

# TERAPIAS AVANZADAS EN ENFERMEDADES DEGENERATIVAS DE LA RETINA

Ana Belén García Delgado



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y  
BIOLOGÍA MOLECULAR



CENTRO ANDALUZ DE BIOLOGÍA MOLECULAR  
Y MEDICINA REGENERATIVA  
DEPARTAMENTO DE REGENERACIÓN Y  
TERAPIA CELULAR



# TESIS DOCTORAL

## TERAPIAS AVANZADAS EN

### ENFERMEDADES DEGENERATIVAS DE

### LA RETINA

Ana Belén García Delgado  
Sevilla, 2021

Directores: Francisco Javier Díaz Corrales  
Shom Shanker Bhattacharya

Tutora: Angélica Castaño Navarro





Dr. Francisco J. Díaz Corrales, Investigador Principal emergente de la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud en el Departamento de Regeneración y Terapia Celular del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER).

Dra. Angélica Castaño Navarro, Catedrática de Universidad del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

#### CERTIFICAN:

Que la Tesis para optar al grado de Doctor en Biología Molecular, Biomedicina e Investigación Clínica por la Universidad de Sevilla titulada “Terapias avanzadas para enfermedades degenerativas de la retina” ha sido realizada íntegramente por Dña. Ana Belén García Delgado bajo nuestra dirección y tutela. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante un tribunal.

Para que consten a los efectos oportunos, expedimos la presente certificación en Sevilla a 11 de Enero de 2021.

Dr. Francisco J. Díaz Corrales

Dra. Angélica Castaño Navarro



Esta tesis doctoral ha sido financiada por:

Contrato asociado al proyecto de investigación financiado por la Junta de Andalucía y Asociación Mácula Retina: Estudio pre-clínico de seguridad y eficacia del trasplante celular de epitelio pigmentario de la retina crecido sobre matriz de fibrina-agarosa para el tratamiento de la degeneración macular seca.  
IP: Shom S. Bhtacharya.

Contrato asociado al proyecto de investigación financiado por la Fundación Cellex: Aplicación de la genómica y la epigenómica en la obtención de células madres seguras derivadas de pacientes afectados de retinosis pigmentaria portadores de mutaciones en el gen *EYS*".  
IP: Francisco J. Díaz Corrales.

Contrato asociado al proyecto de investigación financiado en la Convocatoria de Investigación, Desarrollo e Innovación Biomédica en Ciencias de la Salud en Andalucía 2018. Modalidad Proyectos de Investigación. PI-0099-2018.  
Ensayo preclínico de terapia de edición genómica ex viva para retinosis pigmentaria.  
IP: Berta de la Cerda Haynes.





*“En los ojos del joven arde la llama. En los del viejo, brilla la luz”*

*Víctor Hugo*

*A José y Camila, mis padres*

*A Cristina, mi hermana*

*A Tomy, mi compañero de vida*



*“Recuerdo lo que me dijo mi abuelo aquella mañana:  
Se puede perder la vista, pero nunca la mirada”.  
La M.O.D.A.*



## Agradecimientos

Estar escribiendo estas líneas me hace pensar que quizás el 2020 no fue tan malo. Es cierto que me ha robado algunos de mis sueños, mi 25 de abril, pero también me ha permitido que se cumpla uno de ellos, este trabajo. Durante estos años, han sido numerosas las personas que se han cruzado en mi camino, brindándome su ayuda y es por ello que quiero agradecerse.

En primer lugar agradecer a mis directores de tesis, Fran y Shomi, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme realizar esta tesis doctoral. No ha sido fácil, pero aquí está y eso es lo que cuenta.

Gracias a mi tutora, Angélica, por su amabilidad y por estar siempre dispuesta a ayudarme en todo lo que he necesitado.

Agradezco enormemente a los donantes, siempre dispuestos, ya que sin ellos este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo. También agradecer a las asociaciones de pacientes, ayudando siempre a que nuestro trabajo sea reconocido.

Gracias también a los compañeros del laboratorio, a los que están y a los que se fueron y en especial a Berta por ayudarme en lo que he necesitado y resolverme más de un asunto burocrático cada vez que los contratos llegaban a su fin. También quiero agradecer a Ana Artero, que en mis inicios en el laboratorio me enseñó mucho de lo que sé. Y como no, mencionar a Sofía, compañera y amiga, por los chocolates y vinos compartidos.

Hoy hago memoria y si algo bueno me llevo de estos años es a Lourdes, compañera, gran amiga y esa hermana mayor que no tuve. Hemos compartido y me has ayudado tanto que no puede quedar reflejado en estas líneas. Gracias por escucharme y por estar siempre disponible, si esta tesis ha llegado a su fin, en parte ha sido gracias a ti.

También quiero dar las gracias a las amigas de siempre, son pocas pero yo no necesito más. En especial mencionar a Lola, mi amiga de siempre, ahora más distanciadas pero siempre ahí. También a Nuria, esa amiga de farmacia que llegó más tarde, pero lo hizo para quedarse y eso es lo importante.

Agradecer a Tomás y Agapi, por la confianza en este trabajo y por quererme tanto.

A Cristina, mi hermana y confidente. Fuerte, decidida y valiente, siempre persiguiendo tus sueños. No sabes lo importante que eres para mi, tú que tantas veces me dices que soy tu otra madre y yo que muchas otras me

cuestiono quien es la mayor de las dos. Gracias por creer en mi y por apoyarme incondicionalmente. En definitiva, gracias por ser la mejor hermana que alguien podría tener.

A mis padres, porque hoy soy quien soy gracias a ellos. Papá, tú me demuestras día a día que con trabajo y perseverancia los sueños se cumplen. Mamá, gracias por tu amor incondicional y por no permitir que tire la toalla.

Y por último, a Tomy, quien confió en mi desde el momento que nos conocimos, quien me escucha, en definitiva, quien comparte conmigo mis días buenos y no tan buenos. Gracias por ser compañero de vida y ser abrigo en los días fríos. No ha sido un año fácil, pero una vez más, la vida nos ha demostrado que somos buenos guerreros y que aquí estamos para luchar juntos cada batalla.

En definitiva, gracias a todos y cada uno de vosotros.

# Índice

Agradecimientos .....	XIII
Abreviaturas .....	XVII
Índice de figuras .....	XXI
Índice de tablas .....	XXIII
Resumen .....	XXV
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 El globo ocular y la retina.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Organogénesis del ojo. ....	2
1.1.2. Estructura y organización funcional de la retina. ....	7
<b>1.2. Enfermedades degenerativas de la retina (EDR).....</b>	<b>21</b>
1.2.1. Degeneración macular asociada a la edad.....	22
1.2.2. Retinosis pigmentaria.....	31
<b>1.3. Opciones terapéuticas para DMAE y RP.....</b>	<b>41</b>
1.3.1. Terapia farmacológica.....	42
1.3.2. Neuroprotección.....	44
1.3.3. Terapia génica. ....	45
1.3.4. Terapia optogenética. ....	55
1.3.5. Prótesis artificiales. ....	56
1.3.6. Terapia celular. ....	58
<b>2. Justificación y objetivos.....</b>	<b>73</b>
<b>3. Métodos y resultados .....</b>	<b>77</b>
<b>3.1. Artículo 2. ....</b>	<b>78</b>
3.1.1. Información adicional del artículo 2.....	83
3.1.2. Anexo Artículo 2 (datos no publicados). ....	84
<b>3.2. Artículo 3. ....</b>	<b>85</b>
3.2.1. información adicional artículo 3.....	96
<b>3.3 Artículo 4. ....</b>	<b>101</b>
3.3.1. Anexo artículo 4 (datos no publicados).....	106

<b>4. Discusión .....</b>	<b>107</b>
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>119</b>
<b>6. Bibliografía.....</b>	<b>123</b>



## Abreviaturas

AAV: virus adenoasociados  
AAV2: virus adeno-asociado de serotipo 2  
ABCA4: casete de unión a ATP, subfamilia A, miembro 4.  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios  
AG: atrofia geográfica  
AGF: angiografía de fluoresceína  
ARN: ácido ribonucleico  
ARNm: ARN mensajero  
bFGF: factor de crecimiento básico de fibroblastos  
BMP: proteína morfogenética de hueso  
BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro  
C: citosina  
Ca<sup>2+</sup>: calcio  
Cas9 (del inglés *CRISPR-associated protein*): proteína asociada a CRISPR  
CCG: capa de células ganglionares  
CFH: factor H del complemento  
CFN: capa de fibras nerviosas  
cGMP: guanosina cíclica monofosfato  
CNE: capa nuclear externa  
CNGA y CNGB: canales alfa y beta dependientes del nucleótido cíclico  
CNI: capa nuclear interna  
CNTF: factor neurotrófico ciliar  
Co: cornea  
CPE: capa plexiforme interna  
CPI: capa plexiforme interna  
CRALBP: proteína de unión a retinaldéhido  
CRISPR (del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*): repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas  
DMAE: degeneración macular asociada a la edad  
DS: DropSens  
DSBs (del inglés *DNA Double-Strand Breaks*): introducción del corte en la doble cadena de ADN  
E: esclera  
EDR: enfermedades degenerativas de la retina  
EGF: factor de crecimiento epidérmico  
EMA: Agencia Europea de Medicamentos  
EPR: epitelio pigmentario de la retina  
ERG: electroretinograma  
ESC: célula madre embrionaria

EYS: del inglés “*Eyes Shut Homolog*”  
FACS (del inglés, *Fluorescence Assisted Cells Sorting*): clasificación celular asistida por fluorescencia.  
FDA (del inglés *U.S. Food and Drug Administration*): Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos  
FGF (del inglés, *Fibroblast growth factor*): factor de crecimiento de fibroblastos  
FR: fotorreceptor  
GABA: ácido gamma-aminobutírico  
GCAP: activador de guanilato ciclasa  
GDP: guanidilodifosfato  
GDNF: factor neurotrófico derivado de células de la glía  
GTP: guanidiltrifosfato  
GUCY2D: guanilato ciclasa  
GWAS: estudios de asociación de todo el genoma  
H: histidina  
HDR (del inglés *homology directed repair*): recombinación homóloga  
HH: familia *Hedgehog*  
HLA: antígeno leucocitario humano  
IPM: del inglés “*interphotoreceptor matrix*”  
iPSC: células madre de pluripotencia inducida  
IR: infrarrojo  
IRBP: proteína de unión a retinol intersticial  
IS: segmento interno (del fotorreceptor)  
L: lente o cristalino  
LamG: G de laminina  
LCA: amaurosis congénita de Leber  
LED: diodo de emisor de luz  
Lhx2: homeobox LIM 2  
LRAT: lecitina retinol acetiltransferasa  
MB: membrana de Bruch  
*MERTK*: del inglés *proto-oncogen tyrosine-protein kinase MER*  
Mitf: factor de transcripción asociado con microftalmia  
MLE: membrana limitante externa  
MLI: membrana limitante interna  
MS: mesénquima  
Na<sup>+</sup>: sodio  
NEI (del inglés *National Eye Institution*): Instituto Nacional del Ojo  
NFAH: nanoestructurado de hidrogel de fibrina-agarosa  
NHEJ (del inglés *non-homologous end joining*): recombinación no homóloga  
nm: nanómetros  
NO: nervio óptico  
NR: neuroretina  
NVC: neovascularización coroidal  
OCT: tomografía de coherencia óptica

