuscina (Fig. 59 D).

Los resultados de la tinción para lipofuscina pueden observarse mediante microscopía óptica normal o con luz ultravioleta. En la figura 59 se observa la elevada autofluorescencia del EPR del ratón KI.

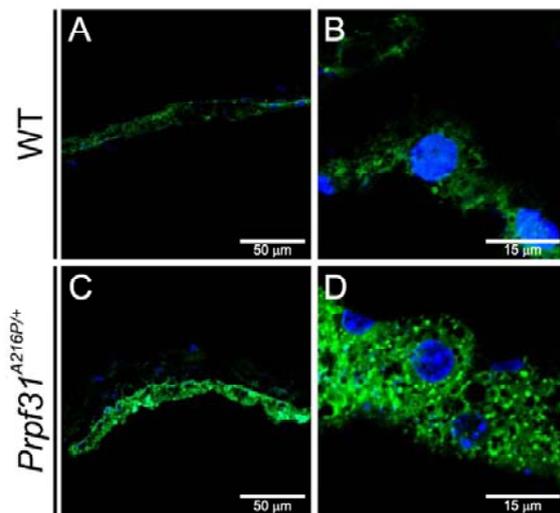


Figura 59. Auto-fluorescencia (verde) del EPR de un ratón WT (A, B) y *Prpf31*^{A216P/+} KI (C, D). En azul se observan los núcleos teñidos con DAPI. B y D muestran las imágenes amplificadas del EPR.

Finalmente, para comprobar si en realidad existía un incremento de la lipofuscina en el EPR de los ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI

realizamos la tinción de carbolfucsina de Kinyoun y ácido pícrico del AFIP para detectar lipofuscina. Comprobamos, mediante dicha tinción específica que efectivamente el EPR de los ratones mutantes presentaba acúmulos de lipofuscina, dado por la acumulación de gránulos de color magenta oscuro en la región apical del EPR (Fig. 60 C-D; flechas). Igualmente podemos apreciar la ausencia de dicha banda en los ratones WT (Fig. 60 A-B).

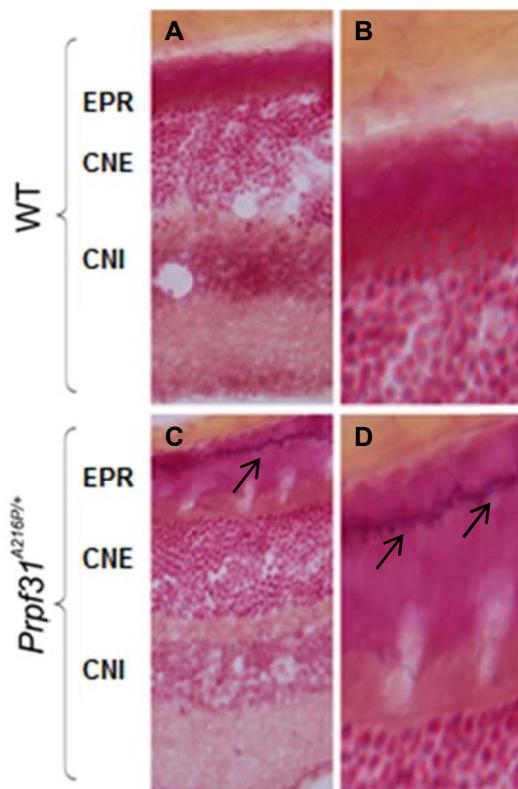


Figura 60. Tinción de carbolfucsina de Kinyoun y ácido pícrico del AFIP para detección de lipofuscina en un ratón WT (A, B) y en un ratón *Prpf31^{A216P/+}* KI (C, D). Las imágenes en B y D muestran una amplificación de la zona entre el EPR y la capa de fotorreceptores. Las flechas indican la acumulación de gránulos de lipofuscina. EPR= epitelio pigmentario de la retina; CNE= capa nuclear externa; CNI= capa nuclear interna.

Se ha sugerido que la acumulación excesiva de pigmento fluorescente de lipofuscina en el EPR representa un importante factor patogénico en la etiología

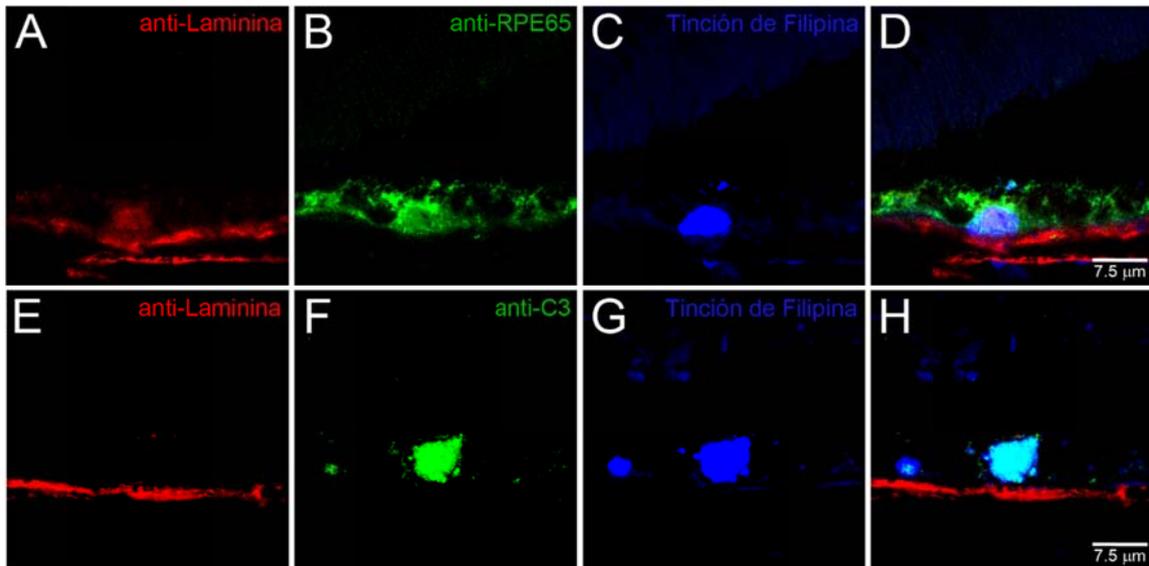
y la progresión de la DMAE seca. En la DMAE se ha observado incremento de compuestos citotóxicos bisretinoides derivados de lipofuscina, tales como A2E. Estos compuestos derivados de la lipofuscina se pueden formar en la retina de una manera no enzimática a partir de los retinoides del ciclo¹⁶².

4.1.8 ACUMULOS DRUSENOIDES SE OBSERVARON EN LA RETINA DE LOS RATONES *Prpf31^{A216P/+}* KI.

Las drusas, una de las principales características histopatológicas que pueden observarse en la DMAE, son depósitos focales de material de desecho extracelular que se localizan principalmente entre la lámina basal del EPR (membrana de Bruch) y las células del EPR. La composición química de las drusas es muy variada, pudiendo presentar acúmulos de carbohidratos, zinc, y cerca de 150 proteínas, incluyendo vitronectina, apolipoproteínas y numerosos componentes del sistema de complemento. El mayor componente de las drusas son lípidos, principalmente colesterol esterificado o no esterificado y fosfatidilcolina¹⁶³.

Para determinar si los ratones mutantes presentaban este tipo de lesiones drusenoides realizamos un estudio de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-laminina, un marcador de la membrana de Bruch, y anticuerpos anti-RPE65, una proteína específica del EPR. La tinción de Filipina la utilizamos para evaluar la presencia de colesterol libre. También utilizamos anti-cuerpos anti-C3, una proteína del sistema de complemento que se deposita en las drusas.

En la figura 61 podemos observar presencia de agregados de colesterol libre (Fig. 61 C, G) en un ratón *Prpf31^{A216P/+}* KI. Estos agregados o depósitos de colesterol libre se ubicaron entre la membrana de Bruch (Fig. 61 A) y el EPR (Fig. 61 B y D).



ana de
n anti-
. Para
an las

Algo de señal de laminina y RPE65 se observó en estos depósitos sugiriendo que estos también están conformados por agregados de diferentes proteínas. De hecho, el componente 3 del complemento (C3) colocaliza con los depósitos de colesterol libre (Fig. 61 F, G y H). Los depósitos de colesterol libre presentes en los ratones mutantes son comparables por su localización anatómica y por su composición bioquímica con las drusas que se identifican en pacientes con DMAE. Las drusas de la DMAE tiene un tamaño muy variable que oscila entre las 50 y las 250 μm ^{164,165}, mientras que las lesiones que presentaron los ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI midieron 7,5 μm de media. Esta diferencia de tamaño podría entenderse por la diferencia de tamaño entre el globo ocular humano y del ratón. Este tipo de lesiones drusenoides han sido observadas en otros modelos murinos de DMAE como el ratón transgénico *Cfh* Y402H y el doble KO *Ccl2*^{-/-} *Ccr2*^{-/-}^{148,166}.

Curiosamente, al realizar la evaluación del fundus en animales *Prpf31*^{A216P/+} KI electroporados para valorar el efecto de la terapia génica, observamos casualmente que la cantidad de acúmulos drusenoides se exacerbaban considerablemente.

Aunque desconocemos porqué la electroporación puede exacerbar el fenotipo observado en los ratones mutantes, se sabe que esta técnica produce daño celular secundario a un incremento en la producción de ROS¹⁴². Por lo tanto, creemos que la electroporación pudo haber incrementado la producción de ROS en la retina de los ratones y quizás por ello se exacerbó la formación de estos depósitos drusenoides. Por su puesto, esta es una hipótesis que debe ser comprobada y que de ser probada pudiera establecer la relación directa entre formación de drusas y producción de ROS.

4.1.9 LA EXPOSICIÓN A LA LUZ INDUCE DAÑO SOBRE LOS CONOS EN EL RATÓN *Prpf31*^{A216P/+} KI.

La exposición a una fuente de luz intensa ha sido utilizada como una técnica para inducir daño celular y exacerbar el fenotipo de degeneración retiniana en varios modelos animales^{167,168}. Por ello, diseñamos un experimento que consistió en exponer a los animales a 2500 lx durante 5 días consecutivos con el fin de valorar la morfología de la retina y ERG de ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+} KI pre y post exposición a la luz.

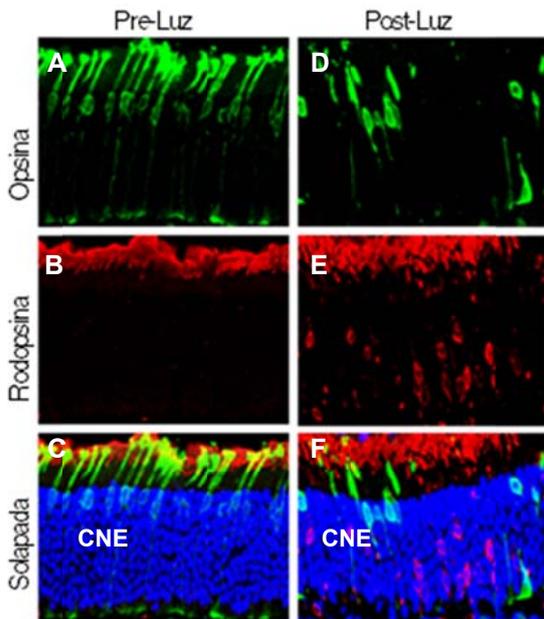


Figura 62. Morfología de la retina en ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI antes y después de exposición a una fuente de luz intensa durante 5 días. Los conos fueron marcados con anti-opsina (A, D; verde), los bastones fueron marcados con anti-rodopsina (B, E; rojo). En las letras C y F se muestran las imágenes solapadas. CNE= capa nuclear externa.

A nivel histológico observamos una degeneración más severa de los conos que en los bastones en los animales *Prpf31*^{A216P/+} KI tras cinco días de exposición a una fuente de luz intensa (Fig. 62). El número de conos, marcados con anticuerpos anti-opsina (Fig. 62 A, D; verde), disminuyó marcadamente en los

ratones mutantes. Mientras que la intensidad de señal de los bastones, marcados con anticuerpos anti-rodopsina (Fig. 62 B, E; rojo), fue similar en los ratones WT y mutantes, solo se observó acúmulos de señal de rodopsina en la CNE en los ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI post-luz.

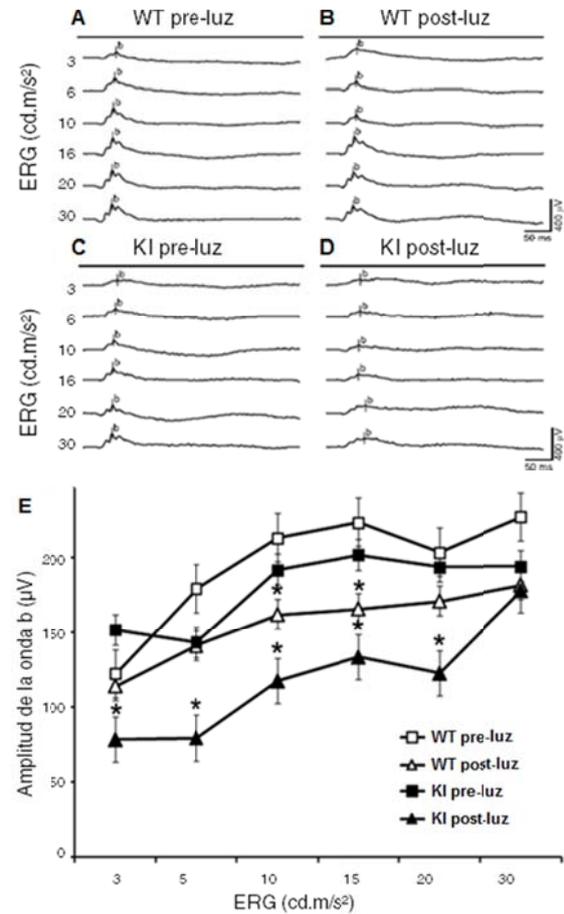


Figura 63. Registro ERG del ratón WT (A y B) *Prpf31*^{A216P/+} KI (C y D) pre y post-exposición a la luz intensa por 5 días. Cuantificación de la amplitud de la onda b del ERG (E). (A a D) y amplitudes medias de la onda b (E). Los valores representan el promedio de 5 ratones en cada grupo ± EEM. Estadística *t*-test. **p*<0,05.

Al realizar los registros de ERG en condiciones fotópicas pre y post-exposición a una luz, observamos que la amplitud de la onda b, la cual medía la respuesta de los conos, disminuía significativamente en los ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI posterior al daño inducido por la luz (Fig. 63 C-E). Los ratones WT también presentaron una

disminución de la amplitud de la onda b en condiciones fotópicas, pero esta disminución fue menos marcada que la observada en los ratones mutantes (Fig. 63 A, B, E). El resto de las ondas del ERG (respuesta de bastones y respuesta de bastones y conos) fueron normales, lo que sugiere que el daño causado por la luz fue más marcado sobre los conos.

Se ha descrito la existencia de un factor derivado de las células del EPR (PEDF) que ejerce un efecto protector sobre las células 661W frente a la muerte inducida por luz. Dado que las células 661W comparten características bioquímicas con los conos¹⁶⁹, se cree que dicho factor neurotrófico puede retrasar y prevenir la muerte de este tipo de fotorreceptores *in vivo*¹⁷⁰. Creemos que en los ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI, en los que ya existe una alteración del EPR, los niveles de PEDF deben estar reducidos y por ello la exposición a la luz resulta en especialmente dañina para los conos en los ratones mutantes. Este modelo pudiera ser muy útil para estudiar la interacción entre los factores ambientales, como la exposición a la luz, y la genética en el desarrollo de la DMAE.

4.1.10 LA PROTEINA PRPF31 SE EXPRESA ALTAMENTE EN EL EPR DE RATONES Y HUMANOS.

Dado que el fenotipo observado en los ratones mutantes parece afectar en un principio al EPR decidimos determinar los niveles de expresión de la proteína PRPF31 tanto en muestras de retinas de ratones WT y en la retina humana a través de estudios de inmunocitoquímica (ICQ), IF y WB.

Observamos que la expresión de la proteína PRPF31 es más marcada al nivel del EPR tanto en muestras de ratones como en la retina humana. Para observar la expresión de Prpf31 en la retina de ratones utilizamos anticuerpos anti-PRPF31 y detección con 3,3'-

diaminobenzidina (DAB). El DAB es oxidado en la presencia de peróxido de hidrogeno resultando en el depósito de un precipitado marrón oscuro, por lo tanto para este estudio utilizamos ratones WT albinos CD1 para evitar la interferencia que generaría la presencia de melanina en el EPR para la detección de la señal de DAB (Fig. 64).

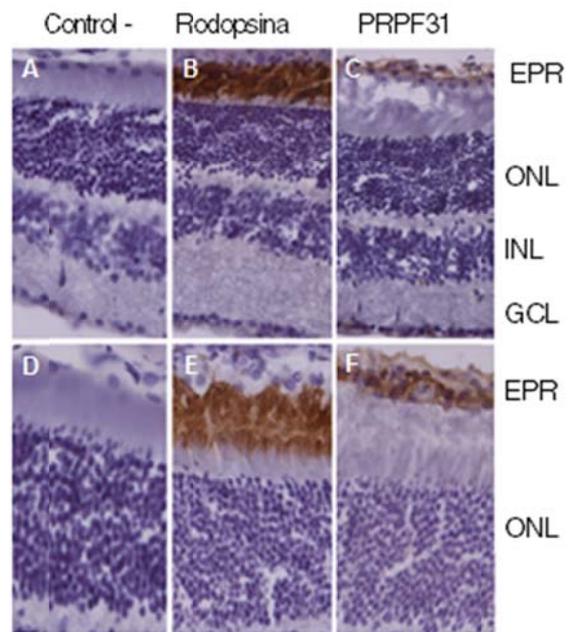


Figura 64. Inmunocitoquímica de la retina de ratón WT CD1 mostrando expresión de la proteína Prpf31 en el EPR (C, F). En las fotos A y D se muestra la ausencia de señal de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) en el control negativo. En las fotos B y E se muestra la señal de DAB marcando la rodopsina de los segmentos externos de los bastones. Las fotos D a la F muestran una ampliación de la zona del EPR, OS e IS de los fotorreceptores y parte de los núcleos de la capa nuclear externa. EPR= epitelio pigmentario de la retina; CNE= capa nuclear externa; CNI= capa nuclear interna; CCG= capa de células ganglionares

Para esta prueba utilizamos dos controles: en un primer lugar utilizamos un control para estar seguros que la señal que observamos es específica del Prpf31 y que no se debía a uniones inespecíficas del anticuerpo secundario. Para ello se realizó una ICQ solo con el anticuerpo secundario (Fig. 64 A, D) sin observarse ninguna señal

de DAB. En segundo lugar y para determinar si la técnica de ICQ funcionaba apropiadamente se utilizó un anticuerpo anti-rodopsina para marcar los bastones (Fig. 64 B, E) observándose una señal intensa a nivel del segmento externo. Finalmente la señal de la ICQ utilizando anticuerpos anti-PRPF31 se localizó intensamente a nivel del ERP.

Los resultados de la ICQ se comprobaron con WB al realizar la disección manual de la retina neural para separarla del EPR. Los extractos proteicos de la retina neural y del EPR se procesaron por separado y las membranas resultantes de la electroforesis y transferencia fueron probadas con anticuerpos anti-PRPF31 (Fig. 65). Se observó claramente que los niveles de Prpf31 eran más elevados en las muestras correspondientes a los extractos proteicos del EPR.

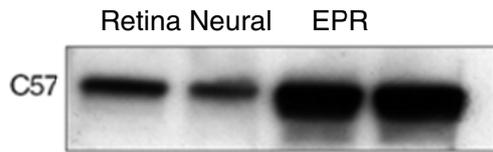


Figura 65. WB para determinar la expresión de Prpf31 en la retina neural y EPR de cada ojo de un ratón C57 WT. EPR= epitelio pigmentario de la retina.

Al realizar un estudio de IF y WB de la expresión de PRPF31 en la retina humana observamos que, al igual que en el ratón, la señal de PRPF31 se ubicó exclusivamente a nivel del EPR (Fig. 66 A; rojo) y que los niveles de expresión en el WB fueron más altos a nivel del EPR que en la retina neural (Fig. 66 B).