OS: segmento externo (del fotorreceptor)  
OSKM: *Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc*  
Otx-2: homeobox ortodéntico 2  
PAM: del inglés *protospacer adjacent motif*  
Pax-2: box pareado 2  
Pax-6: box pareado 6  
PDE: fosfodiesterasa  
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas  
PEDF: factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario  
PEI: polietilénimina  
PL: placoda del cristalino  
PLL: poli L-lisina  
RA (del inglés *Retinoic ácid*): ácido retinoico  
RAL: retinal  
RAX: del inglés *retina and anterior neural fold homeobox*  
RdCVF: factor protector de conos derivado de bastones  
RDH12: retinol deshidrogenasa  
RDH5: retinol deshidrogenasa  
RE: retinil éster  
RH: recombinación homóloga  
RHO: rodopsina  
RHO\*: rodopsina activada (metarrodopsina)  
RNP: ribonucleoproteína  
ROL: retinol  
ROS: especies reactivas de oxígeno  
RP: retinitis pigmentosa  
RPad: RP autosómica dominante  
RPar: RP autosómica recesiva  
RPC: células progenitoras de la retina pluripotentes  
RPE65: proteína específica de epitelio pigmentario de la retina  
RPGR (del inglés *Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator*): gen regulador de GTPasa de retinosis pigmentaria  
RPx: RP ligada al cromosoma X  
RR-P3HT: poli (3-hexiltiofeno-2,3-diilo) regioregular  
SAG: arrestina  
SCR: repeticiones de consenso cortas  
SE: superficie del ectodermo  
SHH: Sonic hedgehog  
Six-3: homeobox relacionado con el seno ocular 3  
SNC: sistema nervioso central  
SNP: polimorfismo de un solo nucleótido  
Sox-2: factor de transcripción SRY-box 2  
SV (del inglés *Sendai Virus*): virus Sendai  
T: timina

TALEN (del inglés *transcription activator-like effector nucleases*): nucleasas efectoras parecidas al activador transcripcional

TGF: factor de crecimiento transformador

TNF $\alpha$ -NF/ $\kappa$ B: factor de necrosis tumoral alfa - factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas

TO: tallo óptico

VEGF: factor de crecimiento endotelial

VEGF: factor del crecimiento endotelial vascular

VL: vesícula del cristalino

VO: vesícula óptica

VPU: unidad de procesamiento de la visión

Vsx-2: homeobox del sistema visual 2

WNT: tipo sin alas de la familia del sitio de la integración *MMTV*

Y: tirosina

Y402H: polimorfismo resultado de un intercambio de tirosina (Y) a histidina (H) en la posición 402 de la proteína CFH.

ZFN (del inglés *Zinc-finger nucleases*): nucleasas de dedos de zinc

## Índice de figuras

- Figura 1.** Esquema representativo de la división del campo ocular.
- Figura 2.** Representación esquemática de la organogénesis del ojo.
- Figura 3.** Microscopía electrónica de barrido de un corte del ojo a las 6.5 semanas de desarrollo.
- Figura 4.** Capas y células de la retina.
- Figura 5.** Distribución de los fotorreceptores en la retina.
- Figura 6.** Tipos de fotorreceptores: bastón y cono.
- Figura 7.** Regulación del desarrollo EPR mediante señales extracelulares y factores de transcripción.
- Figura 8.** Funciones del epitelio pigmentario de la retina.
- Figura 9.** Cascada de fototransducción.
- Figura 10.** Ciclo visual.
- Figura 11.** Heterogeneidad genética de las distrofias retinianas.
- Figura 12.** Representación gráfica de la anatomía de la retina en estadios normales y distintos tipos de DMAE.
- Figura 13.** Simulación del campo visual y OCT de individuo sano y paciente con DMAE.
- Figura 14.** Estudio de fondo de ojo de individuo sano y paciente con DMAE.
- Figura 15.** Hipótesis de la patogénesis de la DMAE.
- Figura 16.** Regulación de la vía alternativa del complemento por el factor H en el plasma y en las superficies celulares.
- Figura 17.** Simulación del campo visual reducido de un individuo sano y un paciente con RP.
- Figura 18.** Estudio de fondo de ojo de individuo sano y paciente con RP
- Figura 19.** Patrones de herencia de la retinosis pigmentaria.
- Figura 20.** Diferentes estrategias para tratar la enfermedades hereditarias de la retina.
- Figura 21.** Tipos de terapia génica: *ex vivo* e *in vivo*.
- Figura 22.** Tipos de vectores virales: retrovirus, herpesvirus, adenovirus y virus adenoasociados.
- Figura 23.** Tipos de vectores no virales usados en terapia génica: polímeros catiónicos, liposomas catiónicos y nanopartículas.
- Figura 24.** Esquema que representa la edición génica mediante el sistema CRISPR-Cas9.
- Figura 25.** Principio de optogenética en neurociencia.
- Figura 26.** Ejemplos de algunas de las prótesis retinianas que actualmente se encuentran en desarrollo.
- Figura 27.** Características de las células madre.
- Figura 28.** Diferentes aplicaciones de las iPSCs en las patologías de la retina.



## Índice de tablas

**Tabla 1.** Factores de transcripción usados de forma reiterada durante la organogénesis del ojo.

**Tabla 2.** Vías de señalización usadas de forma reiterada durante la organogénesis del ojo.

**Tabla 3.** SNPs prevalentes en DMAE identificados hasta la fecha.

**Tabla 4.** Genes causantes de RP identificados hasta la fecha.





## Resumen

Las enfermedades degenerativas de la retina (EDR) son un grupo heterogéneo de patologías, algunas hereditarias y otras con un origen complejo, que producen una pérdida progresiva de las células de la retina con la consiguiente pérdida de la agudeza visual pudiendo avanzar hasta producir una ceguera total. En los últimos años y gracias al desarrollo de terapias avanzadas como la terapia génica y celular muchos casos de ceguera podrían ser potencialmente tratables.

El descubrimiento de las células madre de pluripotencia inducida o iPSC ha aportado una fuente celular ilimitada con gran potencial ya que gracias a sus propiedades son un instrumento prometedor para el estudio de enfermedades, así como para ser utilizadas en medicina regenerativa e ingeniería tisular. La edición génica es una novedosa tecnología con la se puede manipular con precisión una secuencia del genoma humano para lograr un efecto terapéutico mediante la cual se pueden corregir mutaciones que causan enfermedades, añadir genes terapéuticos a sitios específicos del genoma y eliminar genes letales o secuencias del genoma.

En este trabajo se han generado y caracterizado con éxito dos líneas de iPSC a partir de muestras de sangre periférica de pacientes con EDR, como son la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y la retinosis pigmentaria (RP), con el fin de establecer modelos celulares de cada una de las enfermedades y terapia celular de reemplazo. Estas líneas nos han permitido conocer las bases celulares y moleculares que llevan al desarrollo de la enfermedad. Posteriormente, enfocándonos en la medicina regenerativa, con el objetivo de buscar nuevas terapias para tratar a pacientes con DMAE, las iPSC fueron diferenciadas hacia células de epitelio pigmentario de la retina (EPR). Las células obtenidas fueron caracterizadas y trasplantadas en diferentes modelos animales. Se demostró que las células de EPR sobreviven y mantienen su fenotipo y orientación sin ningún efecto adverso local o sistémico. Por último, en la línea de iPSC obtenida de la muestra de sangre periférica de un paciente con RP causada por una mutación en el gen *EYS*, se ha pretendido corregir la mutación mediante el uso de CRISPR/Cas9. En este caso aunque se corrigió la fase de lectura en el alelo mutante, no se logró obtener la misma secuencia presente en el alelo silvestre.



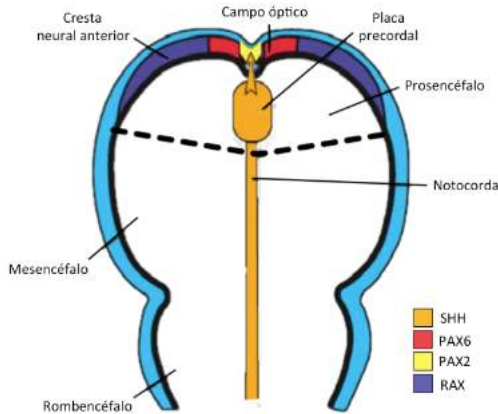
# **1. Introducción**

## 1.1 El globo ocular y la retina.

El ojo es un órgano esencial para la vida humana ya que la mayoría de la información de nuestro entorno es capturada a través de los ojos. Estos órganos sensoriales captan y procesan los fotones de la luz en la retina para enviar impulsos nerviosos hasta la corteza occipital a través de la vía visual para la formación de las imágenes. La retina es la parte más accesible del sistema nervioso central (SNC) y por esta razón, se le conoce como la ventana del cerebro (Jin et al., 2019). Para entender mejor el desarrollo de nuevas terapias para patologías que cursen con degeneración de la retina y ceguera es importante conocer como ocurre el desarrollo embrionario del ojo y las principales características anatómicas y funcionales de la retina.

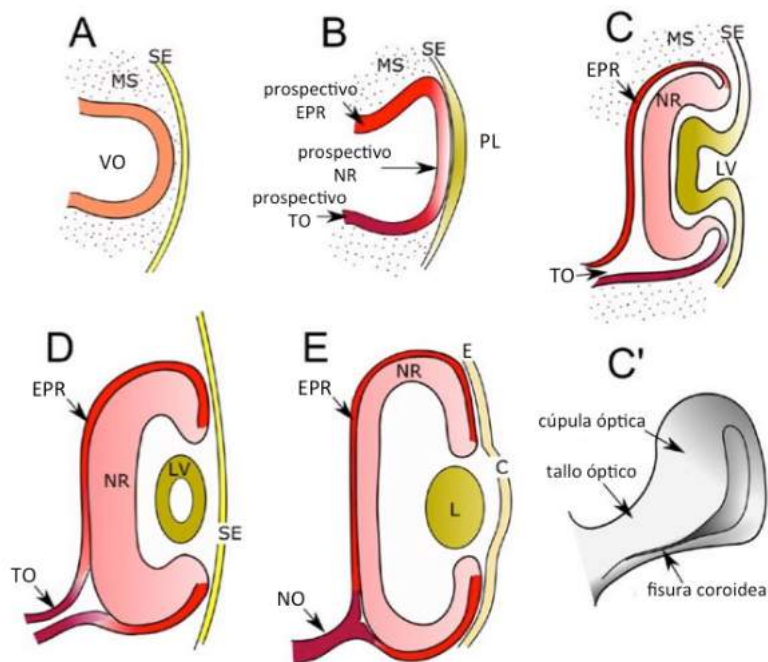
### 1.1.1 Organogénesis del ojo.