En estudios previos realizados sobre la expresión del ARNm del gen *Prpf31* en diferentes tejidos de ratón se observó que no existían diferencias en la expresión del mismo a nivel del ojo y otros tejidos como bazo e hígado. Sin embargo, en ningún trabajo hasta ahora se ha demostrado claramente la expresión diferencial entre la

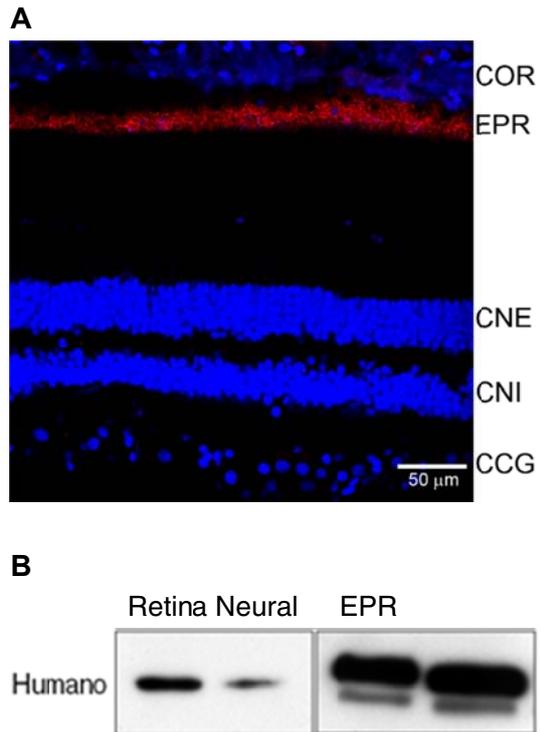


Figura 66. IF de la proteína PRPF31 en retina de un donante humano (A) y WB de la retina neural y EPR de dos muestras de donante humano sano. COR= coroides; EPR= epitelio pigmentario de la retina; CNE; capa nuclear externa; CNI= capa nuclear interna; CCG= capa de células ganglionares. La barra de escala representa 50 µm.

retina neural y el EPR. La alta expresión del PRPF31 en el EPR, aunado a que el fenotipo de degeneración observado en los ratones mutantes nos hace suponer que esta proteína debe estar realizando un papel muy importante a nivel del EPR y que posiblemente la tasa de producción y maduración de ARNm en el EPR debe ser muy alto e incluso mayor que en los fotorreceptores.

4.1.11 LA DISMINUCIÓN DE EXPRESIÓN DEL *Prpf31* EN LOS RATONES MUTANTES AFECTA A LA MADURACIÓN DEL *Rpe65*.

Como mencionamos en un principio solo aproximadamente el 40% de los ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI presentaron fenotipo de degeneración del EPR con depósitos

drusenoides en el EPR. Por tal motivo realizamos WB de ratones WT, KI que no mostraban alteraciones en el fondo de ojo (Fig. 67 A; KI1) y mutantes que mostraban el fenotipo, es decir, los depósitos drusenoides en el fondo de ojo (Fig. 67 A; KI2). La expresión de la proteína Prpf31 en la retina de los KI que mostraron el fenotipo completo fue menor que en el resto de los animales (Fig. 67).

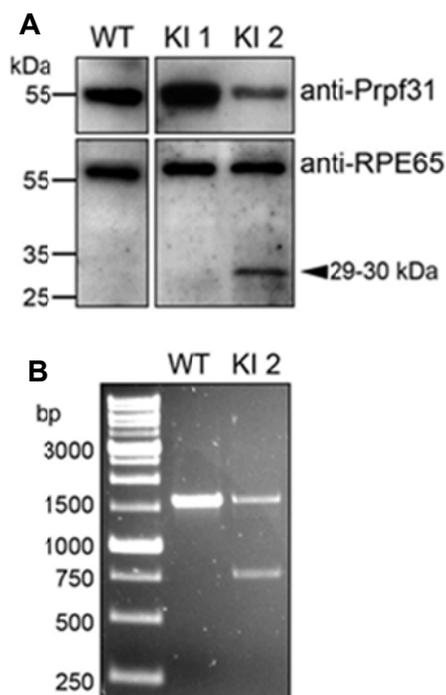


Figura 67. WB de Prpf31 y RPE65 de un ratón WT y de dos ratones mutantes uno sin fenotipo en el fondo de ojo (KI 1) y otro con depósitos drusenoides (KI 2) (A). RT-PCR del RPE65 de un ratón WT y otro mutante con fenotipo (KI 2) (B).

Además, observamos que en el WB de estos ratones con fenotipo aparecieron dos bandas para RPE65, una del mismo peso molecular que la que se identificó en los WT y en los KI sin fenotipo y otra banda de menor peso molecular (Fig. 67 A; punta de flecha). Para completar el estudio realizamos RT-PCR del ARNm de esta proteína y observamos que efectivamente aparecieron 2 bandas que se corresponden con el peso molecular de las 2 bandas del WB, es decir, en los ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI que presentan drusas en la

retina existen dos ARNm diferentes del RPE65 (Fig. 67 B).

Para asegurarnos de que esta segunda banda de menor peso molecular verdaderamente se correspondía con RPE65 decidimos secuenciarla. Comprobamos que en la secuencia de dicha banda le faltaban los exones del 4 al 8 además del final del exón 3 y el inicio del 9 (Ver figura anexa 2). Es decir, durante el proceso de maduración posiblemente ocurrió un fallo y se produjo un ARNm más corto. En otros ratones hemos visto que el splicing no siempre falla en el mismo punto.

Por tanto, si el ratón con KI con fenotipo completo tiene el proceso de maduración del ARNm alterado y el ratón KI1 tiene la banda en el WB normal, es decir, no tiene afectada la maduración de la proteína RPE65, podemos concluir que el fenotipo se relaciona directamente con la cantidad de expresión de Prpf31. ¿Y por qué siendo Prpf31 un factor expresado en todo el organismo afecta sólo a la maduración de esta proteína del ciclo visual? Por un lado se trata de una proteína que, siendo relativamente pequeña, tiene una estructura muy compleja (14 exones) en comparación con otras proteínas del ciclo visual (LRAT o 11-cisRDH tienen 3 y 9 exones respectivamente). Por otro lado, RPE65 está sometido a una elevada tasa de recambio diario⁴⁷ además de variar su expresión en función del ciclo de luz-oscuridad¹⁷¹. De hecho, hemos observado que la expresión del ARNm para RPE65, que es hasta 9 veces el valor basal en oscuridad en el WT, se encuentra muy disminuida en el ratón *Prpf31*^{A216P/+} KI, que incluso pierde esa variación de expresión en función del ritmo circadiano (Fig. 68). El defecto en la maduración de RPE65 explicaría que las primeras células en verse afectadas por la mutación en el gen *PRPF31* sean las del EPR.

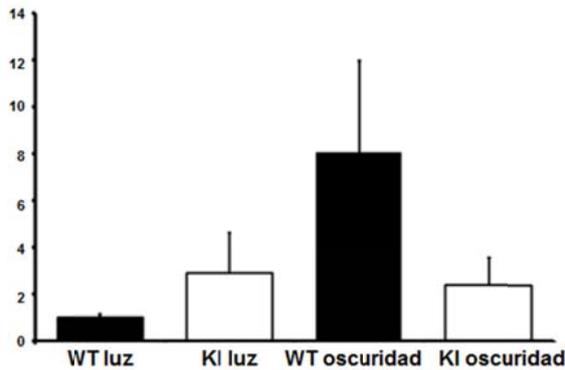


Figura 68. Expresión del RPE65 por *real time* PCR en ratones WT y mutantes en condiciones de luz y oscuridad.

Como ya se ha dicho, el origen de la onda c se encuentra en las células pigmentadas de la retina, por lo que la disminución de la amplitud de esta onda junto con los hallazgos en la funduscopia y los resultados histológicos nos lleva a pensar que en el ratón mutante KI el daño se inicia en el EPR y no en los fotorreceptores, como clásicamente ha sido descrita la RP. Recientemente ha sido publicado un artículo que apoya esa hipótesis¹²⁹. En él se describe una disminución de la fagocitosis de los OS de los fotorreceptores a nivel del EPR en diferentes modelos *Prpf* KO. Por otro lado, hemos visto que la presencia del fenotipo completo se relaciona directamente con la cantidad de expresión de *Prpf31*, lo que apoya el mecanismo de haploinsuficiencia como base fisiopatológica de la RP asociada a la mutación en *PRPF31*.

Como ya sabemos, la investigación traslacional se inicia en el laboratorio a través de los estudios preclínicos. Un requisito esencial para un estudio preclínico es contar con un buen modelo animal de la enfermedad. Debido a la alta prevalencia de la DMAE y al gran impacto económico y social que produce, se han desarrollado numerosos modelos animales para ensayar nuevos tratamientos para esta patología. Muchos de estos modelos

han logrado recapitular algunas de las principales características bioquímicas y patológicas observadas en la DMAE (tabla 4). Sin embargo, ninguno ha logrado mostrar un fenotipo completo de la enfermedad que incluya un cuadro progresivo de degeneración y pérdida visual con alteraciones patológicas en la membrana de Bruch, presencia de drusas, acumulación de lipofuscina, incremento de la producción de ROS, activación de la respuesta inflamatoria, atrofia del EPR y pérdida de fotorreceptores^{128,172,173}.

A excepción de los modelos animales de DMAE húmeda¹⁷⁴, que han permitido probar la eficacia y seguridad de algunos fármacos que evitan la NVC, en la actualidad no existen modelos animales fiables que permitan evaluar en forma objetiva la eficacia de nuevos tratamientos en la DMAE seca. Por tal motivo, el desarrollo de un modelo animal completo y fiable de DMAE seca es esencial para el desarrollo de nuevas terapias enfocadas en curar o enlentecer la progresión de esta patología. De hecho, en la primera convocatoria de la Iniciativa de Medicamentos Innovadores IMI2, dentro del programa europeo Horizonte 2020, uno de los principales problemas planteados dentro de esta convocatoria y relacionados con la DMAE seca es la falta de modelos animales que permitan realizar ensayos preclínicos para trasladarlos posteriormente a la clínica. Esto refleja claramente la importancia que tiene la creación de un modelo animal de DMAE que sea fiable, con signos claros de alteración visual, que puedan ser cuantificables, para poder valorar objetivamente los efectos terapéuticos de nuevos fármacos o de terapias avanzadas para su aplicación en investigación traslacional.

A pesar de que los pequeños roedores carecen de una estructura anatómica en la parte central de la retina donde exista una alta densidad de conos como, ocurre en macula del humano¹⁷³, este tipo de animales son los más utilizados, ya que son de más fácil manejo, menos costosos

Tabla 4. Resumen de las características fenotípicas de algunos de los principales modelos murinos de DMAE seca y comparación con el modelo *Prpf31^{A216p/+}* KI.

Grupo y vía afectada	Modelo	Engrosamiento de la MB	Presencia de drusas	Atrofia del EPR	Aumento de la autofluorescencia	Aumento de los niveles de A2E	Depósitos de complemento	Acumulación de células del sistema inmune	Atrofia de fotorreceptores	Alteraciones en el ERG	Referencia
Grupo 2. Activación del complemento	<i>Cfh^{-/-}</i>				+		+		+	+	Coffey et al., 2007
Grupo 2. Activación del complemento	Transgénico <i>Cfh^{-/-}Y402H</i>	+	+				+	+			Ufret-Vicentv et al., 2010
Grupo 2. Citoquinas	<i>Ccl^{-/-}</i> y <i>Ccr2^{-/-}</i>	+	+	+	+	+			+		Ambati et al., 2003
Grupo 2. Citoquinas	<i>Ccl^{-/-}</i>		+		+			+			Lühmann et al., 2009
Grupo 2. Daño oxidativo	<i>Sod1^{+/-}</i>	+	+						+	+	Imamura et al., 2006
Grupo 2. Metabolismo de proteínas y lípidos	Transgénico <i>APOEε2/ε4</i> v dieta rica en grasas	+	+	+					+		Malek et al., 2005
Grupo 2. Metabolismo de proteínas y lípidos	Transgénico catepsina D		+	+	+				+	+	Rakoczv et al., 2002
Grupo 3. Daño oxidativo	Inmunizado con CEP	+	+	+				+	+	+	Hollfield et al., 2008
Grupo 4. Otros	Ratones de senescencia acelerada	+	+						+		Takada et al., 1994
Grupo 1. ATPasa	<i>Abcr^{-/-}</i> Stargardt	+		+/-	+	+					Mata et al., 2001
Grupo 1. Factor de empalme de ARNm	<i>Prpf31^{A216p/+}</i> KI	+	+	+	+	¿?	+	+	+	+	Díaz et al., 2015**

Fuente. Modificado de Pennesi et al.¹²⁸ y Ramkumar et al.¹⁷³ Grupo 1: ratones con modificación de genes asociados con degeneración macular juvenil. Grupo 2: ratones con modificación de genes asociados con DMAE. Grupo 3: ratones inmunológicamente modificados. Grupo 4: ratones que desarrollan espontáneamente DMAE. MB: membrana de Bruch. EPR: epitelio pigmentario de la retina. ERG: Electroretinograma. CEP: carboxietilpirol. *Tras exposición a una fuente de luz intensa. **Manuscrito en preparación.

que el uso de primates no humanos o cerdos y presentan la ventaja de que pueden ser manipulados genéticamente para mimetizar las alteraciones genéticas observadas en los pacientes. Sobre la base de la patogénesis multifactorial de DMAE, los modelos murinos de DMAE seca se pueden clasificar en cuatro grupos y pueden afectar o involucrar varias vías (tabla 4). En primer lugar, los ratones genéticamente modificados con mutaciones presentes en la distrofias maculares juveniles son los modelos más comunes, e incluyen *Abcr*^{-/-} (enfermedad de Stargardt), transgénico *Elovl4* (enfermedad de Stargardt dominante), *Efemp1*^{R345W/R345W} (distrofia retiniana en panal de Doyme) y ratones *Timp3*^{S156C/S156C} (distrofia macular de Sorsby). En segundo lugar, otros modelos murinos que involucran genes diana relevantes para DMAE, incluyendo genes inflamatorios tales como *Cfh*^{-/-}, *Ccl*^{-/-}, *Ccr2*^{-/-}, *Cx3cr1*^{-/-}, *Ccl2*^{-/-} / *Cx3cr1*^{-/-} genes asociados al estrés oxidativo tales como *Sod1*^{-/-} y *Sod2* KO, genes involucrados en vías metabólicas de lípidos, proteínas y glucosa tales como *Nephrilina*^{-/-} (beta amiloide), línea transgénica *mcd/mcd* (catepsina D) y línea transgénica *APOe2e4* con dieta alta en colesterol. En tercer lugar, los ratones inmunológicamente manipulados por inmunización con carboxietilpirol (CEP), un fragmento oxidado del ácido decosahexaenoico (DHA) que se encuentra en las drusas. En último lugar, las cepas naturales de ratones, como *arrd2/arrd2* (mutación del gen *mdm*) y los ratones de senescencia acelerada (SAM) que desarrollan espontáneamente características de DMAE seca como la atrofia de los fotorreceptores y el engrosamiento de la membrana de Bruch (tabla 4). Todos estos modelos han permitido conocer más a fondo los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de esta patología, pero como se mencionó anteriormente ninguno de ellos presenta un cuadro completo de DMAE.

Inicialmente el ratón *Prpf31*^{A216P/+} KI fue

generado como modelo de RPad, sin embargo, los hallazgos encontrados al hacer el estudio fenotípico no revelaron ninguno de los hallazgos típicos de la RP. De hecho este modelo ya había sido estudiado previamente y se concluyó que no mostraba un fenotipo de degeneración de retina¹²⁶. En cambio, más recientemente ha sido publicado que los modelos de RP *Prpf* 3, *Prpf* 8 y *Prpf* 31 KO mostraron alteraciones en el EPR previo a sufrir alteraciones de la retina neuro-sensorial¹²⁹.

Por ese motivo, profundizamos en el estudio del EPR de nuestro modelo y, curiosamente, observamos alteraciones que se asemejan más con otros modelos de DMAE (tabla 4).

La DMAE es la consecuencia de un envejecimiento patológico de la retina. Con la edad se producen una serie de cambios en el EPR, que se caracterizan por la acumulación de cuerpos residuales (procedentes de la fagocitosis de los OS de los bastones) que contienen lipocfucsina. No se sabe si la acumulación de estos cuerpos residuales conduce a una alteración funcional del EPR. Se ha descrito que estos cuerpos muestran actividad enzimática de degradación.

Por otro lado, el envejecimiento conlleva también cambios en la membrana de Bruch: existe una disminución de la solubilidad del colágeno, que puede afectar a la permeabilidad de la membrana y a la acumulación de material residual, se acumulan lípidos de origen extracelular, similar a los cambios implicados en la aterogénesis, y ocurre un engrosamiento difuso de la cara interna y acumulación de material extraño, incluyendo amiloide beta, y formación de depósitos focales (drusas) entre la membrana basal del EPR y la membrana de Bruch. Parece que este material refleja la actividad metabólica del EPR en general, no procede sólo del OS. Se ha propuesto que el acúmulo patológico sea consecuencia de que el material a depurar sea anómalo debido a una degradación incompleta por algún fallo en

las enzimas de degradación. También se ha postulado que los ácidos grasos insaturados procedentes de los OS están sujetos a la oxidación de radicales libres, produciendo compuestos menos susceptibles a la degradación por enzimas lisosómicas.

En nuestro ratón *Prpf31*^{A216P/+} KI hemos observado una relación directa entre la presencia de drusas y la expresión de *Prpf31* y su papel en la regulación de la maduración de RPE65, proteína expresada en el EPR que juega un papel fundamental en el reciclaje de los pigmentos del ciclo visual. El defecto en la maduración de la proteína RPE65 justifica que las primeras células en ser afectadas por la mutación en *PRPF31* sean las del EPR.

En el congreso ARVO de 2015 se presentó un trabajo donde tratan de desacelerar el ciclo visual reduciendo los niveles de A2E mediante la inhibición de RPE65 como terapia para la DMAE¹⁷⁵. Por otro lado, Hoh Kam y cols. han demostrado la eficacia de una molécula (ciclodextrina) para reducir la inflamación y el depósito de amilide beta, en la membrana de Bruch así como aumentar el nivel de RPE65 en el modelo de DMAE seca *Chf*^{-/-} logrando una mejoría en la respuesta electroretinográfica a los 3 meses del tratamiento¹⁷⁶.

Aunque inicialmente pueda sorprender que un modelo animal diseñado para estudiar la RP presente unas alteraciones más similares a las de la degeneración macular, no es infrecuente que la mutación de un mismo gen pueda producir diferentes enfermedades. De hecho, se ha publicado que la mutación en *PRPR31* en una misma familia causó RP así como degeneración macular juvenil⁸³. También se ha descrito la aparición de drusas en familiares heterocigotos (es decir, portadores de la mutación) de pacientes con LCA, para la mutación en *RPE65*, que se justificaría por una actividad disminuida de la proteína RPE65¹⁷⁷.

Por todo esto creemos que nuestro ratón *Prpf31*^{A216P/+} KI muestra unas características fenotípicas que lo hacen útil como modelo de degeneración macular no exudativa.

4.2 EFICIENCIA DE LA LIBERACIÓN DEL GEN *PRPF31* EN LA RETINA DEL RATÓN *Prpf31*^{A216P/+}

4.2.1 LA LIBERACIÓN DEL GEN *PRPF31* EN EL ESPACIO SUBRETINIANO DE RATONES *Prpf31*^{A216P/+} RESTAURA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE RPE65

Para determinar los efectos de la liberación del gen *PRPF31* en la retina se inyectó 1 µl del plásmido pEGFP-C3 portando el cDNA del gen humano *PRPF31* en el espacio subretiniano del ojo izquierdo de cuatro ratones *Prpf31*^{A216P/+}. Como control se inyectaron 4 ratones solo con el plásmido pEGFP-C3. El ojo derecho de los ratones se utilizó como control del grupo (no inyectados). Los ratones WT fueron inyectados solo con el vehículo de la suspensión de los plásmidos a base de PBS. Inmediatamente después de la liberación del plásmido en el espacio subretiniano los ratones fueron electroporados colocando el cátodo sobre el ojo inyectado para facilitar la transfección de las células del EPR. El fundus de los animales se observó un mes después de haber realizado las inyecciones y electroporación. Seguidamente los animales fueron sacrificados y se recolectaron muestras para IF y WB.