El desarrollo del ojo es un proceso complejo en el que intervienen diversas capas de tejidos del desarrollo embrionario. Durante el proceso de organogénesis se activan una serie de factores de transcripción que modulan la expresión de determinados genes que controlan la diferenciación celular de los diferentes componentes de la retina. Conocer y comprender este complejo proceso es fundamental para diseñar protocolos que permitan diferenciar células pluripotentes a un tipo celular específico presente en las capas de la retina. En el embrión humano, el desarrollo ocular comienza durante la gastrulación cuando el primordio ocular se organiza como un campo ocular único en el centro del prosencéfalo en la cresta neural anterior (Figura 1). En esta etapa, las células del campo ocular expresan *RAX* (retina and anterior neural fold homeobox). Dos de los primeros factores de transcripción implicados en el establecimiento del patrón de los surcos ópticos son *PAX6* y *PAX2*. Durante la tercera semana del desarrollo se reprime la expresión del gen *PAX6* y se aumenta la de *PAX2* con la secreción de Sonic hedgehog (SHH) por la placa precordal, en la línea media del diencéfalo, y como resultado se divide el campo ocular único en dos surcos o fosetas ópticas, que proceden de la evaginación bilateral del diencéfalo del tubo neural, siendo esto el primer signo morfológico de formación del ojo. Tanto en las etapas iniciales del desarrollo del ojo como en etapas posteriores, durante el desarrollo de la retina y del cristalino, la función que desempeña el gen *PAX6* es especialmente relevante. (Arteaga Martinez, 2018; Carlson, 2013; Sadler, 2016).



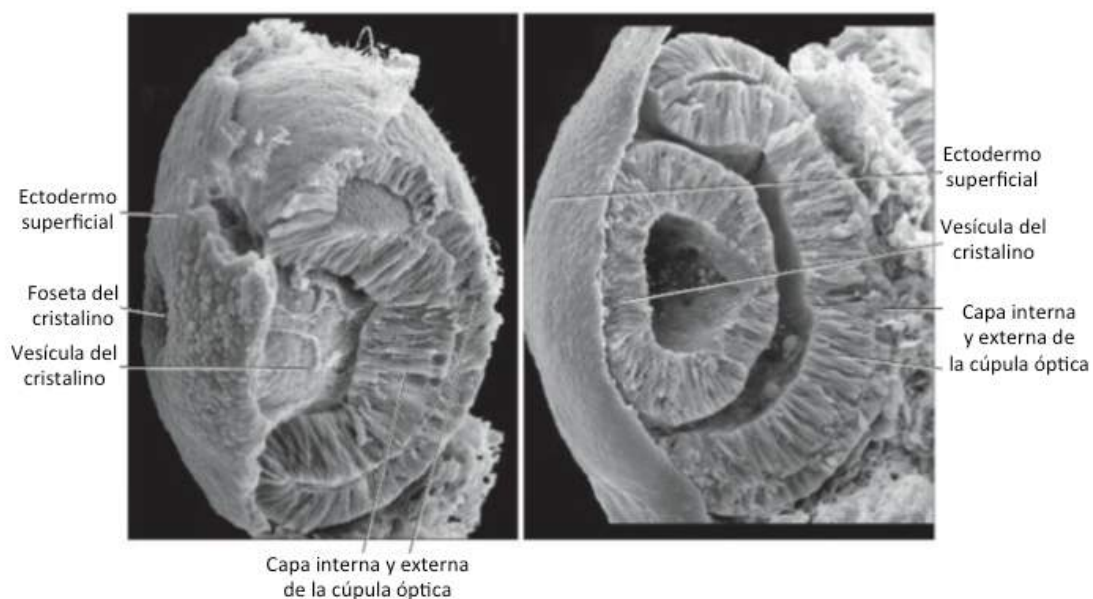
**Figura 1.** Esquema representativo de la división del campo ocular por el efecto antagonístico de SHH sobre el gen *PAX6* y sobreexpresión de *PAX2* en la línea media del proencéfalo. Modificada de Sadler et al. (Sadler, 2016).

Aproximadamente 25 días después de la fecundación, estos surcos ópticos forman unas evaginaciones que se alargan para formar las vesículas ópticas (VO) que migrarán lateralmente formando los tallos o pedículos ópticos (Figura 2A). La evaginación continuará hasta que las vesículas ópticas entren en contacto con el ectodermo superficial, proceso impulsado por la capa de células mesenquimatosas (procedentes del mesodermo) que está alrededor de dichas vesículas. Gracias a la interacción con la VO, la superficie del ectodermo se engrosa dando lugar a la placoda del cristalino (Figura 2B), que se invagina progresivamente en la vesícula óptica dando lugar a la vesícula del cristalino y formando la cúpula óptica (Figura 2C-D y Figura 3). En esta fase del desarrollo, interviene el factor de transcripción MITF que se expresa a lo largo de toda la vesícula óptica. Posteriormente, la expresión de *VSX-2* en la zona distal de la vesícula óptica (futura retina neural) confinará a MITF a las regiones más proximales de las vesículas, que terminarán convirtiéndose en el epitelio pigmentario de la retina (EPR) (Graw, 2010; Wiedemann, 2013).



**Figura 2.** Representación esquemática de la organogénesis del ojo. **A)** La vesícula óptica se forma como una evaginación desde el diencéfalo. **B)** Al entrar en contacto con la superficie del

ectodermo, la vesícula óptica da lugar al futuro epitelio pigmentario de la retina, neuroretina y el tallo óptico; el engrosamiento de la superficie del ectodermo da lugar a la placoda del cristalino. **C)** La vesícula óptica y la placoda del cristalino invaginan, dando lugar a la cúpula óptica y a la vesícula del cristalino. **C')** La región ventral de la vesícula óptica que se invagina forma la fisura coroidea. **D-E)** Transición del desarrollo de la cúpula óptica temprana a la cúpula óptica madura. La lente o cristalino se forma al desprenderse de manera permanente de su cavidad formando una estructura sólida; la neuroretina y el epitelio pigmentario se compactan reduciendo la cavidad endodermal; el tallo óptico da lugar al nervio óptico y la superficie del ectodermo cercano al cristalino da lugar al epitelio corneal. Abreviaturas: Co: córnea; L: lente o cristalino; PL: placoda del cristalino; LV: vesícula del cristalino; MS: mesénquima; NR: neuroretina; NO: nervio óptico; TO: tallo óptico; VO: vesícula óptica; EPR: epitelio pigmentario de la retina; E: esclera; SE: superficie del ectodermo. Modificada de Adler y Canto-Soler. (Adler & Canto-Soler, 2007)



**Figura 3.** Microscopía electrónica de barrido de un corte del ojo a las 6 y 6.5 semanas de desarrollo. A la izquierda vemos que todavía no se ha desprendido completamente la vesícula del cristalino del ectodermo superficial y ya están formadas las dos capas de cúpula óptica. Sin embargo, en la imagen de la derecha, vemos que la vesícula del cristalino ya está separada por completo del ectodermo superficial. Modificada de Embriología Médica de Langman, 2016. (Sadler, 2016).

En torno al día 34, las dos capas de tejido resultantes de la excavación constituyen el esbozo del EPR y la neuroretina (NR), con la vesícula del cristalino completamente formada en el interior de la excavación (Figura 2D y Figura 3). Durante esta fase, el EPR inmaduro encapsula la capa interna, estrechando la parte ventral de la VO y formando la fisura coroidea (Figura 2C'). A través de esta fisura coroidea se introduce la arteria hialoidea que posteriormente dará origen a la arteria central de la retina. Finalmente, la fisura coroidea se cierra completamente, permitiendo la formación del nervio óptico, a través del cual los axones de las células ganglionares transmiten información al

cerebro. La expresión diferencial de los genes *PAX* determina qué células se convertirán en cúpula óptica (futura retina) y cuáles lo harán en tallo óptico (futuro nervio óptico). Elevadas concentraciones de SHH en el tallo óptico inhibe la expresión de *PAX6* a la vez que induce la de *PAX2*, del mismo modo que bajas concentraciones de SHH en las zonas más distales permiten que se exprese *PAX6* en la vesícula óptica, primer paso en la formación de la retina (Carlson, 2013).

Del margen anterior de la cúpula óptica derivan el cuerpo ciliar y el iris, en el punto donde se unen la retina neurosensorial y el EPR. Las estructuras restantes, en particular los músculos, se forman a partir de células mesenquimatosas, el mismo tipo de células que se encuentran en la cresta neural. El ectodermo superficial, en contacto con la vesícula del cristalino, formará la cornea (Figura 2E). En resumen, las principales estructuras oculares se derivan de tres fuentes principales: el ectodermo neural forma la retina, el ectodermo superficial da lugar a la lente y parte de la córnea y las células de la cresta neural forman la parte central de la córnea (Carlson, 2013; Graw, 2010)

En el desarrollo temprano y tardío de los diferentes tejidos que forman el ojo se observa que es esencial la acción combinada de determinados factores de transcripción y vías de señalización. Las Tablas 1 y 2 detallan los dominios de expresión así como las funciones que tienen durante la organogénesis del ojo dichos factores de transcripción y vías de señalización. (Miesfeld & Brown, 2019).

**Tabla 1.** Factores de transcripción usados de forma reiterada durante la organogénesis del ojo.

Factores de transcripción	Nombre del gen	Dominios de expresión	Funciones durante la organogénesis del ojo
<b>Pax6</b>	Paired box 6	Campo ocular, ectodermo superficial, placoda del cristalino, vesícula óptica, vesícula del cristalino, cúpula óptica, neuroretina, EPR, cuerpo ciliar, epitelio del iris	Diferenciación del campo ocular, evaginación de la vesícula óptica, patrón de la vesícula óptica, patrón de la cúpula óptica, neurogénesis de la retina, desarrollo de la lente y la cornea, desarrollo del cuerpo ciliar y del iris
<b>Rax/Rx</b>	Retina and anterior neural fold homeobox	Campo ocular, vesícula óptica, cúpula óptica, neuroretina	Diferenciación del campo ocular, evaginación de la vesícula óptica, patrón de la vesícula óptica, neurogénesis de la

			retina
<b>Lhx2</b>	LIM homeobox 2	Campo ocular, vesícula óptica, cúpula óptica, neuroretina	Diferenciación del campo ocular, patrón de la vesícula óptica, formación de la cúpula óptica, desarrollo de la lente
<b>Sox2</b>	Sex determining region Y (SRY)-box 2	Neuroectodermo anterior, placoda de cristalino, vesícula del cristalino, epitelio de la lente, cúpula óptica, neuroretina	Diferenciación del campo ocular, neurogénesis de la retina
<b>Otx2</b>	Orthodenticle homeobox 2	Neuroectodermo anterior, vesícula óptica, neuroretina, EPR	Diferenciación del campo ocular, desarrollo del EPR, neurogénesis de la retina
<b>Six3</b>	Sine oculis-related homeobox 3	Campo ocular, placoda del cristalino, vesícula del cristalino, vesícula óptica, cúpula óptica	Diferenciación del campo ocular, desarrollo de la lente

Fuente: Modificada de Miesfeld & Brown, 2019.