En los ratones inyectados con el plásmido pEGFP+*PRPF31* se normalizaron los niveles de expresión del RPE65 al compararlo con el ratón WT inyectado con PBS y con el ratón mutante inyectado con pEGFP solo (Fig. 67). Estos resultados sugieren que el defecto del empalme del ARNm del RPE65 se recuperó en los ratones tratados con la sobreexpresión del gen *PRPF31*, estableciendo una causa

efecto entre la haploinsuficiencia del *PRPF31* y el defecto del empalme del ARNm del gen RPE65.

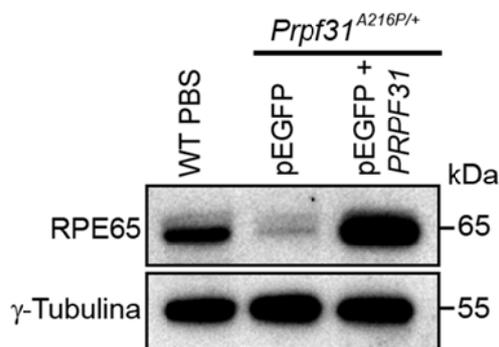


Figura 67. WB de ratones WT inyectados con PBS a nivel subretiniano y electroporados y ratones *Prpf31*^{A216P/+} inyectados a nivel subretiniano con pEGFP y pEGFP+*PRPF31* y electroporados. Los animales fueron sacrificados un mes después de realizadas las inyecciones y se evaluó por WB la expresión de la proteína RPE65. La expresión de gamma-tubulina fue utilizada como control de carga.

Curiosamente, las lesiones drusenoides en los ojos de los ratones inyectados tanto con el plásmido solo pEGFP-C3 y pEGFP+*PRPF31* así como también en los ojos no inyectados se incrementaron considerablemente al compararlos con ratones mutantes de la misma edad no electroporados. Aunque desconocemos las causas que originaron el incremento de las lesiones drusenoides creemos que ha sido por efecto de la electroporación, ya que el fundus empeoró en todos los ratones electroporados independientemente del grupo tratado. Incluso en ratones WT inyectados con PBS observamos algunas lesiones drusenoides posteriores a la electroporación, pero menos evidentes que en los ratones mutantes. Esta descrito que la electroporación puede incrementar la producción de ROS causando daño celular¹⁴² y la formación de drusas está relacionada de forma directa con el incremento del estrés oxidativo que puede conducir a la agregación de proteínas y lípidos¹⁷⁸. Debido a estas razones creemos que los ratones mutantes están sometidos a un estrés oxidativo de base que se

incrementó con la electroporación, aumentando la formación de depósitos drusenoides en la retina. Por tal motivo la electroporación no parece una técnica adecuada para la transferencia de genes en estos ratones mutantes, pero pudiera ser una herramienta útil para inducir la formación de lesiones drusenoides y para el estudio de los mecanismos moleculares que llevan a la agregación de proteínas y lípidos en modelos experimentales de DMAE.

4.2.2 PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE LOS AAV2

En la actualidad unos de los vectores más utilizados en terapia génica son los AAV, por ello, en este estudio en un primer momento decidimos utilizar este tipo de vector viral para la liberación de nuestro transgen terapéutico realizado con cDNA humano del gen *PRPF31*. En vista que la degeneración de la retina en nuestro modelo animal se inicia a nivel del EPR decidimos utilizar AAV del serotipo 2 ya que estos virus tienen cierta especificidad por infectar células del EPR. Además, este tipo de vector, AAV2, ya ha sido utilizado en humanos para el tratamiento con terapia génica de la LCA.

El primer paso para la producción de los vectores con el transgen terapéutico consistió en realizar la clonación del *PRPF31* fusionado a la secuencia del 3xFLAG dentro del plásmido pAAV-IRES-hrGFP. Posteriormente se realizó la transfección de la línea celular AAV-293 con el plásmido pAAV-IRES-*PRPF31*-hrGFP y otros dos más (pAAV-Helper, pAAV-RC) para la producción del virus AAV2-*PRPF31* (Fig. 68 A), siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos. Además, otro grupo de células se transfectó con el plásmido pAAV-hrGFP, para producir el virus AAV2-GFP utilizado como control.

Una vez que los virus fueron producidos se purificaron y concentraron a través de

columnas de heparina. En la figura 68 B se muestra la electroforesis de proteínas presentes en los extractos de los lisados celulares de la AAV-293 transfectadas y en la suspensión viral posterior a la purificación. En este último sólo se observaron las bandas de proteína viral VP1, VP2, y VP3 correspondientes a las proteínas de la cápside de los AAV2.

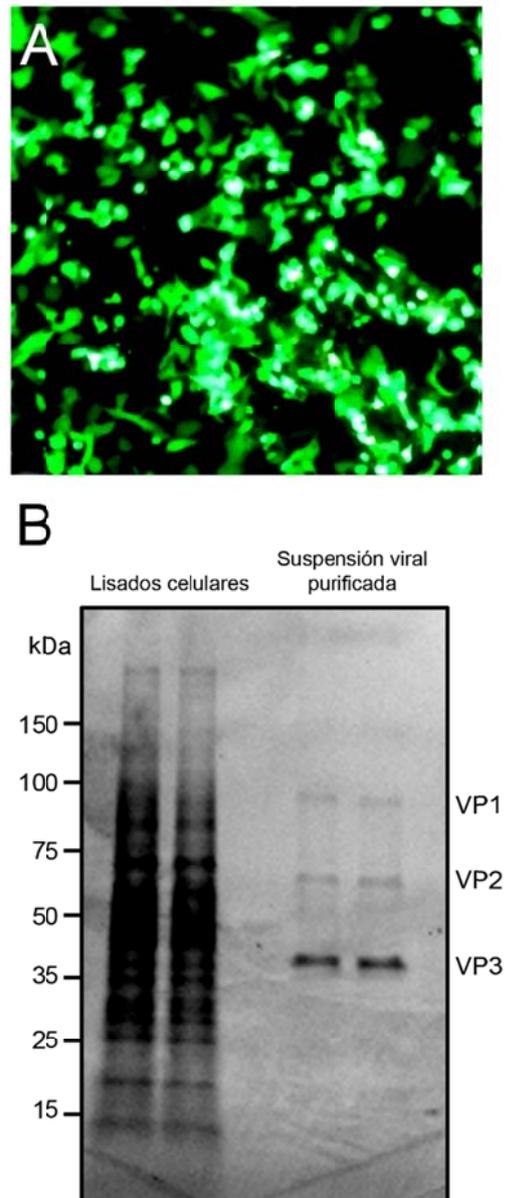


Figura 68. Células AAV-293 transfectadas con el plásmido pAAV-IRES-*PRPF31*-hrGFP (A). Electroforesis de las proteínas presentes en extractos de lisados celulares de AAV-293 y de los mismos extractos una vez purificados con columnas de heparina para obtener la suspensión viral (B).

Una vez que los lisados celulares fueron purificados para obtener la suspensión viral concentrada se procedió a realizar la titulación de las partículas virales (pv) contenidas en dicha suspensión. Para ello infectamos la línea celular AAV-HT1080 con nuestros virus AAV2-GFP y AAV2-*PRPF31* (Fig. 69) y tras 48 h realizamos la titulación por citometría de flujo contando el número de células con fluorescencia de GFP y también por titulación del ADN viral. Todos los viales virales se ajustaron para obtener una concentración final de 1×10^9 pv/ml para ser utilizada en los experimentos *in vivo*.

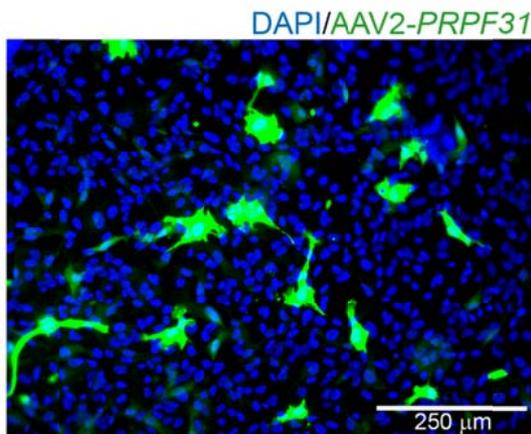


Figura 69. Células AAV-HT1080 infectadas con una dilución 1:10 del virus AAV2-*PRPF31* concentrado a 1×10^6 pv/ml. La barra de escala representa 250 μ m.

4.2.3 EL TRANSGEN *PRPF31* SE EXPRESA ADECUADAMENTE A NIVEL NUCLEAR IN VITRO

Para determinar si el transgen *PRPF31* se expresaba correctamente a nivel del núcleo celular, las células AAV-HT1080 fueron infectadas con el virus AAV2-*PRPF31* y con el virus control AAV2-GFP. Después de 48 h de infección las células fueron fijadas y se realizó la IF utilizando anticuerpos anti-Flag para detectar la expresión de la proteína PRPF31 fusionada a Flag. También se recolectaron los extractos celulares para realizar el WB. Las células infectadas con los virus AAV2-*PRPF31* presentaron la expresión de la

proteína PRPF31+Flag a nivel nuclear como era de esperar (Fig. 70 K), mientras que la expresión de GFP fue a nivel citoplasmático (Fig. 70 J). Igualmente, las células infectadas con los virus AAV2-GFP solo presentaron una señal fluorescente a nivel citoplasmático correspondiente a la señal de la GFP (Fig. 70 F) y ninguna señal de Flag (Fig. 70 G). Las células sin infectar no presentaron ninguna señal (Fig. 70 A-D). El incremento de expresión de la proteína PRPF31 y del Flag se observó exclusivamente en los extractos proteicos en las células infectadas con el virus AAV2-*PRPF31* (Fig. 70 M).

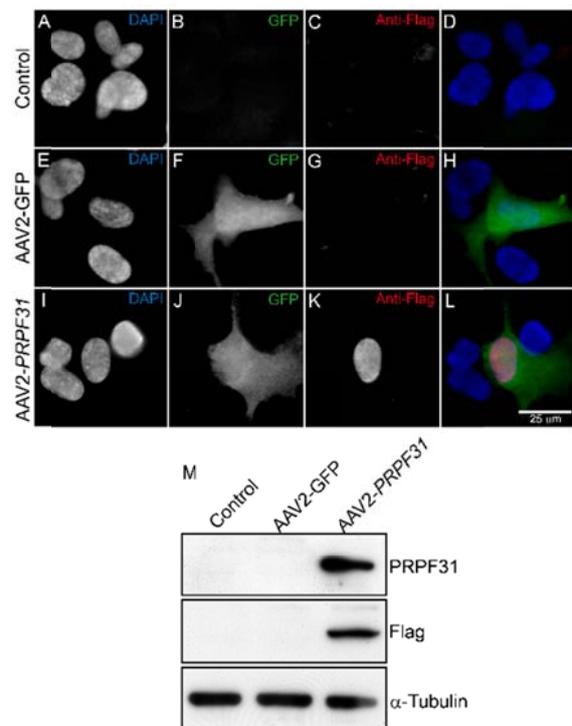


Figura 70. Expresión de la proteína PRPF31 en cultivos de células AAV2-HT1080. Células no infectadas (A-D). Células infectadas con virus AAV2-GFP (E-H). Células infectadas con AAV2-*PRPF31* (I-L). En las células infectadas se observó la señal fluorescente de la GFP (F, J; verde) y la expresión de la proteína PRPF31 se determinó con anticuerpos anti-Flag (K; rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (A, E, I; azul). La barra de escala representa 25 μ m. WB de la proteína PRPF31 y Flag en las células sin infectar (Control) e infectadas con AAV2-GFP o AAV2-*PRPF31*. La α -tubulina fue utilizada como control de carga (M).

4.2.4 LA SOBRE-EXPRESIÓN DEL GEN *PRPF31* UTILIZANDO AAV2 COMO VECTOR NO PRODUCE CITO-TOXICIDAD NI APOPTOSIS IN VITRO

En el desarrollo de cualquier nuevo medicamento es recomendable utilizar cultivos celulares para determinar la toxicidad de un compuesto antes de pasar a los estudios de experimentación animal. Por ello, previamente a testar los efectos de nuestro virus AAV2-*PRPF31* en los ratones mutantes evaluamos la toxicidad de los constructos virales en cultivo celular.

Las células AAV2-HT1080 fueron cultivadas en placas de 96 pocillos como se describe en materiales y métodos. Posteriormente fueron tratadas con PBS (control negativo), o con la suspensión viral con la construcción control (AAV2-GFP) o con la construcción viral con el gen (AAV2-*PRPF31*). Pasadas 48 horas se determinó la viabilidad (Fig. 71 A), la citotoxicidad (Fig. 71 B) y la apoptosis (Fig. 71 C) celular en cada grupo, a través de la cuantificación de la actividad de dos proteasas a nivel intra y extra-celular y por medio de la degradación de un sustrato específico de la caspasa 3/7 con el test ApoTox-Glo™ Triplex Assay (Promega). Como controles positivos para cuantificar la viabilidad y la citotoxicidad se utilizó Ionomicina y para la apoptosis Estaurosporina. En la figura 71 puede apreciarse que la sobre-expresión del gen *PRPF31* no produjo efectos citotóxicos ni la activación de las caspasas en la línea celular AAV2-HT1080 después de 48 h de infección.

4.2.5 EL TRANSGEN *PRPF31* HUMANO ADMINISTRADO CON AAV2 SE EXPRESA PRINCIPALMENTE EN EL EPR DE LOS RATONES *Prpf31*^{A216P/+}

Una vez que se comprobó la capacidad de expresión del transgen y la citotoxicidad *in vitro* se procedió a realizar los experimentos de terapia génica *in vivo*. Para ello se inyectó a nivel subretinal 1 µL de PBS (control vehículo) y de las suspen-

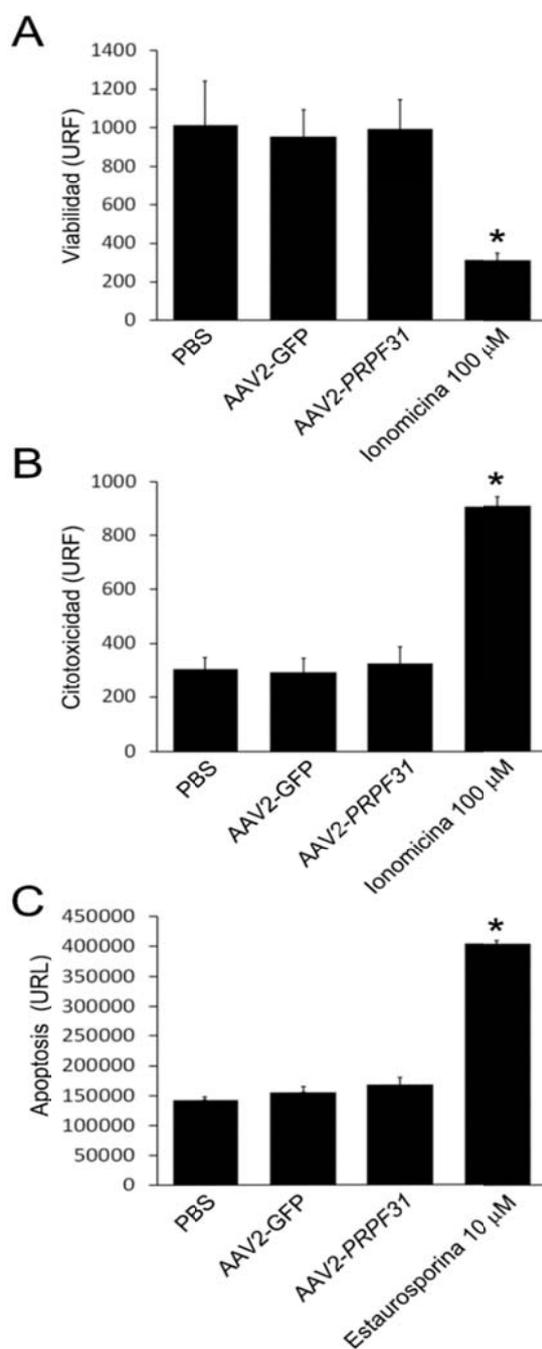


Figura 71. Efectos de la infección de AAV2-GFP y AAV2-*PRPF31* 1×10^9 pv/mL en cultivo de células AAV-HT1080. La viabilidad celular (A), citotoxicidad (B) y apoptosis (C) fueron evaluadas. La ionomicina y estaurosporina fueron utilizadas como control positivo. Las barras de los gráficos representan el promedio de los 4 experimentos independientes más/menos el error estándar de la media. Para el análisis de los resultados se utilizó ANOVA de un factor con prueba post hoc de Dunnett. * $p < 0,001$. URF= unidades relativas de fluorescencia, URL= unidades relativas de luminiscencia.

siones virales AAV2-GFP o AAV2-*PRPF31* tanto en ratones WT como mutantes *Prpf31*^{A216P/+} de 2 meses de edad. Posteriormente los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical a los 2, 4 y 6 meses posteriores a la inyección. Los animales fueron evaluados a través de funduscopia, test optomotor, ERG, histología y WB. En este grupo de animales no se realizó OCT ya que no se disponía del equipo a la hora de realizar

los experimentos de terapia génica utilizando los AAV2 como vectores.

En un primer momento se determinó si los AAV2 eran capaces de infectar las células del EPR y si se expresaba el transgen *PRPF31* adecuadamente (Fig. 72). Al evaluar la señal de fluorescencia de GFP en la retina (Fig. 72 A-C) de los ratones *Prpf31*^{A216P/+} inyectados observamos que la expresión de fluorescencia del transgen se

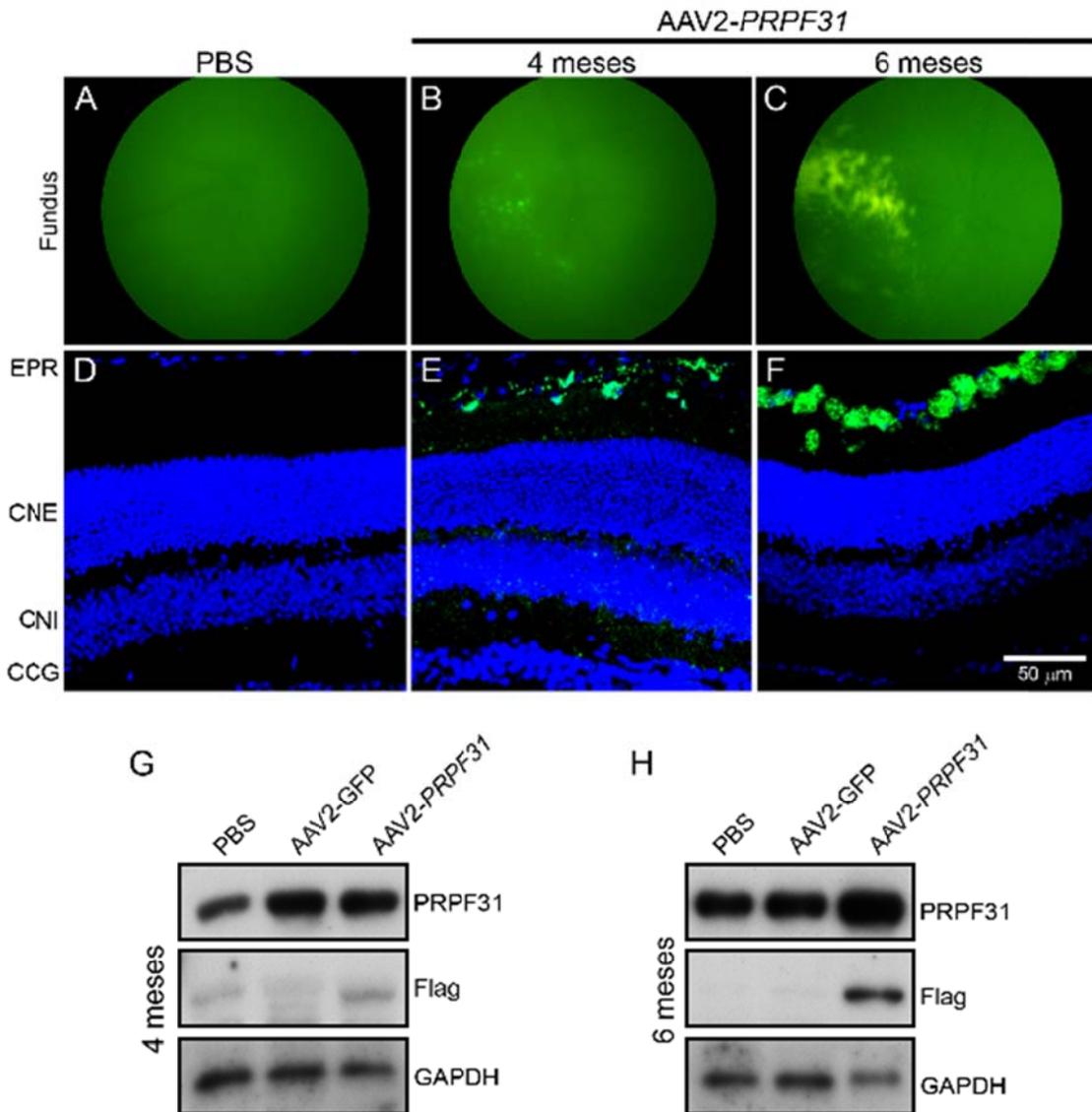


Figura 72. Expresión del transgen *PRPF31* en ratones *Prpf31*^{A216P/+} 4 a 6 meses después de la inyección con los virus AAV2-*PRPF31*. Los ratones también fueron inyectados con PBS solo (control del vehículo) y con los virus AAV2-GFP (control del vector). La evaluación de la expresión del transgen se realizó por medio de la observación de fluorescencia de GFP en la retina (A-C), en los cortes histológicos (D-F) y por WB (G-H) utilizando anticuerpos anti-*PRPF31* y anti-Flag. La expresión de GAPDH se utilizó como control de carga. CCG= capa de células ganglionares; CNI= capa nuclear interna; CNE= capa nuclear externa; EPR= epitelio pigmentario de la retina. Barra escala en D a F corresponde a 50 μ m.

comenzaba a hacer visible a partir del cuarto mes (Fig. 72 B). Al sexto mes post-inyección la expresión del transgen fue mucho más evidente ocupando entre 1/4 a 1/3 de la superficie de la retina (Fig. 72 C). Al evaluar los cortes histológicos observamos también claramente que la señal de expresión del transgen *PRPF31* se ubicaba a nivel del EPR (Fig. 72 E-F) siendo más marcada al sexto mes (Fig. 72 F). Finalmente, los resultados del WB confirmaron nuestras observaciones de que en los ratones mutantes infectados con el virus *AAV2-PRPF31* se incrementaron los niveles de la proteína PRPF31 debido a un incremento de expresión del transgen marcado con Flag al sexto mes post-infección (Fig. 72 H).