**Tabla 2.** Vías de señalización usadas de forma reiterada durante la organogénesis del ojo.

Vías de señalización	Dominios de expresión	Funciones durante la organogénesis del ojo
<b>BMP (Bone morphogenetic protein)</b>	Neuroectodermo anterior, ectodermo superficial, vesícula óptica, surcos ópticos, vesícula del cristalino, cúpula óptica	Diferenciación del campo ocular, inducción de la lente, diferenciación del EPR, desarrollo del campo ocular, desarrollo del epitelio del iris
<b>TGF (Transforming growth factor)</b>	Mesénquima periocular	Evaginación de la vesícula óptica, diferenciación del EPR, desarrollo del endotelio corneal, desarrollo del estroma corneal
<b>RA (Retinoic acid)</b>	Mesénquima periocular, vesículas ópticas	Desarrollo del endotelio corneal, desarrollo del estroma corneal, desarrollo del iris
<b>FGF (Fibroblast growth factor)</b>	Ectodermo superficial, placoda del cristalino, vesícula óptica	Desarrollo de células fibrosas primarias de la lente, patrón de la cúpula óptica



<b>WNT (<i>wingless</i>-type MMTV integration site family)</b>	Neuroectodermo anterior, ectodermo superficial, vesícula óptica, mesénquima periocular, cuerpo ciliar, epitelio del iris	Diferenciación del EPR, desarrollo del cuerpo ciliar, desarrollo del epitelio del iris
<b>HH (<i>Hedgehog</i> family)</b>	Línea media ventral, EPR, neuroretina	Diferenciación del campo ocular, patrón de la vesícula óptica, patrón de la cúpula óptica, inducción del tallo óptico, diferenciación del EPR
<b>Hippo</b>	Vesícula óptica, cúpula óptica, EPR, vesícula del cristalino, epitelio del cristalino	Diferenciación del EPR, desarrollo del EPR, desarrollo del cuerpo ciliar, desarrollo del cristalino
<b>Notch</b>	Epitelio del cristalino, copa óptica, neuroretina	Desarrollo del cristalino, neurogenesis de la retina

Fuente: Modificada de Miesfeld & Brown, 2019.

### 1.1.2. Estructura y organización funcional de la retina.

La retina es la capa más interna del globo ocular y está compuesta de siete tipos celulares diferentes (células ganglionares, células amacrinas, células bipolares, células horizontales, células plexiformes, células de Müller y los fotorreceptores que se dividen a su vez en conos y bastones). Aparte existen otras células gliales y endoteliales que conforman toda la estructura de la retina. Todos estos tipos de células se distribuyen en diez capas celulares paralelas. Tres de estas capas contienen los núcleos de diferentes tipos de neuronas las cuales se intercalan con otras dos capas plexiformes donde tienen lugar las conexiones sinápticas (Figura 4A). A continuación se describen las capas de la retina desde la capa más interna a la más externa:

**Membrana limitante interna (MLI).** Membrana basal constituida por las prolongaciones terminales de las células de Müller. Es la membrana que separa la retina del humor vítreo (Figura 4A).

**Capa de fibras nerviosas (CFN).** Compuesta por los axones de las células ganglionares que concurren desde todas las partes de la retina en el nervio óptico (Figura 4A)

**Capa de células ganglionares (CCG).** Formada por los cuerpos de las células ganglionares, es la capa más interna de células con respecto a la disposición en el ojo (Figura 4A)

**Capa plexiforme interna (CPI).** Está constituida por las conexiones sinápticas entre las células amacrinas, las células ganglionares, las células interplexiformes y las células bipolares (Figura 4A).

**Capa nuclear interna (CNI).** Formada por los núcleos de la células horizontales, células bipolares, células amacrinas, células interplexiformes y células de Müller (Figura 4A).

**Capa plexiforme externa (CPE).** Está compuesta por las conexiones sinápticas entre los fotorreceptores, las células horizontales y las células bipolares (Figura 4A).

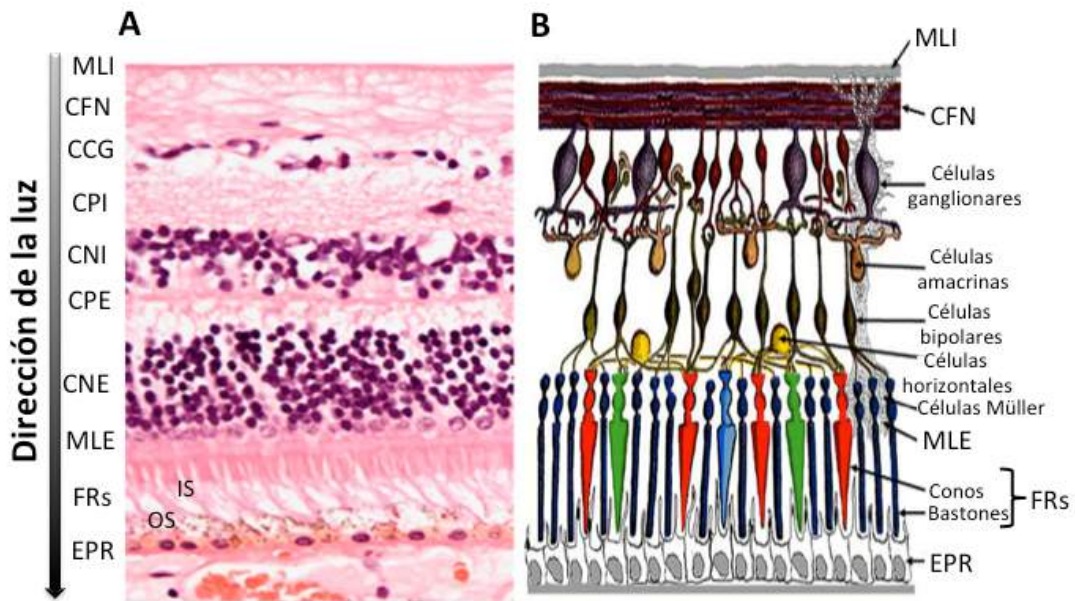
**Capa nuclear externa (CNE).** Formada por los cuerpos de los fotorreceptores (conos y bastones) (Figura 4A).

**Membrana limitante externa (MLE).** Es una membrana virtual que surge de la unión entre los segmentos internos de los fotorreceptores y las células de Müller. Esta estructura actúa como barrera metabólica ante el paso de moléculas de gran tamaño (Figura 4A) (Cohen, 1961).

**Capa de fotorreceptores (FRs).** Es la capa más profunda o externa de la neuroretina y está formada por los segmentos internos y externos de los fotorreceptores (Figura 4A).

**Capa de células del EPR.** Monocapa de células pigmentadas hexagonales que forman la capa más externa de la retina (Figura 4A).

Quedó establecido, desde las primeras investigaciones de Cajal en el siglo pasado, que la retina de los vertebrados contiene principalmente cinco clases de células nerviosas o neuronas y células gliales (Cajal, 1893). Más tarde, el Dr. Antonio Gallego describió por primera vez las células interplexiformes (Gallego, 1986). Todos los tipos celulares que componen la retina derivan de células pluripotentes progenitoras de la retina (RPC) dentro de la cúpula óptica. Aunque existe un orden estereotípico para la producción de cada tipo celular, también hay una superposición temporal en la aparición de los distintos tipos celulares. A medida que las RPCs pasan de las divisiones celulares proliferativas a las terminales, se establece la capacidad de adoptar destinos particulares. El estado de competencia de estas células para producir el tipo apropiado de neurona o glía cambia a lo largo del tiempo de desarrollo, debido, en parte, a un alargamiento del ciclo celular. (Miesfeld & Brown, 2019).



**Figura 4.** **A)** Histología de retina humana teñida con eosina/hematoxilina modificada de Richardson et al. (Richardson et al., 2017). **B)** Diagrama de los tipos celulares que componen la retina de los vertebrados modificada de WebVision (<https://webvision.med.utah.edu/>). Abreviaturas: MLI: membrana limitante interna; CFN: capa de fibras nerviosas; CCG: capa de células ganglionares; CPI: capa plexiforme interna; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CNE: capa nuclear externa; MLE: membrana limitante externa; FRs: fotorreceptores; IS: segmento interno; OS: segmento externo; EPR: epitelio pigmentario de la retina.

En los vertebrados, las células ganglionares son las primeras que se generan, y posteriormente, en una secuencia regular, se diferencian los otros grupos celulares. En una primera fase se generan las células ganglionares, las células horizontales y los conos. Seguidamente, en una segunda fase, se generan las células progenitoras de los bastones, las células de la glía de Müller y las células bipolares. El caso de las células amacrinas no está del todo claro aunque parece que se generan en la segunda fase básicamente. Hay que destacar que desde el centro hasta la periferia, el grado de histogénesis varía y que la retina central puede estar generando células tardías mientras que la retina periférica puede estar en la primera fase de la histogénesis. Los bastones y el EPR culminan su desarrollo post-natalmente (Rapaport et al., 1992; Schachat, Andrew P., MD; Sadda, Srinivas R., MD; Hinton, David R., MD; Wilkinson, C.P., MD; Wiedemann, Peter, 2017).

Los principales tipos celulares que componen la retina son las siguientes:

**Células ganglionares.** La información de la luz sale de la retina a través de los axones de las células ganglionares. (Figura 4B). Estas neuronas que se encuentran en la CCG reciben información tanto de las células amacrinas como de las células bipolares y transmiten señales al cerebro a través de los

axones que de manera selectiva forman la CFN para después converger y formar el nervio óptico. Los axones de las células ganglionares se superponen en la superficie interna de la retina y salen de esta a través del disco óptico. Las células ganglionares se clasifican, según su morfología y respuesta a la luz, por el sistema XYZ. Las células ganglionares X (constituyen aproximadamente el 80% de la población celular ganglionar) participan en el análisis del color y los detalles; las células ganglionares Y (en torno al 10% de la población) participan en la detección del movimiento; y las células ganglionares Z (10% restante aproximadamente) proyectan sus axones hacia el tronco encefálico aunque no tienen una función muy definida (Masland, 2001).

**Células horizontales.** Las transmisiones de los fotorreceptores están moduladas por las células horizontales, interneuronas que contactan con las células bipolares (Figura 4B). Los conos y bastones se retroalimentan de las células horizontales aunque estas son las células menos abundantes de la CNI, constituyen en torno al 5% de las células que forman esta capa nuclear. En la mayoría de los mamíferos, hay dos tipos morfológicamente diferentes de células horizontales. Las células horizontales mejoran el contraste entre las regiones claras y oscuras adyacentes, es decir, ajustan la respuesta del sistema al nivel general de iluminación (Masland, 2001).

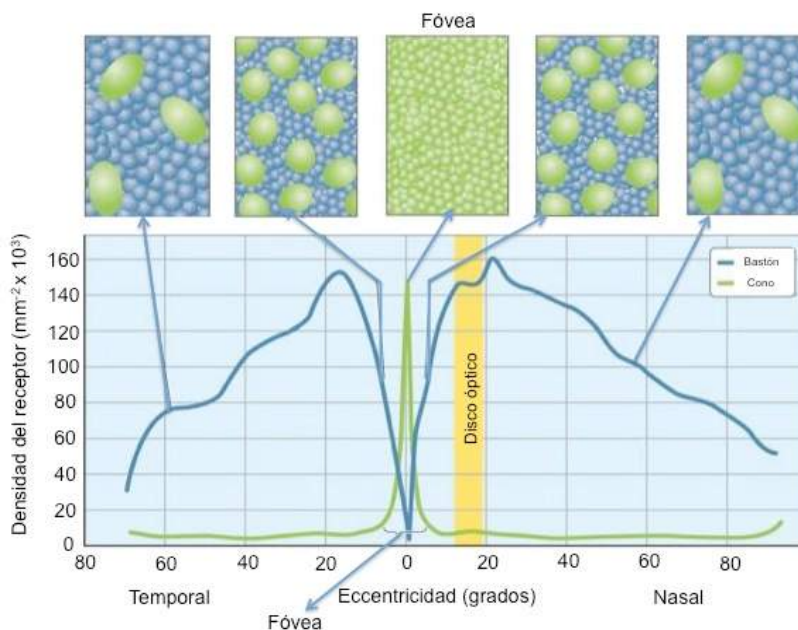
**Células bipolares.** Se extienden a diferentes niveles de la CNI y participan en procesos de diferentes tipos de células amacrinas y ganglionares. En la retina interna, las células bipolares hacen sinapsis con las células ganglionares, que son su principal objetivo transmitiendo señales desde los fotorreceptores ubicados en la retina externa a las capas más internas de la retina. Las células bipolares específicas hacen sinapsis en planos específicos limitando a nivel de sinapsis a las células que ocupan el mismo nivel. Cada tipo de célula bipolar presenta un receptor de neurotransmisores individual lo que conlleva a señalizaciones celulares diferentes. Una retina de mamífero tiene entre 9-11 tipos de células bipolares asociadas a conos (Masland, 2001).

**Células amacrinas.** Aunque las células ganglionares de la retina reciben información de las células bipolares, la mayoría de las sinapsis de las células ganglionares provienen de las células amacrinas que se ubican en la CNI. Por otro lado, las células amacrinas conectan con las células bipolares mediante sinapsis inhibitorias en el axón terminal de estas últimas, permitiendo el control de la salida de las células ganglionares. Las células amacrinas de diferencian de las células horizontales en que tienen otras funciones específicas como por ejemplo el control y la configuración de las células ganglionares. Las células amacrinas además de modular las señales de las células bipolares mediante la inhibición de las células ganglionares, también modulan la liberación del transmisor desde las células bipolares (Masland, 2001).

**Células interplexiformes.** Tienen cuerpos celulares grandes y se encuentran entre las células amacrinas. Dan retroalimentación desde la capa interna de la retina a los fotorreceptores y de neurotransmisor usan dopamina o ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Witkovsky et al., 1994).

**Células de neuroglia.** Aunque no participan directamente en la transferencia de señales neuronales, son esenciales para permitir el flujo de información de forma apropiada, dan estructura y soporte a las demás células de la retina y juegan un papel importante ante el daño por lesión o infección del tejido neural. Existen cuatro tipos de células de glía en la retina: 1) las células de Müller, son las más numerosas. Estas neuroglías se extienden por gran parte de la retina, son células de sostén que se orientan de forma radial y son las encargadas de la nutrición de los fotorreceptores y ayudan a la generación de los impulsos nerviosos, actuando de reservorio iónico durante la hiperpolarización del fotorreceptor por la luz (R. O. L. Wong, 2006); 2) los astrocitos, aparecen principalmente en las partes más internas de la retina; 3) las células de microglía, que son fagocíticas; y 4) las células de glía que rodean los axones de las células ganglionares.

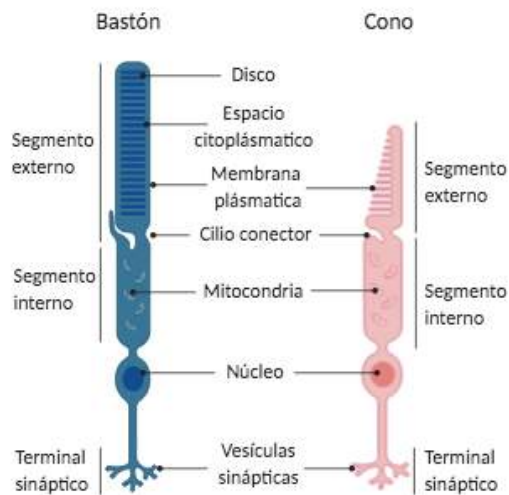
**Fotorreceptores.** Los núcleos de estas células se localizan en la CNE de la retina, donde interactúan con el EPR. Los fotorreceptores son neuronas especializadas sensibles a la luz y, a través de la cascada de fototransducción, convierten esta información en señales químicas y eléctricas que transmiten a las interneuronas de la retina externa. Los bastones y los conos son los dos tipos de fotorreceptores que encontramos en la retina (Figura 5) y entre ellos se diferencian por su distribución en la retina, por el patrón de sus conexiones sinápticas, por el tipo de fotopigmento que expresan y por su forma.



**Figura 5.** Distribución de los fotorreceptores en la retina modificada de Mustafi et al. (Mustafi et al., 2009).

Los bastones controlan la visión en condiciones de poca luz (visión escotópica), mientras que los conos son responsables de la visión diurna y la percepción del color (visión fotópica o en condiciones normales de iluminación). Los bastones se distribuyen principalmente en la periferia mientras que los conos se concentran en la mácula (parte central de la retina). La mayor densidad de conos se encuentra en la fovea (centro de la mácula), lo que permite una mayor agudeza visual (Figura 5). Los bastones son las células responsables de responder a estímulos que alcanzan un área de manera general, no son capaces de separar los pequeños detalles de una imagen visual. Es muy importante la localización y la estructura de los bastones ya que conduce a la división del campo visual del ojo en una pequeña región central con gran nivel de agudeza denominada fovea, y una zona periférica de menor agudeza pero que presenta mayor sensibilidad a la luz. Es por tanto esta región periférica la que se encarga de la visión nocturna, ya que con una baja intensidad de luz, los objetos no son perceptibles en la región de la fovea. En humanos, aproximadamente el 5% de los fotorreceptores son conos y el 95% bastones (Sung & Chuang, 2010).

**Los bastones.** Son neuronas especializadas formadas por el cuerpo celular, el segmento interno (IS) y el segmento externo (OS) del fotorreceptor (Figura 6). El cuerpo celular contiene el núcleo de la célula y está localizado en la CNE desde donde proyecta su axón hasta la capa plexiforme externa. El IS del bastón contiene ribosomas, que participan en la elaboración de membranas y componentes celulares, y muchas mitocondrias que proporcionan energía para los procesos de transducción del OS. Por otro lado, el OS del bastón es una estructura especializada constituido por una pila de discos huecos que contienen la rodopsina, pigmento visual que supone más del 90% de la cantidad total de proteínas de disco. La rodopsina es una proteína más sensible a la luz verde azulada, es decir, a una longitud de onda de aproximadamente 500 nanómetros. Los discos ópticos están renovándose continuamente y los más viejos se van desplazando hacia el EPR, donde tras ser fagocitados, se convierten en fagosomas durante el ciclo diurno, sobre todo al amanecer. El IS y OS del bastón están conectados a través del cilio conector, que actúa de puente entre ambos segmentos permitiendo el transporte de metabolitos desde el IS hasta el OS (transporte anterógrado) y también permite que los sustancias de desecho sean devueltas al cuerpo celular (transporte retrógrado). El OS de los bastones es mucho más delgado que el de los conos (2 y 6 micras, respectivamente) y ocupan principalmente la retina periférica. Hay aproximadamente 100 millones de bastones en la retina humana y ninguno está presente en la fovea (Sung & Chuang, 2010).



**Figura 6.** Descripción estructural de los fotorreceptores: bastones y conos. Imagen diseñada con el software BioRender.

Los bastones son las células responsables de responder a estímulos que alcanzan un área de manera general, no son capaces de separar los pequeños detalles de una imagen visual. Es muy importante la localización y la estructura de los bastones ya que

conduce a la división del campo visual del ojo en una pequeña región central con gran nivel de agudeza denominada fovea, y una zona periférica de menor agudeza pero que presenta mayor sensibilidad a la luz. Es por tanto esta región periférica la que se encarga de la visión nocturna, ya que con una baja intensidad de luz, los objetos no son perceptibles en la región de la fovea.

**Los conos.** Son neuronas especializadas similares a los bastones en cuanto a su estructura (Figura 6). Su OS tiene forma conoidea y contienen tres fotopigmentos diferentes. Los tres tipos de conos, denominados L (rojo), M (verde) y S (azul) se distinguen principalmente por la porción del espectro visible a la que es sensible cada uno de ellos. Las diferencias entre los tres tipos de conos se debe a la expresión de tres fotopigmentos diferentes denominados opsinas:

- La eritropsina presenta una mayor sensibilidad a longitudes de onda largas alrededor de 555-565 nm (conos tipo L).
- La cloropsina para longitudes de onda media alrededor de 530-537 nm (conos tipo M).
- La cianopsina tiene una mayor sensibilidad a longitudes de onda pequeñas que oscilan entre 415-430 nm (conos tipo S).

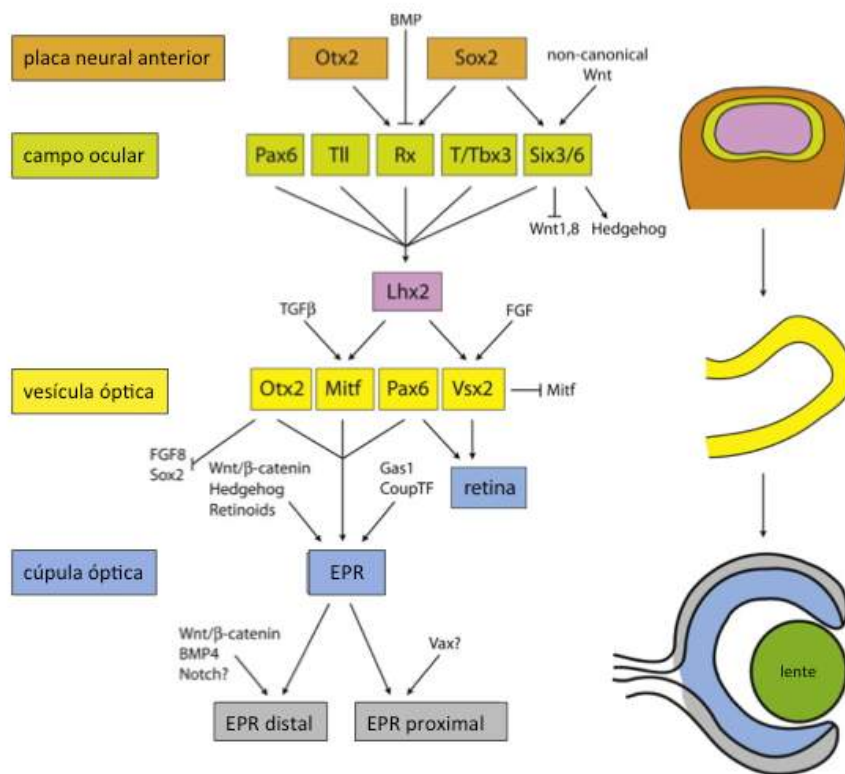
En la retina humana, encontramos los conos tipo L y M más concentrados en la región de la fovea y los conos tipo S, sin embargo, se localizan en la retina periférica y están ausentes en la fovea. Los conos tipo S representan aproximadamente un 5% del total de conos de la retina humana. En la generación de las imágenes los conos tipo L y M son los que tienen la función principal, mientras que los conos tipo S participan en menor medida pero su contribución es muy importante en la formación de imágenes ya que participan en el color. Hay en torno a 3-5 millones de conos en la retina (Roorda et al., 2001).