4.2.6 LA EXPRESIÓN DEL TRANSGEN *PRPF31* HUMANO ADMINISTRADO CON AAV2 NO PRODUCE NINGUNA MEJORA EN LA VISIÓN ESPACIAL DE LOS RATONES *Prpf31*^{A216P/+}

Una vez comprobada la expresión del transgen en las células del EPR procedimos a evaluar si dicha expresión ejercía algún efecto terapéutico sobre la visión espacial de los ratones *Prpf31*^{A216P/+}. Para ello evaluamos el test optomotor en un grupo de ratones mutantes inyectados con PBS (control vehículo) o con los virus *AAV2-GFP* (control vector) o *AAV2-PRPF31*, 6 meses posteriores a la inyección subretinal.

El grupo de ratones mutantes presentó una disminución de la agudeza visual, la cual empeoró con la disminución del contraste independientemente del grupo experimental (control del vehículo, control del vector, transgen terapéutico) (Fig. 73 A-C). El porcentaje de respuestas positivas en el test optomotor en los tres grupos experimentales se distribuyó en forma similar a la de los ratones mutantes no tratados (Fig. 73 A-C; línea de tendencia azul). Existe una diferencia significativa entre los valores de respuestas positivas del test optomotor entre los ratones WT y

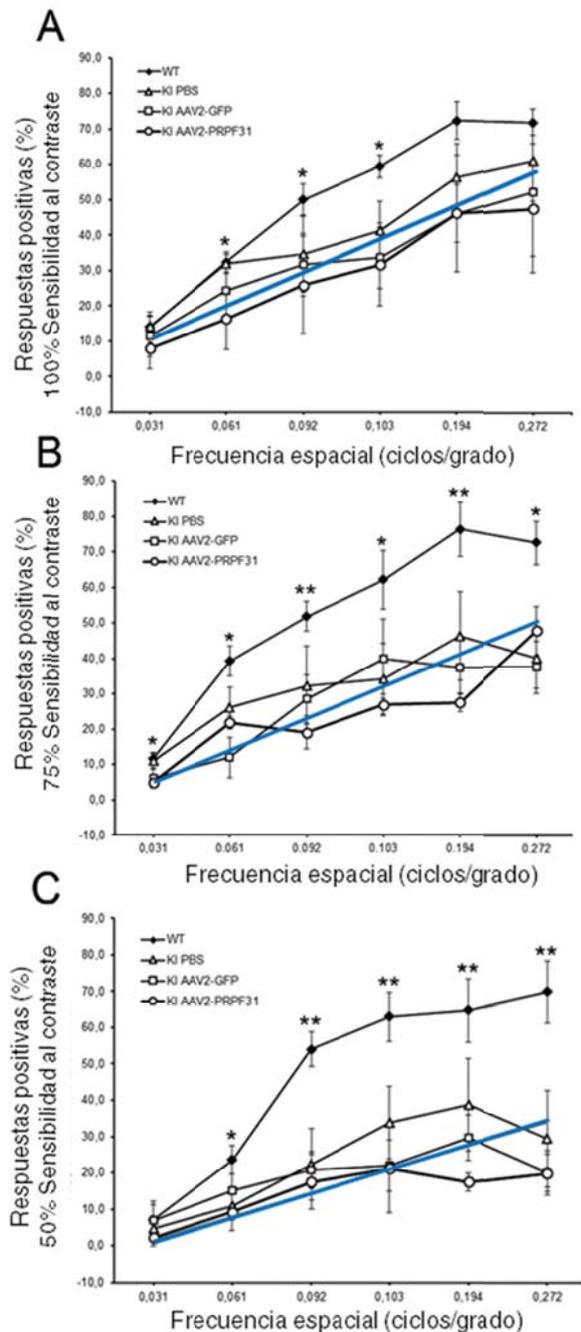


Figura 73. Porcentaje de respuestas positivas del test optomotor en ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+} KI 6 meses después de haber sido inyectados en el espacio sub-retiniano con PBS, AAV2-GFP o AAV2-*PRPF31*. La sensibilidad al contraste se ajustó a 100% (A), 75% (B) y 50% (C). La línea azul representa la línea de tendencia de ratones mutantes no inyectados. Los valores se expresan en promedios \pm EEM. Estadística *t*-test. **p*<0,05; ***p*<0,01.

los ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI tratados con AAV2-*PRPF31*. Esta diferencia significativa

está presente en casi todas las frecuencias espaciales exploradas y se hace más significativa al disminuir el porcentaje del contraste (Fig. 73 A-C).

Estos resultados nos muestran claramente que la expresión del transgen *PRPF31* utilizando AAV2 como vector no tuvo ningún efecto terapéutico en la visión espacial de los ratones *Prpf31*^{A216P/+}.

El mismo grupo de animales inyectados del experimento anterior fue sometido a exposición a la luz por 5 días para inducir más daño en la retina. Con ese experimento esperábamos encontrar algún efecto protector al sobre-expresar el *PRPF31*. Sin embargo, los resultados fueron los mismos, no se encontró ningún efecto terapéutico con la sobre-expresión del transgen. Incluso los valores de los animales tratados con el virus AAV2-*PRPF31* fueron los peores.

4.2.7 LA EXPRESIÓN DEL TRANSGEN *PRPF31* HUMANO ADMINISTRADO CON AAV2 NO PRODUCE NINGUNA MEJORA EN LA AMPLITUD DE LA ONDA C DE LOS RATONES *Prpf31*^{A216P/+}

Para determinar si la sobre-expresión de la proteína PRPF31 tenía algún efecto terapéutico sobre la recuperación de la amplitud de la onda c, los ratones mutantes inyectados y WT fueron adaptados a la oscuridad y se practicó el registro del ERG 6 meses después de la inyección. Al igual que los resultados obtenidos en el test optomotor, los ratones *Prpf31*^{A216P/+} no presentaron recuperación de la amplitud de la onda c, incluso la ratio onda c/b fue peor en el grupo tratado con el virus AAV2-*PRPF31* (Fig. 74 A-B).

Estos resultados, aunados a los datos obtenidos en el test optomotor, nos confirman que a la dosis de 1×10^9 pv/mL y a los 6 meses de expresión del transgen *PRPF31* liberado en el espacio sub-retiniano utilizando como vector AAV2 no se producen ningún efecto terapéutico ni

en la onda c ni en la visión espacial. Estos mismos resultados se obtuvieron a una menor dosis de 1×10^5 pv/mL y cambiando el promotor de CMV por el promotor del RPE65. Sería recomendable probar con diferentes dosis de virus y observar a los animales inyectados a más largo plazo, para determinar si en realidad la sobre-expresión del *PRPF31* tiene o no un efecto terapéutico. Sin embargo, alcanzar concentraciones virales superiores a 1×10^9 pv/mL es muy difícil con los sistemas de concentración y purificación utilizados. Para ello deberíamos utilizar un protocolo de concentración por centrifugación por gradientes y no columnas de heparina. En humanos hasta ahora para el tratamiento de la LCA se han utilizado dosis desde $1,5 \times 10^{10}$ a $1,5 \times 10^{11}$ pv/mL^{179,180,181}.

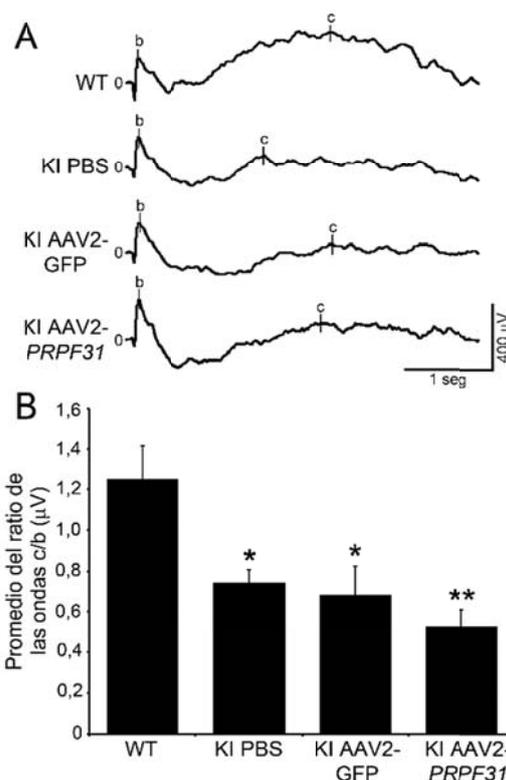
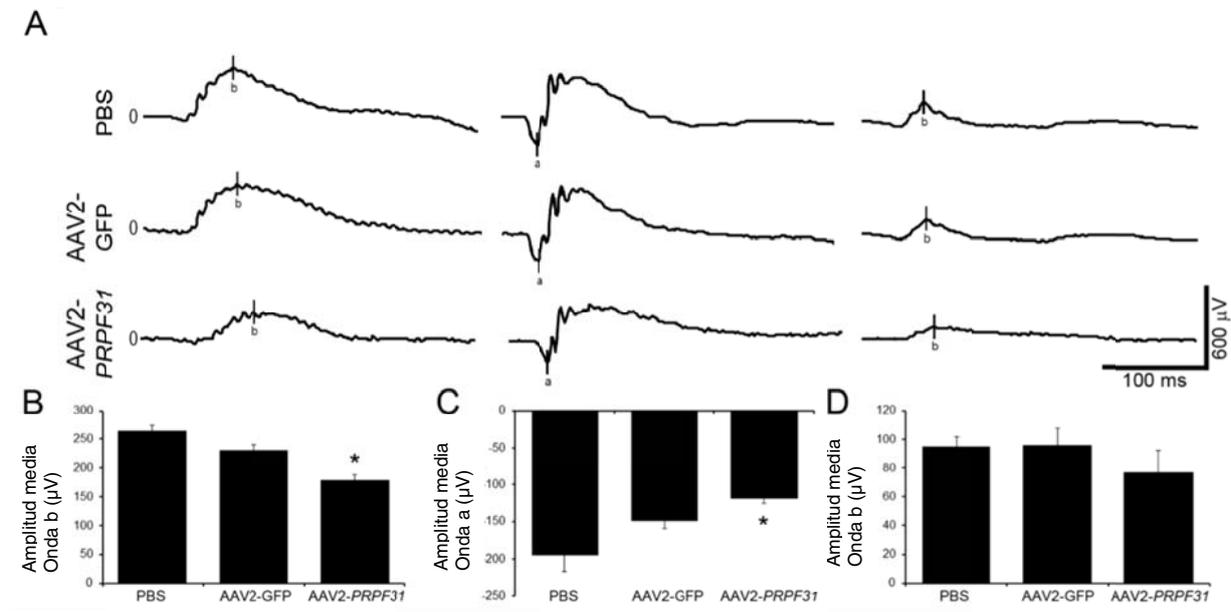


Figura 75. Amplitud de la onda c en ratones WT y ratones *Prpf31*^{A216P/+} inyectados con PBS, AAV2-GFP y AAV2-*PRPF31* (A). Cuantificación de la onda c del ERG de los ratones WT y *Prpf31*^{A216P/+}. Los valores representan el promedio de 4 ratones en cada grupo \pm EEM. Estadística t-test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2.8 LA EXPRESIÓN DEL TRANSGEN PRPF31 HUMANO ADMINISTRADO CON AAV2 DISMINUYE LA AMPLITUD DE LA ONDA A y B DE LOS RATONES Prpf31^{A216P/+}

La respuesta electroretinográfica de los ratones un mes después de la inyección produjo ningún resultado positivo así como tampoco ningún efecto tóxico: hasta ese momento no observamos cambios en la amplitud de las ondas en el ERG. Sin embargo, volvimos a evaluar a los animales pasados 4 meses de la inyección. Entonces sí detectamos cambios en la amplitud de las ondas a y b. En la figura 76 podemos ver el resultado de la respuesta electroretinográfica cuatro meses después

de la inyección. Se observa una disminución de la amplitud de las ondas a y b (Fig. 76 A) que interpretamos como un efecto tóxico sobre los fotorreceptores en los animales *Prpf31^{A216P/+}* KI sometidos a la inyección con AAV2-PRPF31, y que fue estadísticamente significativo en el ERG adaptado a la luz. Pensamos que dicho efecto tóxico puede deberse al elevado nivel de expresión de *Prpf31* en un tejido que, por otro lado, ya presenta signos de degeneración. También podemos ver la amplitud media de las ondas b y a en el ERG adaptado a la oscuridad (Fig. 76 B y C) y la amplitud media de la onda b en condiciones fotópicas (Fig. 76 D).



ndas b,

4.2.9 LA EXPRESIÓN DEL TRANSGEN *PRPF31* HUMANO ADMINISTRADO CON AAV2 PRODUCE INFILTRACIÓN DE MACROFAGOS EN LOS RATONES

Prpf31^{A216P/+}

En vista que los ratones *Prpf31*^{A216P/+} inyectados con el virus AAV2-*PRPF31* presentaron disminución de la amplitud de las ondas a y b en el ERG, decidimos evaluar la imagen de fondo de ojo y la histología de la retina para determinar si existían signos de atrofia en los fotorreceptores. Al realizar la funduscopia pudimos apreciar que las lesiones blanco-amarillentas persistían en los animales tratados (Fig. 77 A), incluso el número de lesiones autofluorescentes (Fig. 77 C; flecha b) se incrementó cerca del sitio de la inyección y en las áreas en las que se detectó expresión de GFP (Fig. 77 C; flecha a). Al realizar el estudio histológico para detectar la presencia de macrófagos marcados con los anticuerpos anti-Iba1, observamos que muchas células expresaban GFP a nivel del EPR siendo negativas para Iba1 (Fig. 77 D-F), pero otras células positivas para GFP también lo eran para Iba1 (Fig. 77 G-L), lo que evidencia una presencia de macrófagos en el sitio de la inyección.

Curiosamente en el sitio de la inyección, donde se observó la presencia de macrófagos, la capa de fotorreceptores presentaba un aspecto atrófico con pocas capas de núcleos en la CNE. Aunque la presencia de infiltrados de macrófagos en estudios de terapia génica con AAV2 en otros modelos de RP no han sido descritos, es probable que la pérdida de la integridad de la barrera hemato-retiniana en los ratones *PRPF31*^{A216P/+} que ya tienen afectado de base el EPR predisponga a la infiltración de macrófagos en la retina al realizar la inyección subretiniana con vectores virales AAV2. Ésto, a su vez, explicaría por qué la terapia génica no mostró efectividad e incluso por qué empeoró el registro del ERG con atrofia de la capa de fotorreceptores. En estudios posteriores sería recomendable utilizar otra

vía de administración del vector como por ejemplo la vía intravítrea o incluso probar otro tipo de vectores.

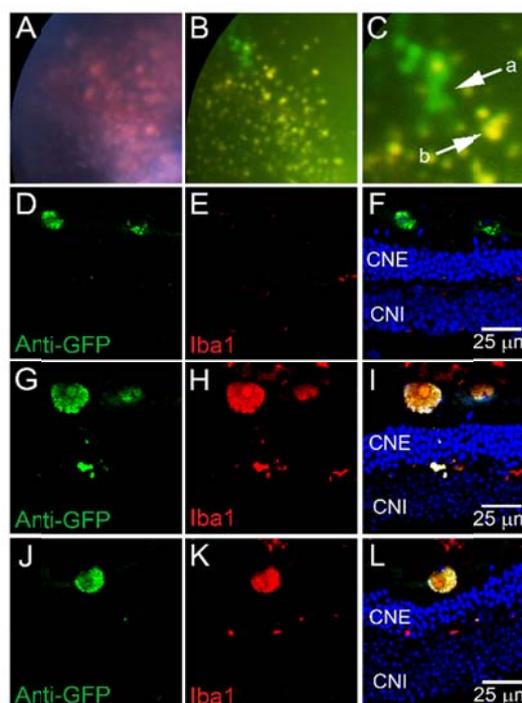


Figura 77: Funduscopia (A-C) e inmunofluorescencia (D-L) de un ratón inyectado con las construcciones virales mostrando el incremento de las lesiones autofluorescentes (B y C; flecha b) en el sitio de la inyección y de expresión de GFP (B y C; flecha a). Algunas células GFP positivas (G y J) presentaron expresión del marcador de macrófagos Iba1 (H y K). En los sitios donde se observaron macrófagos la capa de fotorreceptores parecía atrófica (I-L). CNE= Capa nuclear externa; CNI= Capa nuclear interna. Barras de escala representan 25 micras.

4.2.10 LA EXPRESIÓN DEL TRANSGEN *PRPF31* UTILIZANDO NANOPARTICULAS ES EFECTIVA PARA RECUPERAR LA VISION ESPACIAL EN LOS RATONES MUTANTES

Las nanopartículas han demostrado ser eficaces para la liberación de genes en la retina¹⁰⁹. Por esta razón tras realizar los primeros experimentos con AAV2 utilizamos nanopartículas inorgánicas basadas en Span 80 como vector. Estas nanopartículas han sido sintetizadas en el departamento de Farmacia y Tecnología farmacéutica de la Universidad de

Santiago de Compostela (Facultad de Farmacia) y los resultados de la experimentación animal utilizando estos vehículos han sido parte del trabajo de tesis de una doctorando de la Universidad de Santiago. Sin embargo, en vista de los efectos obtenidos hemos querido mostrar algunos de los principales resultados como anexos.