**Células del EPR.** Forman una monocapa de células pigmentadas hexagonales que forman la capa más externa o profunda de la retina. En la retina humana hay aproximadamente 4 millones de células de EPR espaciadas de manera uniforme a lo largo de toda la retina. Cada célula de EPR tiene contacto 30-40 fotorreceptores. El EPR está separado de los fotorreceptores por el espacio subretiniano. Se trata de un espacio extracelular especializado donde el EPR proyecta sus microvellosidades envolviendo a los segmentos externo de los fotorreceptores. Son microvellosidades apicales largas y delgadas que facilitan el transporte transepitelial entre el EPR y la retina. La superficie basal del EPR contiene inflexiones complejas que soportan el movimiento molecular y esta polaridad basal-apical se refleja en la organización de los orgánulos de EPR y las proteínas de membrana. En la región apical se localizan los melanosomas mientras que los lisosomas, el retículo endoplásmico, las mitocondrias, el aparato de Golgi, los gránulos de lipofuscina y melanolipofuscina y el núcleo se ubican en el lado basal (Ao et al., 2018; La Cour, 2008).

El desarrollo y diferenciación del epitelio pigmentario de la retina es esencial para el propio desarrollo de la neuroretina. *MITF* y *OTX2* son factores de transcripción esenciales en la diferenciación del EPR. *MITF* (EPR) y *VSX2* (NR) reprimen mutuamente la expresión del otro en la vesícula óptica y así establecen el límite temprano entre el EPR y la NR. Las principales vías de señalización como FGF, TGF $\beta$ , WNT, BMP, Notch e Hippo, desempeñan un papel esencial durante la especificación del epitelio pigmentario regulando la expresión específica de *MITF* y *OTX2*. El factor de transcripción mediado por WNT,  $\beta$ -catenina, activa directamente la expresión de *OTX2* y *MITF*. Además, las vías de señalización WNT y BMP, desde el ectodermo superficial, promueven la especificación del EPR a través de un mecanismo independiente de  $\beta$ -catenina, donde WNT inhibe GSK3b y BMP activa pSmad. La señalización autónoma de las células del EPR es esencial para especificar su destino y para un crecimiento adecuado de las mismas (Miesfeld & Brown, 2019).

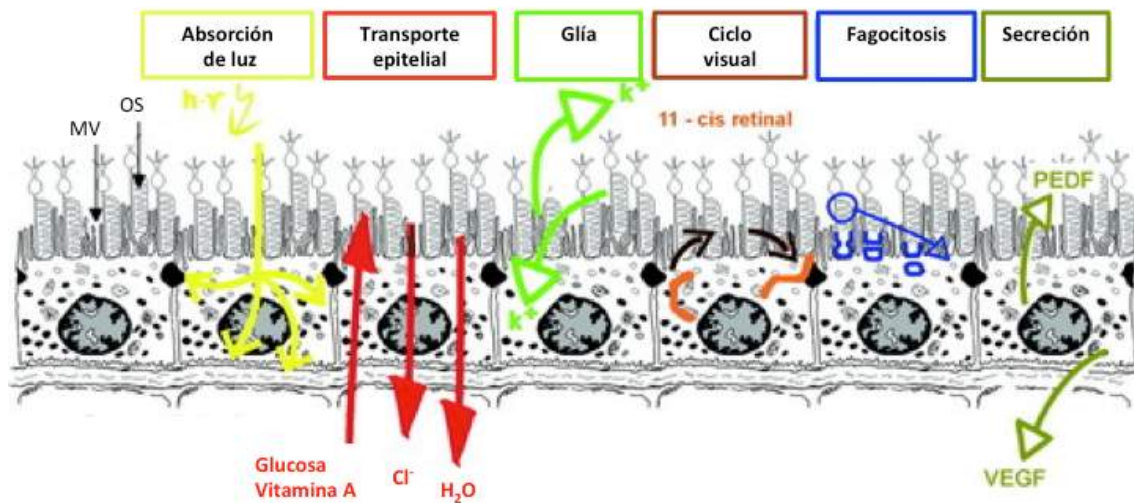
*PAX6* y *MITF* actúan reiteradamente durante la especificación y diferenciación del EPR (Figura 7). Al principio, *PAX6* activa la transcripción de una isoforma de la proteína *MITF* específica del EPR y, posteriormente, actúa en paralelo con *MITF* para regular la transcripción de otros genes de RPE como *TRY*, *DCT* y *TRYP1*. *BEST1*, es un canal de cloro dependiente de calcio el cual es un marcador de EPR diferenciadas y cuya transcripción está regulada de manera coordinada por *MITF*, *OTX2* y *SOX9*. *SOX9* y *LHX2* actúan activando genes del ciclo visual como *RPE65*, *RGR* y *RLBP1*. La ruta de SHH es importante también para la diferenciación del EPR (Fuhrmann et al., 2014; Miesfeld & Brown, 2019).





**Figura 7.** Regulación del desarrollo EPR mediante señales extracelulares y factores de transcripción modificada de Fuhrmann et al. (Fuhrmann et al., 2014)

El EPR es esencial para la función visual. Los procesos en los que están implicadas las células de este epitelio son la absorción de la luz dispersa, el transporte activo de metabolitos, la provisión de una barrera hematorretiniana, la regeneración de los pigmentos visuales, la fagocitosis de los OS y la secreción de factores de crecimiento (Figura 8). La absorción de la luz reflejada y dispersa por parte del EPR permite optimizar la calidad de la imagen y protege a la retina del daño oxidativo causado por los radicales libres reactivos, resultantes de la combinación de la exposición constante a la luz, la alta actividad metabólica, la elevada tensión local de oxígeno y la fotooxidación de la lipofuscina. La absorción de la luz se produce a través de la melanina, que se sintetiza y se almacena en los melanosomas, y se sabe que causa la fotooxidación de la lipofuscina, proteína lipídica que se acumula debido a la edad y a la fagocitosis de OS. Otro mecanismo de defensa frente al daño oxidativo es el sistema de antioxidantes intrínsecos del EPR, el cual está constituido por enzimas como la catalasa y la superóxido dismutasa, y por antioxidantes no enzimáticos como el  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno y ascorbato. El glutati6n también funciona como otro antioxidante el EPR. Por último, otra línea de defensa es la capacidad fisiológica de la célula para reparar ADN, lípidos y proteínas dañados (Ao et al., 2018; Strauss, 2005).



**Figura 8.** Funciones del epitelio pigmentario de la retina modificada de Strauss et al. (Strauss, 2005). Abreviaturas: OS (segmento externo); MV (microvellosidades); VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular); PEDF (factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario).

Las uniones estrechas entre células adyacentes del EPR se unen al citoesqueleto de actina y forman la barrera hematorretiniana. Esta barrera evita el transporte paracelular de moléculas grandes o toxinas transportadas por la sangre. El EPR transporta iones, agua y productos metabólicos finales desde el espacio subretiniano a la coroides y viceversa. Desde la sangre hacia los fotorreceptores, el EPR transporta nutrientes como ácidos grasos, retinal y glucosa, por lo que desempeña un papel esencial en el mantenimiento de los fotorreceptores (la Cour & Tezel, 2005; Strauss, 2005).

El ojo es un órgano que cuenta con un gran privilegio de defensa inmune y esto es gracias al papel fundamental que ejerce el EPR. En primer lugar, la barrera hematorretiniana formada por las uniones estrechas entre las células crea un microambiente que permite que la infiltración de los componentes del sistema inmunitario se regule cuidadosamente. En segundo lugar, el EPR es capaz de secretar factores inmunosupresores que disminuyen la actividad celular. En tercer lugar, es capaz de inducir apoptosis debido a la presencia del ligando Fas. Además, las células del EPR expresan el complejo de histocompatibilidad de clase I y II que pueden actuar como células presentadoras de antígeno en el ojo (Ao et al., 2018).

El EPR también tiene un papel importante en la absorción, almacenamiento y metabolismo de la vitamina A y sus compuestos relacionados. Constantemente, el retinal se está intercambiando entre los fotorreceptores y el EPR, y esto se debe a que tras la absorción de fotones, los fotorreceptores son incapaces de volver a isomerizar el *all-trans*-retinal en *11-cis*-retinal. Para

mantener la excitabilidad de los fotorreceptores, *all-trans-retinal* es transportado al EPR, re-isomerizado a *11-cis-retinal* y transportado de nuevo a los fotorreceptores. Este proceso se conoce como el ciclo visual de la retina (Strauss, 2005).

Otra función con respecto al mantenimiento y supervivencia de los fotorreceptores es la fagocitosis de los discos externos que se desprenden por el proceso de renovación de los fotorreceptores. Este proceso está controlado por el ritmo circadiano. La renovación de los OS de los fotorreceptores es necesaria por varias razones como mantener la excitabilidad del fotorreceptor, reciclar nutrientes como el retinal y para evitar el daño oxidativo debido a la foto-oxidación de lípidos y proteínas del OS. Dado que las células del EPR normalmente no se dividen, la carga de material que estas células deben ingerir y degradar en su vida útil, supera con creces la de cualquier otra célula fagocítica. Probablemente, como consecuencia de esta carga fagocítica masiva, los gránulos de lipofucsina se acumulan con la edad y una acumulación excesiva de estos gránulos puede interferir en las funciones del EPR debido a la generación de radicales libres, que pueden causar la muerte celular del EPR y, por lo tanto, de los fotorreceptores desencadenando enfermedades de la retina como la degeneración macular (Ao et al., 2018; Boulton et al., 1993; Nilsson et al., 2003; Strauss, 2005).

El desarrollo del EPR y los fotorreceptores son interdependientes. Con el fin de mantener la integridad de la retina, la coroides y el endotelio, el EPR produce y secreta varios mediadores de proteínas, citoquinas y factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario (PEDF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) entre otros (Ao et al., 2018; Strauss, 2005).