Se hicieron tres grupos, 5 ratones WT que se inyectaron con sólo glucosa 5%, 5 ratones *PRPF31^{A216P/+}* KI con el vector con EGFP (SA-PA-GFP) y 5 animales *PRPF31^{A216P/+}* KI que se inyectaron con el vector con EGFP y con el gen (SA-PA-*PRPF31*). Dichos animales fueron analizados un mes después de la inyección y los resultados obtenidos se pueden ver en las figuras anexas: en la figura anexa 3 se muestra células derivadas de EPR de humano (RPE-1) transfectadas con las nanopartículas y expresando el transgen *PRPF31* a nivel del núcleo. En la figura anexa 4 se muestra cómo los animales inyectados con estas nanopartículas presentaron recuperación de la agudeza visual en el test optomotor un mes después de la inyección. Además, en los ratones inyectados con las nanopartículas no se observó la atrofia de la retina al cuantificar el grosor retiniano por OCT (figura anexa 5). Por supuesto son requeridos más estudios y a mayor largo plazo para comprobar la seguridad y eficacia de estas nanopartículas, pero el hecho que hayan demostrado cierto efecto protector nos obliga a seguir explorando los efectos de la sobreexpresión de *PRPF31* en estos modelos animales de RP con degeneración primaria del EPR.

Una vez realizada la terapia génica y encontrar las alteraciones previamente descritas en el ERG y al observar cualitativamente que en el fondo de ojo la autofluorescencia de las lesiones también estaba aumentada, nos planteamos que al existir una alteración a nivel del EPR y, por tanto, una ruptura de la barrera hemato-

retiniana, debe existir algún tipo de proceso inflamatorio a ese nivel que hace que el efecto de la terapia con AAV2-*PRPF31* sea tóxico para las células de la retina.

Se ha publicado en varios artículos^{182,183} que algunas de estas lesiones auto-fluorescentes corresponden a infiltrados de macrófagos, por lo que realizamos inmunohistología con un marcador de macrófagos (Iba1) de retina de ratones *Prpf31^{A216P/+}* inyectados con el virus AAV2-*PRPF31* y observamos que algunas células del EPR sólo expresan señal de GFP, pero también observamos células grandes entre EPR y los fotorreceptores positivas para Iba1, es decir, similares a macrófagos. Además, donde vimos más atrofia de fotorreceptores es donde más infiltrado de estas células existía.

Hasta ahora no se habían descrito efectos colaterales en la retina con el uso de este tipo de vector viral, sin embargo, en uno de los últimos artículos publicados que evalúan a pacientes tratados para la LCA con terapia génica con AAV han visto que la muerte de fotorreceptores continua a pesar de la terapia^{184,185}.

Pensamos que si sólo hubiera existido afectación a nivel de los fotorreceptores en nuestro modelo animal tal vez hubiéramos obtenido un resultado positivo con la terapia génica, pero habiendo alteración en la estructura del EPR, con pérdida de uniones intercelulares, cualquier inyección podría conllevar a la migración de macrófagos desde la circulación general a este tejido. Cuando hemos realizado los experimentos cambiando el vector por nanopartículas inorgánicas al mes hemos obtenido una mejoría de la función visual. En cualquier caso necesitaríamos hacer un seguimiento de los animales a más largo plazo para asegurarnos de que este efecto terapéutico se mantiene en el tiempo.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. El modelo de ratón *Prpf31*^{A216P/+} KI presenta un fenotipo de degeneración retiniana en el que se altera la función visual incluso previo a que existan evidencias electroretinográficas e histológica de degeneración de los fotorreceptores.
2. La reducción en la amplitud de la onda c así como la elevada expresión de la proteína Prpf31 en el EPR de estos animales y el defecto de la maduración de *RPE65*, nos hace pensar que la disfunción celular se inicia en el EPR.
3. Bajo situaciones que aumentan el estrés oxidativo, se incrementa la formación de pseudodrusas en la retina de los ratones KI. Estas lesiones presentan la misma disposición histológica y la misma composición bioquímica que las drusas que aparecen en la DMAE en el humano. Por ello, el modelo murino *Prpf31*^{A216P/+} KI presenta degeneración de retina con características anatómo-patológicas y funcionales que lo hacen útil como modelo de DMAE seca
4. La liberación del gen *PRPF31* *in vitro* muestra una expresión adecuada y no tiene efectos tóxicos. Sin embargo, la terapia génica con el constructo AAV-*PRPF31* logra una elevada expresión *in vivo*, pero que lleva a la aparición de efecto tóxico. A corto plazo, utilizar nanopartículas inorgánicas como vector del gen *PRPF31* mejora la visión espacial en el ratón *Prpf31*^{A216P/+} KI.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Reh, T. A. y. M., A. in *Ryan Retina* Vol. 1 (ed Marbán) Ch. 1, 3-19 (Elsevier, 2009).
- 2 Rappaport DH, F. J., LaVail MM, Rakic P. Genesis of neurons in the retinal ganglion cell layer of the monkey. *J Comp Neurol.* 322, 577-588 (1992).
- 3 Cohen, A. I. Electron microscopic observations of the internal limiting membrane and optic fiber layer of the retina of the Rhesus monkey. *Am J Anat* 108, 179-197 (1961).
- 4 Ramón Cajal, S. *The Structure of the Retina.* (Charles Thomas, 1972).
- 5 Massey, S. in *Ryan Retina* Vol. 1 (ed Marbán) Ch. 4, 41-77 (Elsevier, 2009).
- 6 Strauss, O. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiol Rev* 85, 845-881 (2005).
- 7 Thumann G, H. S., Hinton DR. in *Retina* Vol. 1 (ed Marban Libros) Ch. 7, (2009).
- 8 Rawn. *Biochemistry.* (1989).
- 9 Chabre M, D. P. Molecular mechanism of visualtransduction. *Eur J Biochem.* 179, 255-266 (Eur J Biochem.).
- 10 Arshavsky VY, L. T., Pugh EN. G proteins andphototransduction. *Annu Rev Physiol.* 64, 153-187 (2002).
- 11 Prado-Serrano, C.-B., Sánchez-Fonseca. Fototransducción visual. *Rev. Mex. Oftalmol* 80, 340-346 (2009).
- 12 Hargrave. Rhodopsin structure, function, and topography the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42, 3-9 (2001).
- 13 Kono M, G. P., Crouch RK. 11-cis- and all-transretinols can activate rod opsin: rational design of visual cycle. . *Biochemistry* 47, 7567-7571 (2008).
- 14 Burns ME, A. V. Beyond counting photons: trials and trends in vertebrate visual transduction. *Neuron* 48, 387-401 (2005).
- 15 Baylor. Photoreceptor signals and vision. Proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 28, 34-49 (1987).
- 16 Alberts B, J. A., Lewis J, et al. *Molecular biology of the cell.* . (Garland Science, 2008).
- 17 Stryer L, B. H. Proteins: a family of signal transducers. . *Annu Rev Cell Biol* 2, 391-419 (1986).
- 18 Hodgkin AL, M. P., Nunn BJ. Measurement of sodium-calcium exchange in salamander rods. *J Physiol* 391, 347-370 (1987).
- 19 Nakatani K, Y. K. Calcium and magnesium fluxes across the plasma membrane of the toad rod outer segment. . *J Physiol.* 395, 695-729 (1988).
- 20 He W, C. C., Wensel TG. RGS9, a GTPase accelerator for phototransduction. *Neuron* 20, 95-102 (1998).
- 21 Bessant DA, K. S., Bhattacharya S. in *Adler's physiology of the eye* (ed Alm A Kaufman PL, eds) 358-380 (Elsevier, 2004).
- 22 Berger W, K.-G. B., Neidhardt J The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res* (2010).
- 23 Hwang YH, K. S., Kim YY, Na JH, Kim HK, Sohn YH. Optic nerve head, retinal nerve fiber layer, and macular thickness measurements in young patients with retinitis pigmentosa. *Curr Eye Res* 37, 914-920 (2012).
- 24 Schartman, J., Scott, I.U. *Ophthalmic Pearls: Retina. How to Manage Vision Loss in Retinitis Pigmentosa.*
- 25 den Hollander AI, e. a. CRB1 mutation spectrum in inherited retinal dystrophies. *Human Mutat* 5, 355-369 (2004).
- 26 Nao-i N, F. J., Sawada A. Retinitis pigmentosa with recurrent vitreous hemorrhage. *Acta Ophthalmol Scand* 74, 509-512 (1996).
- 27 Sieving PA, F. G. Refractive errors of retiniti pigmentosa patients. *Br J Ophthalmol* 62, 163-167 (1978).

- 28 Massof RW, F. D. Two forms of autosomal dominant primary retinitis pigmentosa. *Doc Ophthalmol* 51, 289-346 (1981).
- 29 Coco Martín, R. M., Navarro Alemany, R. in *Guías de Práctica Clínica de la SERV* Guía clínica para el diagnóstico diferencial y el manejo de las enfermedades hereditarias de la retina y la coroides. Vol. 4 50 (2009).
- 30 Retinitis pigmentosa with recurrent vitreous hemorrhage.
- 31 Jay, M. On the heredity of retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 66, 405-416 (1982).
- 32 RETNET. <<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet>> (
- 33 Wang D, C. P., Baun TM, et al. . Gene mutation in RP and their clinical implications. *Clinic Chimic Actt* 351, 5-16 (2005).
- 34 Bessant DA, A. R., Bhattacharya SS Molecular genetics and prospects for therapy of the inherited retinal dystrophies. *Curr Opin Genet Dev* 11, 307-316 (2001).
- 35 Barragan I, A. E.-A. M., Borrego S, El-Ashry MF, O'Driscoll C, Bhattacharya SS, Antinolo G. Linkage validation of RP25 Using the 10K genechip array and further refinement of the locus by new linked families. *Ann Hum Genet* 72, 454-462 (2008).
- 36 Mordes D, L. X., Kar A, Kuo D, Xu L, Fushimi K, Yu G, Sternberg P Jr and Wu JY. Pre-mRNA splicing and retinitis pigmentosa. *Mol Vis* 12, 1259-1271. (2006).
- 37 Vithana EN, A.-S. L., Allen MJ, Carey A, Papaioannou M, Chakarova C, Al-Magthteh M, Ebenezer ND, Willis C, Moore AT, Bird AC, Hunt DM and Bhattacharya SS. A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11). *Mol Cell* 8, 375–381 (2001).
- 38 McKie AB, M. J., Keen TJ, Tarttelin EE, Goliath R, van Lith-Verhoeven JJ, Greenberg J, Ramesar RS, Hoyng CB, Cremers FP, Mackey DA, Bhattacharya SS, Bird AC, Markham AF and Inglehearn CF. Mutations in the pre-mRNA splicing factor gene PRPC8 in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP13). *Hum Mol Genet* 10, 1555–1562 (2001).
- 39 Chakarova CF, H. M., Bolz H, Abu-Safieh L, Patel RJ, Papaioannou MG, Inglehearn CF, Keen TJ, Willis C, Moore AT, Rosenberg T, Webster AR, Bird AC, Gal A, Hunt D, Vithana EN and Bhattacharya SS. Mutations in HPRP3, a third member of pre-mRNA splicing factor genes, implicated in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* 11, 87–92 (2002).
- 40 Chen X, e. a. PRPF4 mutations cause autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet.* 23, 2926-2939 (2014).
- 41 Liu S, R. R., Vornlocher HP and Luhmann R. The network of protein-protein interactions within the human U4/U6.U5 tri-snRNP. *RNA* 12, 1418-1430 (2006).
- 42 Stanek, D. N., KM. The Cajal body: a meeting place for spliceosomal snRNPs in the nuclear maze. *Chromosoma* 115, 343-354 (2006).
- 43 Xia K, Z. D., Pan Q, Liu Z, Xi X, Hu Z, Deng H, Liu X, Jiang D, Deng H and Xia J. A novel PRPF31 splice-site mutation in a Chinese family with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Vis* 10, 361–365 (2004).
- 44 Cao H, W. J., Lam S et al. Temporal and tissue specific regulation of RP-associated splicing factor genes PRPF3, PRPF31 and PRPC8--implications in the pathogenesis of RP. . *PLoS One* 6 (2011).
- 45 McGee TL, D. M., Ott J, Berson EL, Dryja TP. Evidence that the penetrance of mutations at the RP11 locus causing dominant retinitis pigmentosa is influenced by a gene linked to the homologous RP11 allele. *Am J Hum Genet* 61, 1059-1066 (1997).
- 46 Vithana EN, A.-S. L., Pelosini L, Winchester E, Hornan D, Bird AC, Hunt DM, Bustin SA and Bhattacharya SS. Expression of PRPF31 mRNA in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa: a molecular clue for incomplete penetrance? *IOVS* 44, 4204-4209 (2003).
- 47 Deery EC, V. E., Newbold RJ, Gallon VA, Bhattacharya SS, Warren MJ, Hunt DM and Wilkie SE. Disease mechanism for retinitis pigmentosa (RP11) caused by mutations in the splicing factor gene PRPF31. *Hum Mol Genet* 11, 3209-3219 (2002).

- 48 Kuhn AN, R. E. a. B. D. Distinct domains of splicing factor Prp8 mediate different aspects of spliceosome activation. . *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 9145-9149 (2002).
- 49 Yuan L, K. M., Havlioglu N, Tang H and Wu JY. . Mutations in PRPF31 inhibit pre-mRNA splicing of rhodopsin gene and cause apoptosis of retinal cells. *J Neurosci* 25, 748-757 (2005).
- 50 Mordes D, Y. L., Xu L, Kawada M, Molday RS, Wu JY. Identification of photoreceptor genes affected by PRPF31 mutations associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Neurobiol Dis.* 26, 291-300 (2007).
- 51 Wilkie SE1, V. V., Wu H, Bujakowska K, Chakarova CF, Bhattacharya SS, Warren MJ, Hunt DM. Disease mechanism for retinitis pigmentosa (RP11) caused by missense mutations in the splicing factor gene PRPF31. *Mol Vis.* 18;14:683-90., 683-690 (2008).
- 52 MacDonald IM, S. Y., Sieving PA. Preventing blindness in retinal disease: ciliary neurotrophic factor intraocular implants. *Can J Ophthalmol* 42, 399-402 (2007).
- 53 Sanz MM, J. L., Ahuja S, Ekstrom PA, Romero J, van Veen T. Significant photoreceptor rescue by treatment with a combination of antioxidants in an animal model for retinal degeneration. *Neuroscience* 145, 1120-1129 (2007).
- 54 Maeda T, C. A., Maeda A, Golczak M, Aleman TS, Jacobson SG, Palczewski K. Loss of cone photoreceptors caused by chromophore depletion is partially prevented by the artificial chromophore pro-drug, 9-cis-retinyl acetate. *Hum Mol Genet* 18, 2277-2287 (2009).
- 55 Lamba DA, G. J., Reh TA. Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice. *Stem Cell* 4, 73-79 (2009).
- 56 Cideciyan AV, A. T., Boye SL, Schwartz SB, Kaushal S, Roman AJ, Pang JJ, Sumaroka A, Windsor EA, Wilson JM, Flotte TR, Fishman GA, Heon E, Stone EM, Byrne BJ, Jacobson SG, Hauswirth WW. Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15112-15117 (2008).
- 57 Bainbridge JW, S. A., Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N, Petersen-Jones S, Bhattacharya SS, Thrasher AJ, Fitzke FW, Carter BJ, Rubin GS, Moore AT, Ali RR. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. . *N Engl J Med* 358, 2231-2239 (2008).
- 58 Smith AJ, B. J., Ali RR. Prospects for retinal gene replacement therapy. . *Trends Genet* 25, 156-165 (2009).
- 59 Berson EL, e. a. Further Evaluation of Docosahexaenoic Acid in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A treatment: subgroup Analyses. *Arch Ophthalmol* 122, 1306-1314 (2004).
- 60 al, Y. H. e. Preservation of retinal morphology and functions in royal college surgeons rat by nilvadipine, a Ca(2+) antagonist. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 919-926 (2002).
- 61 Talcott KE, R. K., Sundquist SM, Lucero AS, Lujan BJ, Tao W, Porco TC, Roorda A, Duncan JL. Longitudinal study of cone photoreceptors during retinal degeneration and in response to ciliary neurotrophic factor treatment. *Invest ophthalmol Vis Sci* 6, 2219-2226 (2011).
- 62 Garita-Hernandez M., D.-C. F., Lukovic D., Gonzalez-Guede I., Diez-Lloret A., Valdés-Sánchez L., Massalini S., Erceg S., Bhattacharya S. Hypoxia Increases the Yield of Photoreceptors Differentiating from Mouse Embryonic Stem Cells and Improves the Modeling of Retinogenesis In Vitro. *Stem Cell* 31, 966–978 (2013).
- 63 Takashi K, T. K., Ohnuki M, Narita M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872 (2007).
- 64 Carr AJ, V. A., Hikita ST, Lawrence JM, et al. Protective effects of human iPSC-derived retinal pigment epithelium cell transplantation in the retinal dystrophic rat. *PLoS ONE* 4 (2009).

- 65 Seki T, Y. S., Oda M, Egashira T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell stem cell* 7, 11-14 (2010).
- 66 Jason S. Meyer, S. E. H., Kyle A. Wallace, Amelia D. Verhoeven, Lynda S. Wright, Elizabeth E. Capowski, Isabel Pinilla, Jessica M. Martin, Shulan Tian, Ron Stewart, Bikash Pattnaik, James Thomson, David M. Gamm. Optic Vesicle-like Structures Derived from Human Pluripotent Stem Cells Facilitate a Customized Approach to Retinal Disease Treatment. *Stem Cells* (2011).
- 67 Kusnyerik A, G. U., Wilke R, Gekeler F, et al. Positioning of electronic subretinal implants in blind retinitis pigmentosa patients through multimodal assessment of retinal structures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 48-55 (2012).
- 68 Kotecha A, Z. J., Stewart D and da Cruz L. The Argus II prosthesis facilitates reaching and grasping tasks: a case series. *BMC Ophthalmol.* 14 (2014).
- 69 al, R. S. e. The Argus II Retinal Prosthesis: 12-Month Outcomes from a Single-Study Center. *Am J Ophthalmol.* 157, 1282–1290 (2014).
- 70 Mihelec M, P. R., Robbie SJ, Buch PK, Azam SA, Bainbridge JW, Smith AJ, Ali RR. Long-term preservation of cones and improvement in visual function following gene therapy in a mouse model of leber congenital amaurosis caused by guanylate cyclase-1 deficiency. *Hum Gene Ther* 22, 1179-1190 (2011).
- 71 Roy K, S. L., Kaushal S. Ocular gene therapy: an evaluation of recombinant adeno-associated virus-mediated gene therapy interventions for the treatment of ocular disease. *Hum Gene Ther* 21, 915-927 (2010).
- 72 Cideciyan AV, J. S., Beltran WA, et al. Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 517-525 (2013).
- 73 Rakoczy EP, N. K. Gene therapy for eye as regenerative medicine? Lessons from RPE65 gene therapy for Leber's Congenital Amaurosis. *Int J Biochem Cell Biol* 56, 153-157 (2014).
- 74 Hastings ML, K. A. Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Curr Opin Cell Biol* 13, 302-309 (2001).
- 75 Makarova OV, M. E., Liu S, Vornlocher HP, Lührmann R. Protein 61K, encoded by a gene (PRPF31) linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa, is required for U4/U6*U5 tri-snRNP formation and pre-mRNA splicing. *The EMBO Journal* 21, 1148–1157 (2002).
- 76 Nottrott S, U. H. a. L. R. H. Clustered protein interactions with U4/U6 snRNA: a biochemical role for U4/U6 proteins. *EMBO J* 21, 5527-5538 (2002).
- 77 Sunbin Liu, e. a. Binding of the Human Prp31 Nop Domain to a Composite RNA-Protein Platform in U4 snRNP. *Science* 316 (2007).
- 78 Waseem NH, V. V., Webster A, Jenkins SA, Bird AC, Bhattacharya SS. Mutations in the gene coding for the pre-mRNA splicing factor, PRPF31, in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 1330-1334 (2007).
- 79 BIOBASE. *The Human Gene Mutation Database*, <<http://www.hgmd.cf.ac.uk>> (
- 80 Bujakowska, K., Lancelot, ME., Moskova-Doumanova, V., Waseem, N.H., Antonio, A., Sahel, J.A., Bhattacharyav, S., Zeitz, C. Prevalence and novelty of PRPF31 mutations in French autosomal dominant rod-Cone dystrophy patients and a review of published reports. . *BMC Medical Genetics* 11, 145 (2010).
- 81 Rio Frio T, e. a. Premature termination codons in PRPF31 cause retinitis pigmentosa via haploinsufficiency due to nonsense-mediated mRNA decay. *J Clin Invest* 108, 1519-1531 (2008).
- 82 Bujakowska, K., Maubaret, C., Chakarova, C.F., et al. Study of Gene-Targeted Mouse Models of Splicing Factor Gene Prpf31 Implicated in Human Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa (RP) *IOVS* 50, 5917-5933 (2009).
- 83 Fang Lu, e. a. A Novel PRPF31 Mutation in a Large Chinese Family with Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa and Macular Degeneration. *PLoS ONE* 8 (2013).

- 84 Novelli G, G. D. Genome medicine: gene therapy for the millenium. . *Pharmacogenomics*. 3, 15-18 (2002).
- 85 Flotte, T. Gene therapy: the first two decades and the current state-of-the-art. *JPhysiol*. 213, 301-305 (2007).
- 86 Anderson, W. F., Blaese, R.M., Culver, K. . *Human Gene Therapy*. (1990).
- 87 Blaese RM, C. K., Miller AD, Carter CS, et al. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA SCID .Initial Trial Results After 4 Years. *Science* 270, 475 - 480 (1995).
- 88 Newscientist. <<http://www.newscientist.com/article/dn3493-gene-therapy-may-switch-off-huntingtons.html>> (
- 89 Morgan RA, D. M., Wunderlich JR, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314, 126–129 (2006).
- 90 Abedia. <<http://www.abedia.com/wiley/index.html>> (
- 91 Braicu C, e. a. Dual Targeted Therapy with p53 siRNA and Epigallocatechingallate in a Triple Negative Breast Cancer Cell Model. *PLoS One* 10 (2015).
- 92 Briest F, G. P. The p53 network as therapeutic target in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Cancer Treat Rev* 21 (2015).
- 93 M, L. Protamine nanoparticles for improving shRNA-mediated anti-cancer effects. *Nanoscale Res Lett* 19 (2015).
- 94 Tangudu NK, e. a. RNA Interference using c-Myc-Conjugated Nanoparticles Suppresses Breast and Colorectal Cancer Models. *Mol Cancer Ther* (2015).
- 95 Li X, e. a. MicroRNA-449a Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis by Directly Repressing E2F3 in Gastric Cancer. *Cell Physiol Biochem* 35 (2015).
- 96 Fang CY, e. a. Inhibition of Human Bladder Cancer Growth by a Suicide Gene Delivered by JC Polyomavirus Virus-Like Particles in a Mouse Model. *J Urol*, doi:10.1016/j.juro.2015.01.084 (2015).
- 97 M., K. Replicating poxviruses for human cancer therapy. *J Microbiol* 53 (2015).
- 98 News, B. *Gene therapy first for poor sight.*, <<http://news.bbc.co.uk/1/hi/health/6609205.stm>.> (2007).
- 99 Pang JJ, e. a. Gene Therapy Restores Vision-Dependent Behavior as Well as Retinal Structure and Function in a Mouse Model of RPE65 Leber Congenital Amaurosis. *Mol Ther*. 13, 565-572. (2006).
- 100 Acland GM, e. a. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet*. 28, 92-95 (2001).
- 101 Maguire AM, S. F., Pierce EA, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358, 2240–2248 (2008).
- 102 Testa F, e. a. Three-Year Follow-up after Unilateral Subretinal Delivery of Adeno-Associated Virus in Patients with Leber Congenital Amaurosis Type 2. *Ophthalmology* 120, 1283-1291 (2013).
- 103 Nature. <<http://www.nature.com/news/2009/090916/full/news.2009.921.html>> (
- 104 Jiang Li, e. a. RNA interference gene therapy in dominant retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy mouse models caused by GCAP1 mutations. *Front Mol Neurosci* 7 (2014).
- 105 del Pozo-Rodriguez A, D. D., Solinís MA, et al. . Terapia génica: concepto, sistemas de administración y aplicaciones. . *Industria Farmacéutica*. 128 (2006).
- 106 Naik R, M. A., Ganguli M. Gene delivery to the retina: focus on non-viral approaches. *Drug Discov Today* 14, 306-315 (2009).
- 107 Rejman J, O. V., Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*, 1, 159-169 (2004).
- 108 Trapani I, P. A., Auricchio A. Vector platforms for gene therapy of inherited retinopathies. *Prog Retin Eye Res* 43, 108-128 (2014).
- 109 Adijanto J., N. M. I. Nanoparticle-based technologies for retinal gene therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm* (2015).
- 110 S., H. R. a. W. Viral Vectors for Gene Transfer: Current Status of Gene Therapeutics. *Handb Exp Pharmacol* 197, 143-170 (2010).

- 111 Robbinsa PD, G. S. Viral Vectors for Gene Therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 80, 35-47 (1998).
- 112 Ali RR, R. M., Thrasher AJ, Levinsky RJ, Kinnon C, Kanuga N, Hunt DM and Bhattacharya SS. Gene Transfer into the Mouse Retina Mediated by an Adeno-Associated Viral Vector. *Hum. Mol. Genet.* 5, 591-594 (1996).
- 113 Girod A, W. C., Zádori Z, et al. The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. . *The Journal of General Virology* 83, 973–978 (2002).
- 114 Nony P., C. G., Tessier J. et al. Evidence for Packaging of rep-cap Sequences into Adeno-Associated Virus (AAV) Type 2 Capsids in the Absence of Inverted Terminal Repeats: a Model for Generation of rep-Positive AAV Particles. *J. Virol.* 77, 776-781 (2003).
- 115 Tullis G. E., S. T. Efficient Replication of Adeno-Associated Virus Type 2 Vectors: a cis-Acting Element outside of the Terminal Repeats and a Minimal Size. *J. Virol.* 74, 11511–11521 (2000).
- 116 Nony P., T. J., Chadeuf G. Novel cis-Acting Replication Element in the Adeno-Associated Virus Type 2 Genome Is Involved in Amplification of Integrated rep-cap Sequences. *J. Virol.* 75, 9991–9994 (2001).
- 117 Muzyczka N, B. K. Parvoviridae: the viruses and their replication. *Fields virology* 2, 2327–2359 (2001).
- 118 Matsushita T, E. S., Elliger C, et al. Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Therapy* 5, 938–945 (1998).
- 119 Ku CA, C. V., Boye SL, Goldberg AF, Li T, Hauswirth WW, Ramamurthy V. Gene therapy using self-complementary Y733F capsid mutant AAV2/8 restores vision in a model of early onset Leber congenital amaurosis. *Hum Mol Genet* (2011).
- 120 Chung DC, L. V., Maguire AM. Recent advances in ocular gene therapy. *Curr Opin Ophthalmol* 20, 377-381 (2009).
- 121 Vandenberghe LH, e. a. Dosage thresholds for AAV2 and AAV8 photoreceptor gene therapy in monkey. *Sci Transl Med* 3 (2011).
- 122 Zaiss AK, L. Q., Bowen GP, Wong NC, Bartlett JS, Muruve DA. Differential Activation of Innate Immune Responses by Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors. *Journal of Virology* 76, 4580-4590 (2002).
- 123 Madsen, D. C., E.R.; O'Brien, T.; Johnson, P.A.; Mahon, B.P. Adeno-associated virus serotype 2 induces cell-mediated immune responses directed against multiple epitopes of the capsid protein VP1. *Journal of General Virology* 90, 2622-2633 (2009).
- 124 Stein L, R. K., Lei L, Kaushal S. Clinical gene therapy for the treatment of RPE65-associated Leber congenital amaurosis. *Expert Opin Biol Ther* 11, 429-439 (2011).
- 125 Uthra S, K. G. Gene therapy in ophthalmology. *Oman J Ophthalmol* 2, 108-110 (2009).
- 126 Bujakowska K., M. C., Chakarova C.F.,¹ Tanimoto N., Beck S.C., Fahl E., Humphries M.M.,⁴ Kenna P.F., Makarov E., & Makarova O., P.-D. F., Ekström P.A., van Veen T., Leveillard T., Humphries P., Seeliger M.W. and Bhattacharya S. Study of Gene-Targeted Mouse Models of Splicing Factor Gene Prpf31 Implicated in Human Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa (RP). *IOVS* 50, 5927-5933 (2009).
- 127 Graziotto J., F. M., Bujakowska K., Deramautd B, Zhang Q., Nandrot E., Inglehearn C., Bhattacharya S. and Pierce E. Three Gene-Targeted Mouse Models of RNA Splicing Factor RP Show Late-Onset RPE and Retinal Degeneration. *IOVS* 52, 190-198 (2011).
- 128 Pennesi ME., N. M. a. C. R. Animal models of age related macular degeneration. *Mol Aspects Med* 33, 487–509 (2012).
- 129 Farkas MH, L. D., Sousa ME, Bujakowska K, Chatagnon J, Bhattacharya SS, Pierce EA, Nandrot EF. Mutations in pre-mRNA processing factors 3, 8, and 31 cause dysfunction of the retinal pigment epithelium. *Am J Pathol* 184 (2014).
- 130 Alberts B., J. A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter. in *Molecular Biology of the Cell* Ch. 8, (Garland Science, 2002).

- 131 Distler, C. a. H., K.P. visual pathway for the optokinetic reflex in infant macaque
monkeys. *The Journal of Neuroscience* 31, 17659–17668 (2011).
- 132 Tabata H., S. N., Wada Y., Miura K., kawano K. Initiation of the optokinetic
response (OKR) in mice. *Journal of Vision* 10, 1-17 (2010).
- 133 Jellali Abdeljalil a, M. H. a., Ouagazzal Abdel-mouttalib a, Rousseau Ste´phane a,
Romand Raymond a, Auwerx Johan a, Sahel Jose´ b, Chambon Pierre a, Picaud
Serge. The optomotor response: A robust first-line visual screening method for
mice. *vision research* 45, 1439–1446 (2005).
- 134 Douglas R.M., e. a. Independent visual threshold measurements in the two eyes of
freely moving rats and mice using a virtual-reality optokinetic system. *Visual
Neuroscience* 22, 677–684, doi:10.1017/S0952523805225166 (2005).
- 135 Prusky G.T., A. N. M., Beekman S. and Douglas R.M. Rapid Quantification of Adult
and Developing Mouse Spatial Vision Using a Virtual Optomotor System.
Investigative Ophthalmology & Visual Science, 45, 4611-4616 (2004).
- 136 Frishman, L. J. in *Ryan Retina* Vol. 1 (ed Marb´an) Ch. 6, 95-124 (elsevier, 2009).
- 137 Yuan Y, e. a. Regulation of inwardly rectifying K⁺ channels in retinal pigment
epithelial cell by intracellular pH. *J Physiol* 549.2, 429-438 (2003).
- 138 Yi Sheng Zhong, J. W., WangMin Liu, YiHua Zhu. Potassium ion channels in retinal
ganglion cells (Review). *molecular medicine reports* 8, 311-319 (2013).
- 139 Yang D., e. a. Expression of Kir7.1 and a novel Kir7.1 splice variant in native
human retinal pigment epithelium. *experimental eye research* 86 (2008).
- 140 Lai, T. Y., Manthur, R., Wu, L. *Clinical visual electrophysiology*. (Bon Vision
Limited, 2008).
- 141 Mu˜noz Negrete, F. J., Rebolleda Fern´andez, G., D´ıaz Llopis, M. in *Tomograf´ıa de
coherencia ´optica* (ed Sociedad Espa˜nola de Oftalmolog´ıa) Ch. 1, 27-38 (2011).
- 142 Pakhomova ON, e. a. Oxidative effects of nanosecond pulsed electric field
exposure in cells and cell-free media. *Arch Biochem Biophys* 527, 55-64 (2012).
- 143 CE, R. The dark side of light: rhodopsin and the silent death of vision the proctor
lecture. *IOVS* 46, 2671-2682 (2005).
- 144 Grimm C, R. C. Light damage as a model of retinal degeneration. *Methods Mol
Biol.* 935, 87-97 (2013).
- 145 Cachafeiro M, B. A., Samardzija M,. Hyperactivation of retina by light in mice leads
to photoreceptor cell death mediated by VEGF and retinal pigment epithelium
permeability. *Cell Death Dis.* 4 (2013).
- 146 Mc. Lure C, e. a. Production and Titering of Recombinant Adeno-associated Viral
Vectors. *J Vis Exp* 57 (2011).
- 147 Chang B, e. a. Retinal degeneration mutants in the mice. *Vision Res.* 42, 517-525
(2002).
- 148 Ufret-Vicenty R:, e. a. Transgenic mice expressing variants of complement factor H
develop AMD-like retinal findings. *IOVS* 51, 5878-5887 (2010).
- 149 Vessey KA, e. a. Assesment of retinal function and morphology in aging Ccl2
Knockout mice. *IOVS* 56, 1238-1252 (2015).
- 150 Mattapallil MJ, W. E., Chan CC, et al. The Rd8 mutation of the Crb1 gene is
present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and
confounds ocular induced mutant phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17, 2921-
2927 (2012).
- 151 al., A. J. M. e. *Optica fisiol´ogica. Psicof´ısica de la visi´on*. 1^o edn, (Interamericana.
Mc.Graw-Hill, 1995).
- 152 W.J., B. *Borisch’s Clinical Refraction*. (W.B. Saunders Company, 1998).
- 153 Sengupta S, v. L. S., Solomon SD, et al. Driving habits in older patients with central
vision loss. *Ophthalmology* 121, 727-732 (2014).
- 154 van Landingham SW, M. R., Chan E, et al. Fear of falling in age-related macular
degeneration. *BMC Ophthalmol.* 14 (2014).
- 155 Hu P, e. a. Aryl hydrocarbon receptor deficiency causes dysregulated cellular
matrix metabolism and age-related macular degeneration-like pathology. *PNAS*,
4069-4078 (2013).

- 156 Kim SY, e. a. Deletion of Aryl Hydrocarbon Receptor AHR in Mice Leads to Subretinal Accumulation of Microglia and RPE Atrophy. *IOVS* 55, 6031-6040 (2014).
- 157 Gabriele M.I., I. H., Schuman J.S., et al. Reproducibility of Spectral-Domain Optical Coherence Tomography Total Retinal Thickness Measurements in Mice. *IOVS* 51, 6519-6523 (2010).
- 158 Ferguson L.R., D. J. M., Balaiya S., et al. Retinal Thickness Normative Data in Wild-Type Mice Using Customized Miniature SD-OCT. *PlosOne* (2013).
- 159 LE., A. in *La mácula, cambios degenerativos* (ed Glosa) Ch. VII, (2007).
- 160 Wu Z, L. C., Ayton LN, Goh JK, Lucci LM, Hubbard WC, Hageman JL, Hageman GS, Guymer RH. Optical coherence tomography-defined changes preceding the development of drusen-associated atrophy in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 121, 2415-2422 (2014).
- 161 Sparrow JR, D. T. Fundus Autofluorescence and RPE Lipofuscin in Age-Related Macular Degeneration. *J Clin Med*. 3, 1302-1321 (2014).
- 162 Lakkaraju A, F. S., Rodriguez-Boulan E. The lipofuscin fluorophore A2E perturbs cholesterol metabolism in retinal pigment epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11026-11031 (2007).
- 163 Spaide RF, C. C. Drusen characterization with multimodal imaging. *Retina* 30, 1441-1454 (2010).
- 164 Group, A.-R. E. D. S. R. The Age-Related Eye Disease Study Severity Scale for Age-Related Macular Degeneration. . 1484–1498 (*Arch Ophthalmol*, 2005).
- 165 Friberg TR, B. R., Brennen PM. Analysis of the relationship between drusen size and drusen area in eyes with age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 42, 369-375 (2011).
- 166 Ambati J, A. A., Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, Rollins BJ, Ambati BK. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl2- or Ccr2-deficient mice. *Nat Med*. 9, 1390-1397 (2003).
- 167 Dong Z, L. J., Leng Y, Sun X, Hu H, He Y, Tan Z, Ge J. Cyclic intensive light exposure induces retinal lesions similar to age-related macular degeneration in APPsw/PS1 bigenic mice. *BMC Neurosci* 24 (2012).
- 168 Marc RE, e. a. Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration. *Mol Vis* 14, 782-805 (2008).
- 169 Tan E, D. X., Saadi A, Agarwal N, et al. Expression of cone-photoreceptor-specific antigens in a cell line derived from retinal tumors in transgenic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 764-768 (2004).
- 170 Rapp M, W. G., Al-Ubaidi MR, Becerra SP, Subramanian P. Pigment epithelium-derived factor protects cone photoreceptor-derived 661W cells from light damage through Akt activation. *Adv Exp Med Biol* (2014).
- 171 Perusek L., M. T. Vitamin A Derivatives as Treatment Options for Retinal Degenerative Disease. *Nutrients* 5, 2646-2666 (2013).
- 172 Fletcher EL, J. A., Greferath U. Studying Age-Related Macular Degeneration Using Animal Models. *Optom Vis Sci*. 91, 878-886 (2014).
- 173 Ramkumar HL, Z. J., Chan CC. Retinal ultrastructure of murine models of dry age-related macular degeneration (AMD). *Prog Retin Eye Res*. 29, 169-190 (2010).
- 174 Hollanders K, V. B. T., Kindt N, Castermans K, Leysen D, Vandewalle E, Moons L, Stalmans I. The effect of AMA0428, a novel and potent ROCK inhibitor, in a model of neovascular age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 56, 1335-1348 (2015).
- 175 Stiles M, M. A., Budda M, et al (ARVO, 2015).
- 176 Hoh Kam J, L. A., Begum R, Cunea A, Jeffery G. Topical cyclodextrin reduces amyloid beta and inflammation improving retinal function in ageing mice. *Exp Eye Res*. 135, 59-66 (2015).
- 177 Hamel C, G. J., Lasquelles L, et al. Retinal dystrophies caused by mutations in RPE65: assessment of visual functions. *Br J Ophthalmol* 85, 424-427 (2001).

- 178 Grune T, J. T., Merker K, Davies KJ. Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease *Int J Biochem Cell Biol.* 36, 2519-2530 (2004).
- 179 Hauswirth WW, A. T., Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L, Conlon TJ, Boye SL, Flotte TR, Byrne BJ, Jacobson SG. Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Human Gene Ther* 19, 979-990 (2008).
- 180 AV, C. Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy. *Prog Retin Eye Res* 29, 398-427 (2010).
- 181 Carvalho LS, V. L. Promising and delivering gene therapies for vision loss. *Vision Res* 111, 124-133 (2015).
- 182 Luhmann U, R. S., Munro P, et al. The drusen-like phenotype in aging Ccl2 knockout mice is caused by an accelerated accumulation of swollen autofluorescent subretinal macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50, 5934–5943 (2009).
- 183 Gouras P, I. L., Mattison JA, Ingram DK, Neuringer M. Drusenoid maculopathy in rhesus monkeys: autofluorescence, lipofuscin and drusen pathogenesis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 246, 1403-1411 (2008).
- 184 Bainbridge JWB, M. M., Sundaram V, et al. Long-Term Effect of Gene Therapy on Leber's Congenital Amaurosis. *N Engl J Med* 372, 1887-1897 (2015).
- 185 Jacobson SG, C. A., Ph.D., Roman AJ, et al Improvement and Decline in Vision with Gene Therapy in Childhood Blindness. *N Engl J Med* 372, 1920-1926 (2015).

7. ANEXOS

ANEXO I: GENOTIPADO DE LOS RATONES

A) Genotipado para detectar la mutación *Prpf31*^{A216P/+}KI y *Prpf31*^{-/-}KO:

Las secuencias de los cebadores que se utilizaron para KI son:

- Directo: AGT GTC ACT GCC TCT ACT ACC CAG
- Reverso: AGC CGC TCT AGC TCC TCA TC

Para genotipar a los modelos KO son:

- Directo: CTC CTG AGT ACC GAG TCA TTG TGG ATG C
- Reverso: GTA GAA GAG AAG CCA GAC AGG GTC TTG C

Preparación de la mezcla para la PCR:

- 1 µl de ADN genómico
- 2 µl del tampón (10x) para la reacción de PCR
- 0.4 µl de cebador directo
- 0.4 µl de cebador reverso
- 0.1 µl de mytaq polimerasa
- Hasta 10 µl de agua de grado biología molecular.