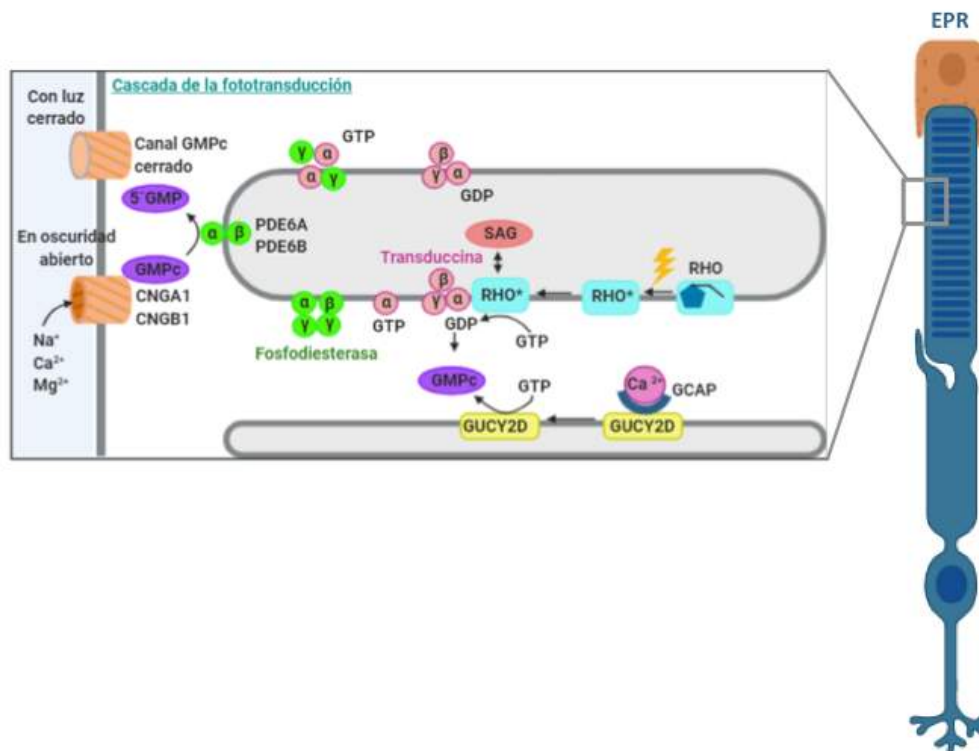
El fallo de alguna de las funciones descritas anteriormente del EPR puede conducir a la degeneración de la retina, con pérdida de la función visual y subsecuente ceguera.

#### 1.1.2.1. Fototransducción.

La cascada de la fototransducción es el proceso a través del cual un fotón de luz se convierte en una señal eléctrica que se transmite al cerebro. La cascada enzimática tiene lugar en el OS de los fotorreceptores y es, básicamente igual, tanto en bastones como en conos. La diferencia entre ambos son los pigmentos visuales, que en el caso de los bastones es la rodopsina mientras que en los conos son las tres opsinas (eritropsina, cloropsina y cianopsina).

En oscuridad, en el OS de los fotorreceptores, cuatro moléculas de guanosin

monofosfato cíclica (cGMP) se unen a un canal catiónico dependiente de cGMP, manteniéndolo abierto, lo que permite que los iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) fluyan hacia la célula (en oscuridad, los fotorreceptores están despolarizados). Las células están continuamente produciendo cGMP debido a la enzima guanilato ciclasa (GUCY2D) (Figura 9). La rodopsina está formada por la opsina, proteína transmembrana unida covalentemente a un cromóforo derivado de la vitamina A llamado retinal. La opsina es una cadena polipeptídica formada por 348 aminoácidos y consta de tres dominios diferenciados: el dominio transmembrana, el dominio extracelular y el citoplasmático que es donde se produce la transducción de la señal luminosa. El retinal es la parte más sensible a la luz y tiene dos conformaciones, *cis* y *trans*. Cuando se absorbe un fotón de luz, la rodopsina se activa y el 11-*cis*-retinal pasa a su conformación *all-trans*. La rodopsina activada (metarrodopsina,  $\text{RHO}^*$ ) cataliza el intercambio de los nucleótidos guanosin difosfato (GDP) por guanosin trifosfato (GTP) en la subunidad  $\alpha$ - de una proteína G llamada transducina, a la que se une formando un gran complejo.



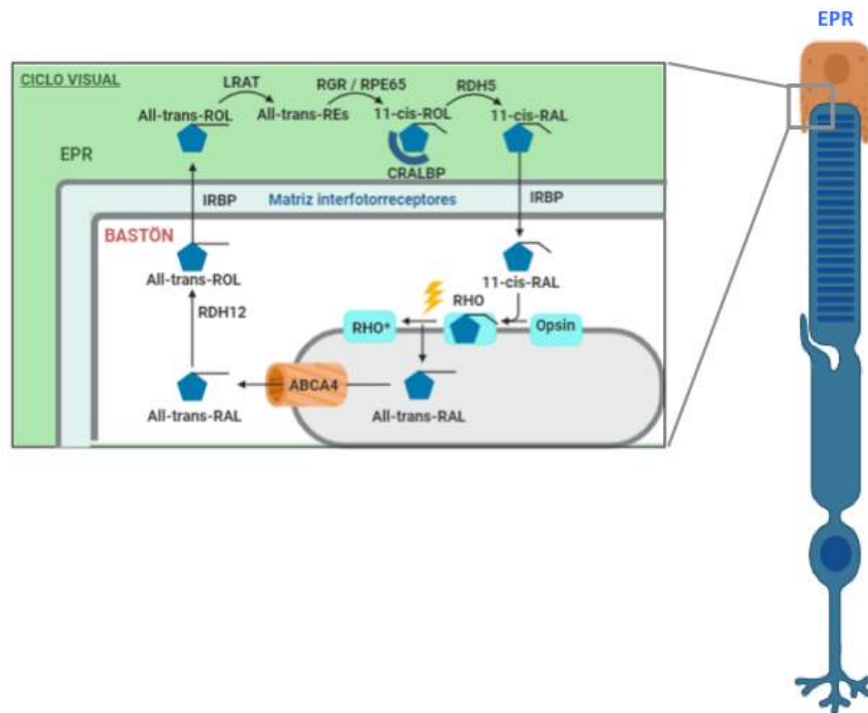
**Figura 9.** Cascada de fototransducción en bastones. Tras la fotoactivación, la amplificación de la señal está mediada por la subunidad  $\alpha$ - de la transducina y la fosfodiesterasa, dando como resultado el cierre del canal dependiente de cGMP, la hiperpolarización de la célula y la liberación reducida de glutamato en la sinapsis. Abreviaturas: EPR (epitelio pigmentario de la retina); RHO (rodopsina);  $\text{RHO}^*$  (rodopsina activada); GTP (guanosin trifosfato); GDP (guanosin difosfato); cGMP (guanosin monofosfato cíclica); GUCY2D (guanilato ciclasa); GCAP (activador de guanilato ciclasa); CNGA y CNGB (canales alfa y beta dependientes del nucleótido cíclico); PED6A y PED6B (fosfodiesterasas); SAG (arrestina). Modificada de Den Hollander et al. (Den Hollander et al., 2010).

La transducina activada, a su vez, activa a la fosfodiesterasa dependiente de cGMP (cGMP-PED), la cual cataliza la hidrólisis de moléculas de cGMP. La rápida disminución de los niveles de cGMP conduce al cierre de los canales de  $\text{Na}^+$ , lo que hace que se produzca la hiperpolarización de los bastones. El cierre de estos canales provoca la inhibición de la liberación de glutamato en la región sináptica y por tanto una disminución de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en los bastones. La hiperpolarización de la célula da como resultado la transmisión de una señal a través de las diferentes capas de la retina, hacia el nervio óptico y, por último, hasta llegar al cerebro.

Después de la fotoexcitación, la cascada visual termina en varios puntos para que el fotorreceptor vuelva a su estado de oscuridad: la guanilato ciclasa vuelve a sintetizar cGMP (a partir de GTP) y se reactiva la caída de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular; la rodopsina activada es fosforilada por la rodopsina quinasa y se une a la proteína arrestina (SAG) para detener cualquier interacción con la transducina; y la transducina en su subunidad  $\alpha$ - y PDE son inactivadas por la hidrólisis de GTP a GDP, debido a la actividad intrínseca de GTPasa de la transducina. Los canales activados por cGMP vuelven a abrirse conforme aumenta la concentración de cGMP, lo que permite que los fotorreceptores vuelvan a su estado despolarizado ya que los iones positivos de sodio y calcio fluyen hacia ellos (Den Hollander et al., 2010; Hargrave, 2001; Kennan et al., 2005).

#### 1.1.2.2. Ciclo visual

El EPR desempeña un papel esencial en la reisomerización del *all-trans*-retinal a *11-cis*-retinal después de la fototransducción, dado que los fotorreceptores carecen de la función isomerasa *cis-trans*. El ciclo visual es una vía de reacciones enzimáticas para reciclar los retinoides que se utilizan durante la detección de la luz en los fotorreceptores (Figura 10). Después de la exposición a la luz, *all-trans* retinal es transportado al citoplasma por la proteína casete de unión a ATP, subfamilia A, miembro 4 (ABCA4) donde *all-trans*-retinal se convierte en *all-trans*-retinol por la acción la enzima retinol deshidrogenasa (RDH12). *All-trans*-retinol es transportado al EPR, donde se une a una proteína de unión en presencia del catalizador lecitina retinol aciltransferasa (LRAT) para formar *all-trans*-retinil éster. RPE65 isomeriza *all-trans*-retinil éster para producir *11-cis*-retinol antes de ser convertido en *11-cis*-retinal por acción de la *11-cis*-retinol deshidrogenasa. Por último, *11-cis*-retinal es transportado de nuevo al OS del fotorreceptor, donde se une a la rodopsina, volviéndola sensible a la luz (Ao et al., 2018; Den Hollander et al., 2010; Strauss, 2005; Wright et al., 2010).



**Figura 10.** Ciclo visual que tiene lugar en los bastones y el epitelio pigmentario de la retina. Tras la fotoactivación, *11-cis*-retinal se convierte en *all-trans*-retinal y se disocia de la rodopsina activada. Posteriormente, *all-trans*-retinal se recicla para producir *11-cis*-retinal a través de una serie de reacciones enzimáticas que ocurren en el EPR. Abreviaturas: RAL (retinal); RHO (rodopsina); RHO\*(rodopsina activada); ABCA4 (casete de unión a ATP); RDH12 (retinol deshidrogenasa); ROL (retinol); IRBP (proteína de unión a retinol intersticial); LRAT (lecitina retinol acetiltransferasa); RPE65 (proteína específica de epitelio pigmentario de la retina); CRALBP (proteína de unión a retinaldéhido); RDH (retinol deshidrogenasa); RE (retinil éster); EPR (epitelio pigmentario de la retina). Modificada de Den Hollander et al. (Den Hollander et al., 2010).

Para diseñar nuevas aproximaciones de terapias avanzadas y sobre todo de terapia génica es fundamental conocer la función de muchas enzimas que participan en el ciclo visual y la fototransducción, ya que muchas mutaciones en los genes que codifican estas enzimas producen distrofias de la retina, un ejemplo son las mutaciones que se pueden producir en el gen *RPE65* que causan la ceguera más frecuente en la infancia, conocida como la amaurosis congénita de Leber (LCA). La pérdida de la función de *RPE65* conduce a un defecto en la síntesis de *11-cis*-retinal que finalmente produce degeneración de los fotorreceptores y ceguera. Esta distrofia retiniana, en la actualidad, se puede tratar con terapia génica debido a la administración de *RPE65* humano a través de un vector viral no integrativo que tiene capacidad de infectar las células del EPR.