Se agita la mezcla unos segundos. Se colocan los tubos en el termociclador.

Programa para la PCR:

- 95°C → 15 min.
 - 95°C → 45 sec.
 - 62°C → 1 min.
 - 72°C → 3 min.
 - 72°C → 10 min.
 - 4°C → ∞
- } 40 ciclos

Y el producto de PCR esperado:

- Banda de 250 pb en los KI y de 400 pb en los WT
- Banda de 2500 pb en los KO y de 3500 pb en los WT

B) Genotipado para descartar la mutación *Crb1*^{rd8}:

Las secuencias de los cebadores que se utilizaron para descartar la mutación son:

- Directo 1: GTG AAG ACA GCT ACA GTT CTG ATC
- Reverso: GCC CCA TTT GCA CAC TGA TGA C

Las secuencias de los cebadores que se utilizaron para detectar la mutación son:

- Directo 2: GCC CCT GTT TGC ATG GAG GAA ACT TGG AAG ACA GTC ACA GTT CTT CTG
- Reverso: GCC CCA TTT GCA CAC TGA TGA C

Preparación de la mezcla para la PCR:

- 1.5µl de ADN genómico
- 2 µl del tampón (10x) para la reacción de PCR
- 0.6µl de cebador directo 1 o bien 0.3 µl de cebador directo 2.
- 0.6µl de cebador reverso
- 0.1 µl de mytaq polimerasa
- Hasta 10 µl de agua de grado biología molecular.

Se agita la mezcla unos segundos. Se colocan los tubos en el termociclador.

Programa para la PCR:

- 94°C → 5 min.
 - 94°C → 30 sec.
 - 65°C → 30 sec.
 - 72°C → 30 sec.
 - 72°C → 7 min.
 - 4°C → ∞
- } 35 ciclos

Y el producto de PCR esperado:

- Banda de 244 pb en los rd8
- Banda de 220 pb en los WT

ANEXO II: HISTOLOGÍA

En primer lugar fijamos los ojos disecados en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PBS), 24 horas a 4°C.

Posteriormente se procedió con la crioprotección del tejido mediante la inclusión en PBS + Sacarosa al 20% donde estuvieron 24 horas a 4°C, después se incluyeron en PBS + Sacarosa al 30% donde estuvieron 24 horas a 4°C y por último otras 24 horas a 4°C en PBS + Sacarosa 30% y OCT (gel crioprotector) en proporción 1:1. Una vez el tejido está crioprotectado se incluyó en OCT, en un molde y se congeló con hielo seco, formándose un bloque sólido que nos permitió realizar cortes 18 µm de espesor en criostato. De cada ojo se fueron haciendo 5 series recogidas en portaobjetos superfrost de máxima adherencia.

A continuación las muestras fueron teñidas con diferentes técnicas.

A) Protocolo de tinción con hematoxilina y eosina:

Para la realización de esta técnica, los cortes se dejaron secar a temperatura ambiente para que quedasen bien adheridos al portaobjeto. Una vez secos se hidrataron en agua 30 minutos, y se introdujeron un minuto en colorante eosina (MERCK) y otro minuto en colorante hematoxilina (MERCK), y posteriormente, se deshidrataron y diferenciaron su coloración en una batería de alcoholes ascendente hasta etanol 100%. Finalmente se sumergieron los portaobjetos en Xilol y se montaron con resina (EUKITT, O. KindlerHmbG y CO, Freiburg).

B) Protocolo para la tinción con la técnica de filipina

- Azul filipino: Sigma (F-9765)
- Stock: 25 mg/ml en DMSO
- Solución de trabajo: 0,05 mg/ml en PBS/10% FBS

En primer lugar se lavan las células 3 veces con PBS. A continuación se fijan con paraformaldehído al 3% durante una hora a temperatura ambiente. Volvemos a lavar las células 3 veces con PBS. Posteriormente las incubamos con 1 ml de glicina 1,5mg/ml PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, para enfriar el paraformaldehído. A continuación se tiñen las células con 1 ml de la solución de trabajo durante 2 horas a temperatura ambiente. De nuevo se lavan las células 3 veces con PBS.

Podemos visualizar las células en PBS con un microscopio de fluorescencia utilizando un filtro UV (excitación 340- 380 nm y filtro de paso largo de 430 nm).

Debemos tener en cuenta que esta tinción se blanquea muy rápidamente y debe protegerse de la exposición a la luz.

C) Protocolo de inmunofluorescencia:

Se permeabilizan las células con PBS + tritón 0.2% (PBS-T 0.2%) + el suero del animal donde esté hecho el anticuerpo secundario.

Tras 30 minutos lavamos con PBS 3 veces y se incuban con los anticuerpos primarios que van diluidos en el mismo PBS-T 0.2%. Dejamos toda la noche.

Lavamos de nuevo 3 veces con PBS y se incubó el anticuerpo secundario en PBS-T una hora a temperatura ambiente. Todos los secundarios empleados son Alexa Fluor (Molecular Probes).

De nuevo lavamos con PBS 3 veces. A continuación deshidratamos las células con etanol 70% y dejamos secar 3 minutos.

Montaje con medio protector de la fluorescencia con DAPI (Vectashiel with Dapi, H-1200, VECTOR).

Cada uno de los anticuerpos que se utilizó se hizo en una concentración diferente y con un anticuerpo secundario distinto, según fuesen monoclonales o policlonales.

Anti-laminina: (SIGMA) (1:250)

Anticuerpo policlonal usado como marcador específico de membranas.

Secundario: Donkey-antirabbit 633 (1:500)

Anti-RPE65: (Abcam) (1:100)

Anticuerpo monoclonal contra la proteína RPE65 específica del EPR.

Secundario: Donkey-antimouse 488 (1:500)

Anti-Kir7.1: (Alomone) (1:100)

Anticuerpo policlonal específico del canal de cloro kir 7.1 situado en la membrana de las células del RPE.

Secundario: Donkey-antirabbit 488 (1:500)

Anti-Opsina LM: (Millipore) (1:250)

Anticuerpo policlonal específico para la Opsina LM empleada para marcar los conos de la retina.

Secundario: Donkey-antirabbit 488 (1:500)

Anti-rodopsina (Abcam) (1:250)

Anticuerpo monoclonal específico para detectar la Rodopsina como proteína específica de los bastones en la retina.

Secundario: Donkey-antimouse 633 (1:500)

ANEXO III: WESTERN BLOT

Extracción de proteínas:

En primer lugar se extraen las proteínas en frío, utilizando tampón RIPA (NaCl 150 mM, tritón x 100 1%, Deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, 50 mM Tris, pH8) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (10 µl de inhibidor/ 1 ml RIPA). Para un pellet de 10^6 células se añaden 100 µl de tampón, se homogeniza por agitación en vortex durante 1 min. Se deja en hielo durante 5 minutos y se separa el extracto de proteínas de los restos celulares por centrifugación en microcentrífuga a 12.000 rpm a 4°C durante 20 minutos. Se pasa el sobrenadante a un tubo limpio, que mantendremos en frío y descartamos el pellet. Las muestras se conservan congeladas a -80°.

Cuantificación:

El contenido de proteína se mide por el ensayo de Bradford: Se preparan dos réplicas de cada muestra a distintas diluciones y se mezclan con el reactivo de Bradford, lo que genera una coloración en las soluciones proporcional a la cantidad de proteína. Se mide la absorbancia en un espectrofotómetro y se comparan los datos con una recta patrón que se obtiene de las medidas de distintas diluciones de una solución de albúmina (BSA).

En concreto, para preparar las diluciones se distribuyen en columnas de una microplaca de 96 pocillos:

- Recta patrón: diluciones BSA/H₂O_d (0/80, 5/75, 15/65, 20/60)
- Dilución A: 2µl de muestra + 18 µl de H₂O_d
- Dilución B: 2 µl de A: 78 µl de H₂O_d (por duplicado)
- Dilución C: 5µl de A + 75 µl de H₂O_d (por duplicado)

Se añaden 120 µl de reactivo de Bradford a todos los pocillos de la recta patrón y a las diluciones B y C, que son los que se medirán en el espectrofotómetro.

Preparación de las muestras para la electroforesis:

Se incuban a 96° C durante 5 minutos 30µg de proteína de cada muestra a analizar con tampón de carga SDS-laemli, que contiene SDS, beta-mercaptoetanol y azul de bromofenol en tampón Tris. Este proceso desnaturaliza todos los polipéptidos que componen la muestra antes de comenzar su separación en el gel. Las muestras se calientan 95°C y se centrifugan.

Electroforesis de proteínas:

La separación de proteínas se realiza en geles de acrilamida en gradiente de 4 – 20% (Biorad), cargando 30µg de muestra por carril. Se somete al gel a 150 V de corriente continua hasta que la línea que corresponde al azul de bromofenol de las muestras llega al final del mismo.

Transferencia, blot y revelado:

El patrón de bandas generado por la electroforesis se transfiere a una membrana de PVDF en un sistema de transferencia semi-seca preparando un “sándwich” de papel/gel/membrana/papel humedecido con el tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl, pH 7.6 y 192 mM glycina) que colocamos entre los electrodos positivo y negativo, con la membrana hacia el lado positivo. Se somete a una corriente de 25V durante 10 min.

A continuación se bloquean los sitios libres de la membrana incubando con el tampón Superblock (Thermo) a 4°C durante 1 hora.

En siguiente lugar, y tras lavar la solución de bloqueo, se incuba la membrana con el anticuerpo primario a 1 mg/ml durante 15 horas a 4°C.

Se lava con PBS-0.1% de Tween-20 y se incuba con el anticuerpo secundario conjugado con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente.

Volvemos a lavar y ya podemos proceder al revelado por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL plus (Amersham). El resultado se registra sobre una película fotográfica.

Los anticuerpos primarios y secundarios que utilizamos fueron:

- Anti-PRPF31. Dilución 1:1000
- Anti-Flag. Dilución 1:1000
- Anti-GFP. Dilución 1:4000
- HRP anti-mouse. Dilución 1:20.000
- HRP anti-rabbit. Dilución 1:20.000

ANEXO IV: CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES VIRALES

En este proyecto se utilizó el vector pAAVIREs-hrGFP (AAV2-hrGFP) (Agilent Technologies, Catálogo # 240075) para la clonación del gen de interés *PRPF31* (AAV2-*PRPF31*).

El vector pAAV-IRES-hrGFP contiene el promotor de citomegalovirus (CMV) y otros elementos para la expresión de genes a un alto nivel en células de mamífero. El vector también contiene ITR para la replicación y ensamble viral además de contener una casete de expresión dicistrónico para la expresión de la proteína verde fluorescente recombinante humanizada (hrGFP). La secuencia que codifica la proteína PRPF31 humana se obtuvo a partir de un plásmido preparado previamente en nuestro laboratorio (pEGFP-C1-*PRPF31*), y se clonó en el sitio de clonación múltiple del AAV2-hrGFP, utilizando los sitios de restricción BamHI y XhoI. Además, la secuencia del *PRPF31* por su C-terminal se fusionó a la secuencia de FLAGx3, por lo que la sobreexpresión inducida por la infección del virus pudo ser detectada con un anticuerpo anti-FLAG, manteniendo también la señal de hrGFP.

Para la producción del AAV se necesitó una transfección triple con la construcción AAV2-*PRPF31* junto con dos plásmidos auxiliares (RC y Helper) que reúnen todos los genes virales necesarios para el empaquetamiento de las partículas del virus. La línea celular necesaria para el embalaje viral es la AAV-293. Estas células se derivan de la HEK293 (células embrionarias de riñón humano) que han sido transformadas con DNA de adenovirus tipo 5 que expresan en forma estable el gen E1 en trans y permiten la producción de partículas virales cuando las células son co-tranfectadas con los tres plásmidos del AAV Helper-Free System.

ANEXOV: CULTIVO CELULAR, PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS VECTORES VIRALES

A) CULTIVO

Se cultivaron a partir de un stock de células congeladas.

Medio de cultivo:

- DMEM F2 (SIGMA®)
- Suero bovino fetal (FBS) 10%
- L-glutanina 1%
- Penicilina/estreptomina 1%

1. Se descongela cada criovial en un baño a 37°C.
2. Se transfiere la suspensión celular del criovial a un tubo tipo "Falcon" de 15 ml con 10 ml de medio.
3. Se centrifuga a 200g, 3 minutos a temperatura ambiente (RT).
4. Se aspira el medio y se re-suspende el pellet en 5 ml de medio pipeteando sutilmente.
5. Se transfieren los 5 ml de la suspensión celular a un frasco de 75 cm² conteniendo 10 ml de medio y se coloca en el incubador a 37°C a 5% de CO₂.
Se controla diariamente la densidad de crecimiento celular. Se debe realizar el pase de células cuando se encuentran, aproximadamente, al 50% de confluencia.

B) PASE DE AAV-293

1. Precalear el medio, PBS y Tripsina-EDTA (0.05% tripsina y 0.53 mm EDTA, Gibco® 15400 diluida 1:10 en PBS).

2. Se aspira el medio del frasco de 75 y se lava una vez con 10 ml de PBS suavemente.

3. Se colocan 5 ml de la solución tripsina-EDTA durante 3 minutos y seguidamente se inactiva la tripsina con 5 ml de medio.

4. Se transfieren 2 ml de la suspensión celular a 5 frascos de 175 cm² conteniendo 28 ml de medio y se coloca en el incubador.

C) PREPARACIÓN DE AAV-293 PARA LA TRANSFECCIÓN

(Agilent Technologies, Catálogo # 240073).

1. Asegurarse de que la confluencia este alrededor de 50%.

2. Pre-calear el medio 10% FBS-DMEM, PBS, tripsina-EDTA.

3. Aspirar el medio del frasco de 175 cm² y lave una vez con 10 ml de PBS dejando que se deslice suavemente por las paredes del frasco para evitar que despeguen las células.

4. Colocar 10 ml de la solución de tripsina-EDTA por 1 a 3 min.

5. Inactivar la tripsina con 10 ml de medio Y transferir los 20 ml de la suspensión celular a un Falcon de 50 ml. Agregar el contenido de 20 ml de otra fiola.

6. Centrifugar a 200 x g por 10 min a RT, aspirar el medio y resuspender el pellet en 25 ml de medio fresco.

7. Repetir los pasos 1 al 6 con otras dos fioles de 175 cm² y reunir la suspensión final en un solo Falcon de 50 ml.

8. Contar el número de células y anotar para futuras referencias. Sembrar 5 ml de suspensión celular en una placa de 15 cm conteniendo 15 ml de medio fresco. (En total 10 placas de 15 ml, 5 placas por 2 fioles de 175 cm²). Incubar a 37°C por 48 h hasta que estén confluentes al 70-80%.

D) TRANSFECCIÓN

1. Tres horas antes de la trasfección aspirar el medio y coloque 15 ml de Iscove's modified Dulbecco's médium (IMDM) con 5% de FBS y antibióticos.

2. Diluir cada plásmido pAAV-RC, pAAV-Helper, pAAV-EGFP y pAAV-*Prpf31* en TE buffer pH 7.5 para una concentración final de 1 µg/µl.

3. Para 5 placas de 15cm preparar la siguiente solución en un tubo Falcon de 15 ml (uno para AAV-EGFP y otro para AAV-*Prpf31*):

- o 12 mL de dH₂O
- o 1650 µL 2.5 M CaCl₂
- o 75 µL pAAV-RC
- o 75 µL pAAV-Helper
- o 75 µL pAAV-EGFP o pAAV-PRPF31

4. Esterilizar por filtración y transferir cada solución a un tubo Falcon de 50 ml por separado.

5. Colocar en el vortex y agregar rápidamente 13 ml de 2 x HEPES buffer (pH 7.05) (modificación 2 x HBS buffer pH 7,10) y continuar agitando en el vortex por 15 segundos. Dejar reposar 1 minuto y 45 segundos (un precipitado blando se formará).

7. Agregar 5 ml a cada placa de 15 cm esparcidos y agitando suavemente.

8. Incubar 16 h y luego aspirar el medio y coloque 15 ml de 10% FBS DMEM fresco. Dejar en incubación hasta un total de 72 h post-transfección.

E) RECOLECCIÓN DEL VIRUS

1. Aspirar el medio y lavar una vez con 10 ml de PBS.

2. Agregar 10 ml de PBS y separar las células con un rastrillo. Colocar la suspensión celular en un Falcon de 50 ml.

3. Centrifugar a 800 x g durante 10 minutos.

4. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 50 ml de 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8,0.

5. Separar la solución en 2 tubos Falcon de 50 ml (25 ml en cada uno) y agregar 1.25 ml de 10% oxicolato de sodio (Sigma, D5670®) en dH₂O (fc de 0.5%) en cada Falcon. Luego agregue benzonasa-nucleasa 50U/ml (Sigma, E1014 a 361 U/µl).

6. Incubar a 37°C una hora.

7. Centrifugar a 3000 g durante 15 minutos y filtre el sobrenadante por sistema de filtración de 0.2 µm de poro y colocar todo el filtrado en un Falcon de 50 ml.

Los tubos se pueden guardar a -20°C o directamente pasar al paso de purificación.

F) PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN

La concentración y purificación de los vectores se realizó por columnas de heparina (Sigma Aldrich, Catálogo # 54836).

1. Instale las columnas de heparina HiTrap unidas a una bomba peristáltica ajustada para un flujo de 1 ml por minuto.

2. Equilibre las columnas con 10 ml 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8.0 evitando la acumulación de burbujas.
3. Aspirar los 50 ml de la solución viral.
4. Lavar las columnas con 20 ml de 100 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8.0.
5. Con una jeringa de 5 ml continúe lavando la columna con 1 ml 200 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8.0, seguido por 1 ml de 300 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8.0.
6. Eluir el virus conectando una jeringa de 5 mL y con presión moderada agregar un gradiente creciente de NaCl:
 - 1.5 ml 400 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8.0
 - 3.0 ml 450 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8.0
 - 1.5 ml 500 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8.0
7. Recolecte los 6 ml en un Falcon de 15 ml.
8. Concentre el virus utilizando un filtro Amicon ultra-4 de centrifuga de poro para 100.000 Da de peso molecular.
9. Coloque 4 ml de la suspensión viral y centrifugue a 2000 x g por 2 min.
10. Agregue los 2 ml del volumen restante de la suspensión viral y centrifugue de nuevo.
11. Aproximadamente 50 µl deben quedar en el reservorio.
12. Agregue 450 µl de PBS y aspire el contenido del reservorio.
13. Hacer alícuotas de 15 µl (16) y 50 µl (5) guardar a -80°C.

ANEXO VI: CUANTIFICACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES

Para realizar la titulación de las partículas virales se transfectó la línea celular AAV-HT1080 (Agilent Technologies, Catálogo # 240109) y la titulación se calculó midiendo la fluorescencia de hrGFP por citometría de flujo con el kit “QuickTiter™ AAV Quantitation Kit”(catálogo # VPK-145):

1. Mezclar 13.5 µl de muestra de AAV purificados con 1.5 µl de solución C 10x de QuickTiter™ en un tubo e incube una hora a 75°C. Agite unos segundos para acumular la condensación. Incube 20 minutos a temperatura ambiente.

2. Prepare una muestra control no calentada mezclando 13.5 µl de la misma muestra de AAV purificados y 1.5 µl de solución C 10x de QuickTiter™ en un tubo.

3. Transfiera 10 µl de las muestras, incluyendo el control, en una placa de microtitulación adecuada para leerse en un fluorómetro. Añada 90 µl de 1x tinte CyQuant® GR recién preparado a cada pocillo que contenga los 10 µl de sobrenadante. Lea la placa con un lector de fluorescencia usando un filtro de 480/520 nm.

Calcule el título de AAV en función de la curva estándar:

1. Determine la cantidad de ADN AAV-2:

a) Calcule la URF (unidad relativa de fluorescencia) neta:

URF Neta = URF (muestra viral) – RFU (control negativo correspondiente a la muestra viral)

b) Use la curva estándar para determinar la cantidad de ADN viral de cada muestra.

2. Titulado viral:

El tamaño aproximado del genoma de un AAV-2 es 5000 bases, por ello:

$1\text{ng AND AAV-2} = (1 \times 10^{-9})\text{ g} / (5000\text{ bases} \times 330\text{ g/bases}) \times 6 \times 10^{23} = 3.6 \times 10^8\text{ GC}$

La fórmula para muestras purificadas es:

Titulado (GC/ml) = [Factor de dilución x ADN AAV-2 (ng) x (3.6 x 10⁸ GC/ng) x (15 µL/13.5 µL)]/0.010 ml

ANEXO VII: EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE EGFP Y Prpf31 EN CULTIVOS CELULARES 661W Y HT1080

A) PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS PERMISIVAS

1. Sembrar las células AAV-HT1080 a una densidad de $1,5 \times 10^5$ células/cm² en 0,2 ml de medio DMEN con 10% FBS en placas de 96 pocillos. Asegurar que las células se extienden equitativamente para un titulado preciso.

2. Incubar a 37°C toda la noche. Las células deben encontrarse a un 50% de confluencia antes de proceder a la transfección.

B) DILUCIÓN Y APLICACIÓN DEL STOCK VIRAL CON EGFP-PRPF31 Y CON EGFP SÓLO

1. Diluir cada stock viral de 50µl en 2ml de DMEN sin FBS

2. Tratar las células con 20 µL de PBS (control negativo) o con el mismo volumen de una suspensión viral conteniendo la construcción control de AAV2-GFP 1×10^9 pv/mL o AAV2-PRPF31 1×10^9 pv/mL. Dejar un stock sin virus para el control positivo.

3. Incubar a 37°C durante 1 o 2 horas. Agite con movimientos circulares las placas cada 30 minutos durante la incubación.

4. Añadir 1 ml de H-DMEN al 18% previamente calentado en cada pocillo. Incubar a 37°C durante 40 a 48 horas.

C) DETECCIÓN DE LAS CÉLULAS INFECTADAS

A continuación se realiza el test de viabilidad/citotoxicidad con el kit Apo Tox-Glo™ Triplex Assay (Promega, G6321, Madison, WI):

1. Añada 20µl del reactivo de viabilidad/citotoxicidad (control positivo: Ionomicina 100 µM) conteniendo los sustratos GF-AFC y bis-AAF-R110 a cada pocillo y mezcle brevemente mediante un movimiento de agitación circular (300–500 rpm, 30 segundos).

2. Incube 30-60 minutos a 37°C.

3. Mida la fluorescencia a las siguientes longitudes de onda:

- Viabilidad:
Excitación: 400nm. Emisión: 505nm.
- Citotoxicidad:
Excitación: 485 nm. Emisión: 520 nm.

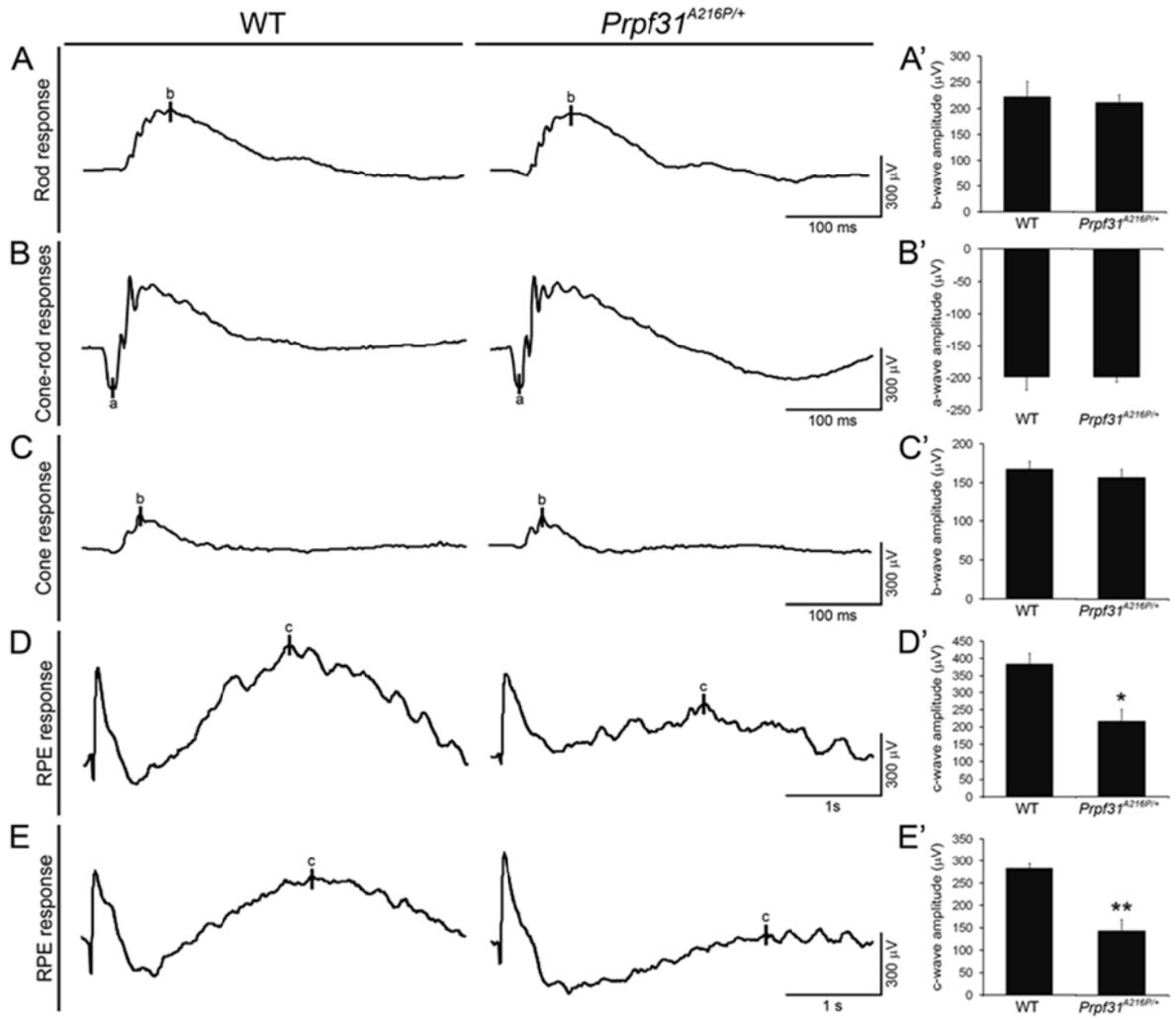
4. Añada 100µl del reactivo Caspasa-Glo® 3/7 a cada pocillo (control positivo: Estaurosporina 10 µM), y mezcle brevemente mediante un movimiento de agitación circular (300–500 rpm, 30 segundos).

5. Incube 30 minutos a temperatura ambiente.

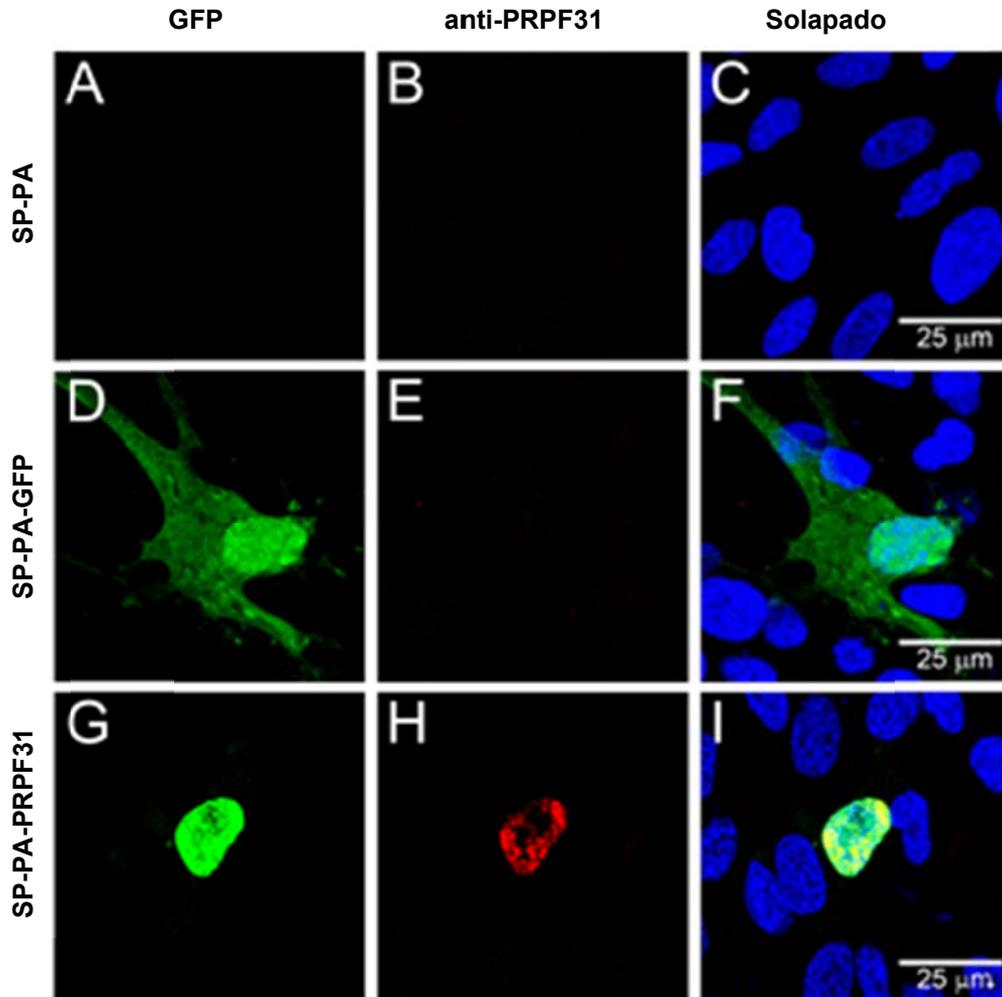
6. Mida la luminiscencia (activación de la caspasa, marcador de apoptosis).

FIGURAS ANEXAS

1: ERG Normal de ratón WT.



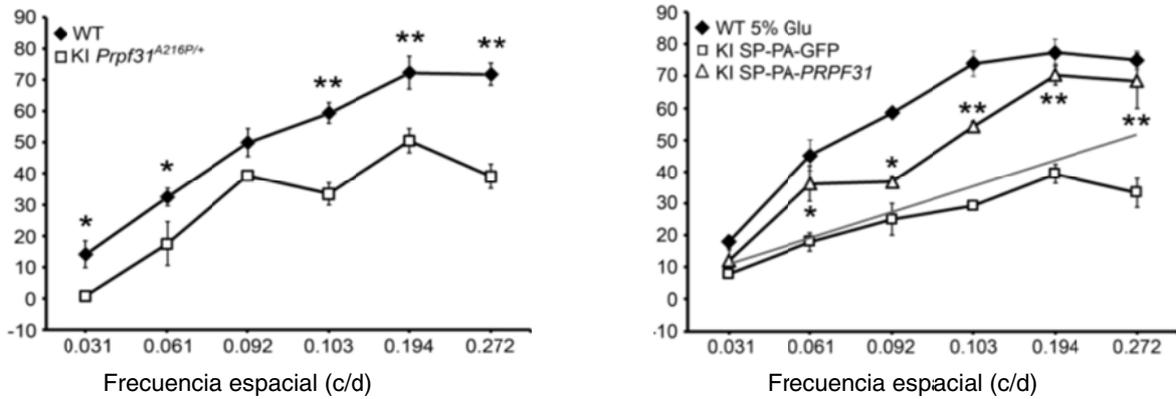
3: Resultados de la terapia génica con nanopartículas: Transfección *in vitro*



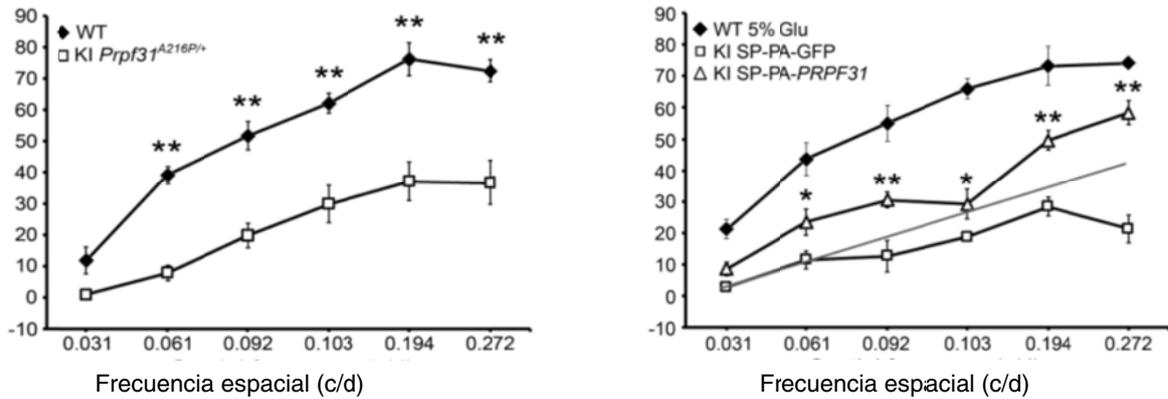
Resultados de la transfección de células derivadas de EPR de humano (RPE-1) con las nanopartículas sólo (SP-PA), con el vector con GFP (SA-PA-GFP) y con el vector con GFP y con el trasgen *PRPF31* (SA-PA-*PRPF31*). Podemos observar la expresión de GFP a nivel citoplasmático y nuclear (D) y exclusivamente a nivel nuclear cuando el vector también lleva *PRPF31* (G). La expresión de *PRPF31* es a nivel del núcleo celular (H). En azul vemos los núcleos de todas las células teñidos con DAPI (C, F, I). La barra de escala representa 25 micras.

4: Resultados de la terapia génica con nanopartículas: Test optomotor

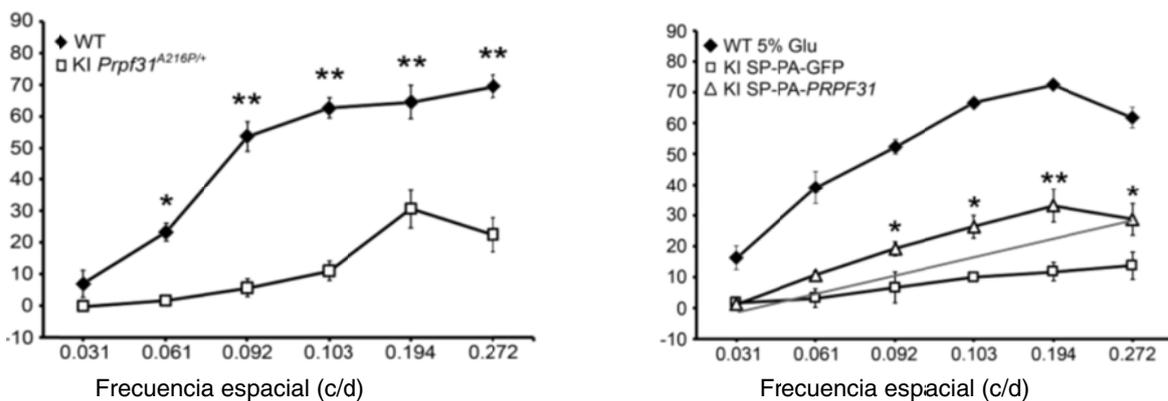
A: Porcentaje de respuesta positiva al 100% de sensibilidad al contraste



B: Porcentaje de respuesta positiva al 75% de sensibilidad al contraste



C: Porcentaje de respuesta positiva al 50% de sensibilidad al contraste



Observamos un efecto terapéutico especialmente con sensibilidades al contraste altas, en los que el porcentaje de respuesta positiva se acerca a los resultados obtenidos con los WT con frecuencias espaciales altas (A y B). Glu= glucosa 5%. SP-PA-GFP= vector con GFP. SA-PA-PRPF31= vector con el trasgen *PRPF31*. La línea gris representa la línea de tendencia de ratones KI no inyectados. Los valores se expresan en promedios \pm EEM. Estadística *t*-test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5: Resultados de la terapia génica con nanopartículas: OCT

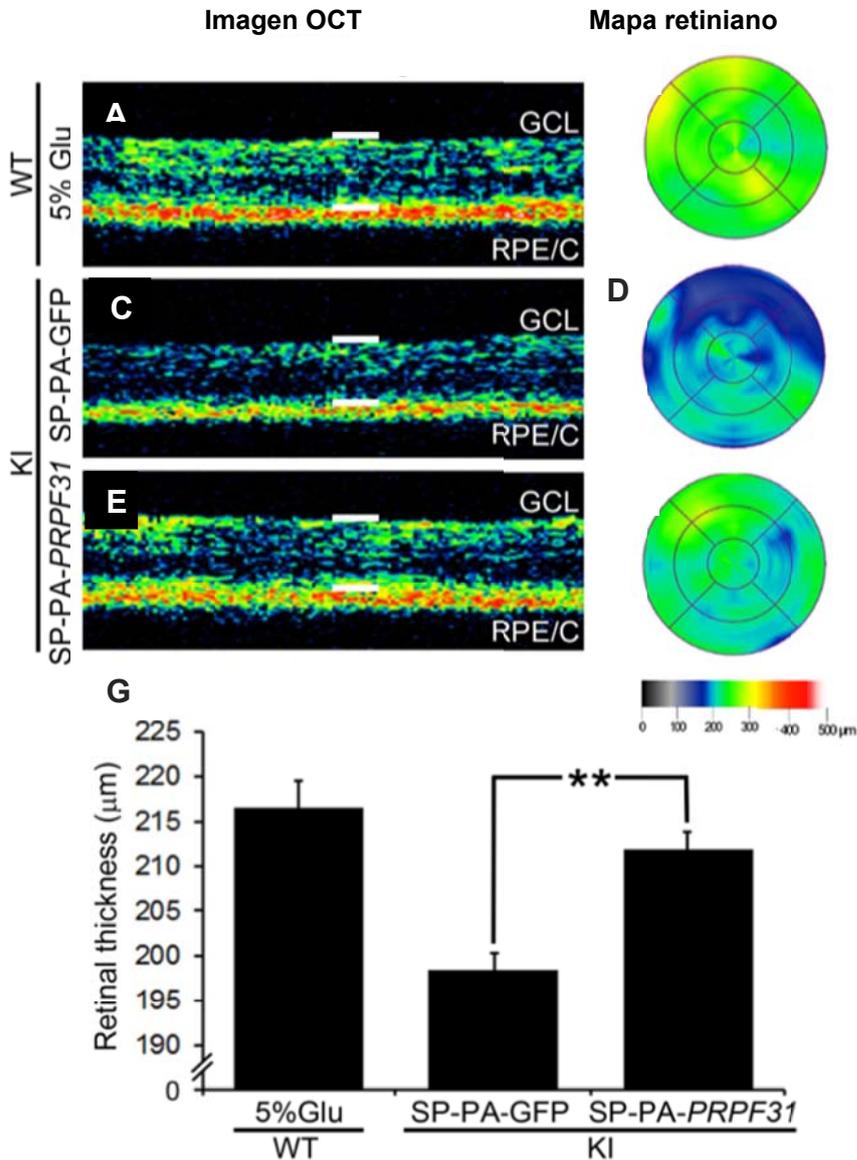


Imagen de OCT (A) y mapa de espesor retiniano de un ratón WT (B) control de la inyección. Imágenes de OCT (C y E) y mapas de espesor retiniano de dos ratones *Prpf31*^{A216P/+} KI (D y F) inyectados con el vector con GFP o con el vector con el trasgen respectivamente. El espesor retiniano fue medido desde la membrana limitante interna en el inicio de la capa de células ganglionares (GCL) hasta el inicio del EPR/coroides (EPR/C). La escala de colores representa el grosor retiniano medido en μm y se utilizó como referencia para la valoración de los mapas de espesor retiniano. Observamos un aumento del espesor y de la reflectividad de la retina tras la terapia con el gen *PRPF31* (E y F). Se muestra también el resultado de la cuantificación del espesor retiniano en los ratones inyectados (G). Los valores representan el promedio de 5 ratones en cada grupo \pm EEM. Estadística *t*-test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. GCL= Capa de células ganglionares. RPE/C= epitelio pigmentario / coroides. Glu= glucosa 5%. SP-PA-GFP= vector con GFP. SA-PA-PRPF31= vector con el trasgen *PRPF31*.