## **1.2. Enfermedades degenerativas de la retina (EDR)**

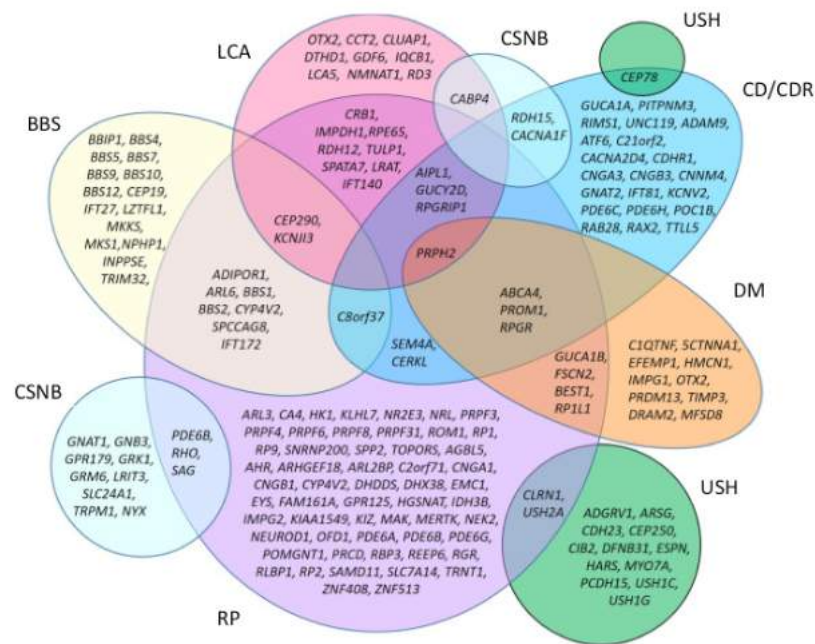
Las EDR son un conjunto heterogéneo de enfermedades neurodegenerativas que provocan una pérdida de progresiva y severa de la visión, ya que alteran la anatomía y la función de la retina. Son la principal causa de ceguera en el mundo desarrollado y afecta a 1 de cada 2000 personas. Las EDR se pueden clasificar en enfermedades degenerativas hereditarias y enfermedades degenerativas no hereditarias. La mayoría de estas patologías no tienen cura, aunque el conocimiento sobre las bases moleculares de estas enfermedades de la retina han progresado mucho durante los últimos años. Conocer acerca de los mecanismos moleculares de la enfermedad ha mejorado la evaluación diagnóstica de los pacientes mediante pruebas genéticas y la generación de conocimiento en esta área ha permitido comprender la etiología molecular de la enfermedad y desarrollar diferentes enfoques terapéuticos como son la terapia génica y celular, entre otros (Berger et al., 2010).

Según Berger et al., las principales enfermedades retinianas pueden clasificarse en cuatro grupos: i) enfermedades dominantes en bastones; ii) enfermedades dominantes en conos; iii) degeneraciones retinianas generalizadas de los fotorreceptores (afectan tanto a los conos como a los bastones); y finalmente (iv) vitreoretinopatías exudativas y erosivas.

Los trastornos que afectan principalmente a los bastones se inician con nictalopía (ceguera nocturna) y pueden progresar hasta afectar al campo visual periférico conservando la visión central. Por el contrario, las distrofias asociadas a conos se manifiestan inicialmente con una pérdida de la agudeza visual central y de la visión en color y no suelen afectar significativamente a la visión periférica a menos que también se vean afectados los bastones. Las distrofias maculares afectan a los conos que están dentro de la mácula, dejando intactas las poblaciones periféricas.

Las formas más común de EDR es la retinitis pigmentosa (RP). El sello patológico de la RP es la degeneración primaria de los bastones y la consiguiente degeneración del EPR y conos con una posterior progresión hacia la ceguera. En el caso de RP, se han encontrado muchas mutaciones genéticas en genes que juegan un papel esencial en las funciones de los fotorreceptores, sin embargo, las mutaciones en otros tipos celulares como el EPR pueden causar la enfermedad (Figura 11). Curiosamente, la apoptosis parece no ser el principal mecanismo de muerte celular de los fotorreceptores. En cambio, las células experimentan un agotamiento de la energía, un aumento del estrés oxidativo y una reparación del ácido desoxiribonucleico (ADN) desregulada asociados al mecanismo de muerte celular tipo necrosis (Sancho-Pelluz et al., 2008).





**Figura 11.** Heterogeneidad genética de las distrofias retinianas. Diagrama de Venn de los enfermedades retinianas hereditarias más comunes con zonas superpuestas donde los mismos genes son responsables de diferentes trastornos. Abreviaturas: BBS (síndrome de Barder-Bieldl); CD/CRD (distrofias de cono/ distrofias de conos y bastones); CSNB (ceguera nocturna congénita estacionaria); LCA (amaurosis congénita de Leber); DM (degeneración macular); RP (retinosis pigmentaria); USH (síndrome de Usher). Modificada de Sangermano et al. (Sangermano et al., 2020).

Por otro lado, la EDR no hereditaria más frecuente es la degeneración macular asociada a la edad (DMAE). Aunque la DMAE no se transmite de padres a hijos, si existen una serie de factores genéticos que aumentan el riesgo de padecer la enfermedad. A continuación, se describen en detalle la DMAE y la RP, ya que el diseño de las terapias evaluadas en esta tesis están dirigidas a estas dos patologías.

### 1.2.1. Degeneración macular asociada a la edad.

La DMAE (OMIM #603075) es la primera causa no hereditaria de ceguera del adulto en países desarrollados. Se cree que esta enfermedad afecta a más de 9,9 millones de personas en Europa y aproximadamente 196 millones a nivel mundial. Debido al envejecimiento de la población, se ha calculado que la cantidad de pacientes que puede padecer la enfermedad se incrementará hasta los 288 millones en 2040. La prevalencia total de esta enfermedad es del 3,3% en la población mayor de 65 años y se incrementa hasta un 10% a partir de los 70 años (Augood et al., 2006; Colijn et al., 2017; W. L. Wong et al., 2014). El coste estimado para el tratamiento y manejo de las secuelas de la DMAE en Estados Unidos ronda los 5 billones de dólares anuales.



Numerosos estudios epidemiológicos realizados en la DMAE han proporcionado información muy valiosa no solo sobre la prevalencia e incidencia, sino también sobre la historia y los factores de riesgo de la enfermedad. Los principales factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad son: la edad (mayor de 55 años), la predisposición genética (asociada a polimorfismos de nucleótido único (SNP) de riesgo), sexo femenino, hipertensión arterial, hipercolesterolemia, arterioesclerosis y tabaquismo. Entre los componentes no genéticos, el envejecimiento y el tabaquismo son los principales factores de riesgo. Por otro lado, con el uso de nuevas tecnologías enfocadas en genética médica se ha demostrado que la predisposición genética ejerce un gran impacto en el desarrollo de la enfermedad. La DMAE parece ser que se desarrolla por la interacción de factores medioambientales, la predisposición genética y el envejecimiento, como ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas (Jin et al., 2019). Además, existen diferencias raciales/étnicas que también afectan a la prevalencia de la enfermedad, siendo la población caucásica de mayor riesgo a padecer DMAE con respecto a la población hispana o negra (Fritsche et al., 2014; Kinnunen et al., 2012; R. Klein et al., 2004).

Los mecanismos moleculares por los cuales se produce la DMAE son muy complejos y muchos de estos mecanismos interactúan entre sí para finalmente producir atrofia de las células del EPR y posterior degeneración crónica de los conos en la región macular. Actualmente, se desconoce el orden exacto de como ocurren todos los eventos que culminan con la pérdida de la visión central y existen muchas hipótesis al respecto. Una de ellas se basa en el incremento del estrés oxidativo a nivel del EPR como uno de los primeros desencadenantes de todo el proceso degenerativo. El EPR al igual que los fotorreceptores son dos tipos celulares que diariamente están expuestos a altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido principalmente al alto consumo de O<sub>2</sub>, exposición diaria a luz ultravioleta y generación de productos derivados del ciclo visual como el A2E, un metabolito tóxico del retinol (Kinnunen et al., 2012; Tokarz et al., 2013). Debido al envejecimiento, algunos de los mecanismos celulares de defensa ante los ROS, como las enzimas antioxidantes tipo superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa y reductasa, se pueden ver mermados conduciendo entre otras afecciones a la acumulación de daños a nivel mitocondrial y ruptura del ADN (Tokarz et al., 2013). Esto a su vez conduciría a una disminución crónica en la producción de ATP por alteraciones en el ciclo de Krebs y disminución del NAD<sup>+</sup> con la consecuente caída del balance energético afectando a procesos claves de la homeostasis celular como la autofagia y la degradación de productos de desecho (M. Zhang et al., 2020). Posteriormente, estos productos de desecho celular y otros provenientes del mismo endotelio se comenzarían a acumular entre el EPR y la membrana de Bruch causando la formación de

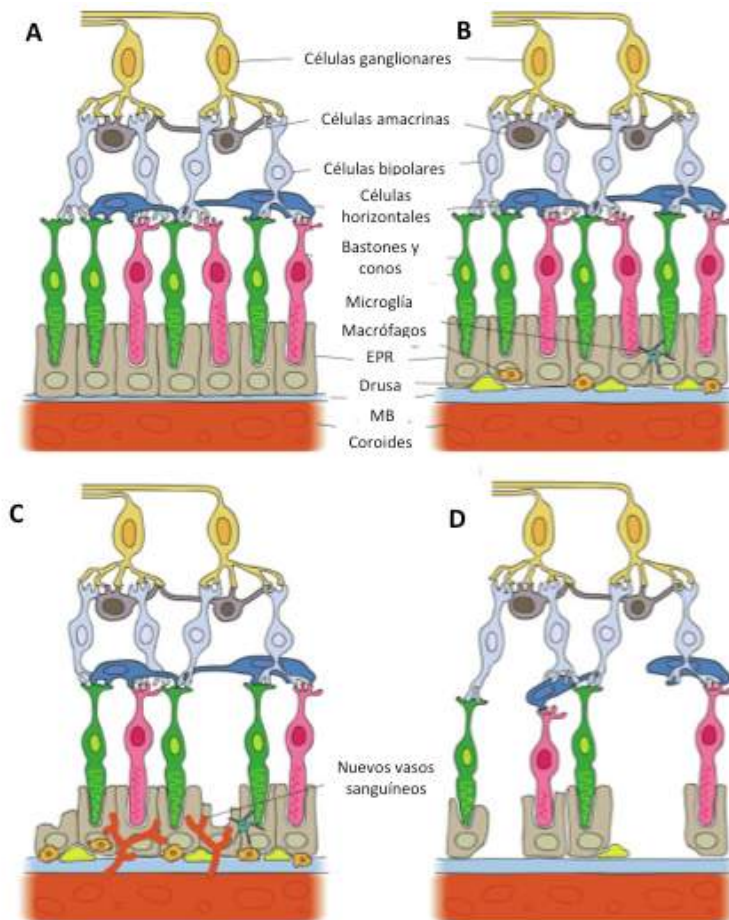
drusas y alteraciones en el grosor y permeabilidad de esta membrana basal (Bowes Rickman et al., 2013). Finalmente, la acumulación de drusas y cambios en la permeabilidad de la barrera hematorretiniana permitiría la entrada de células inflamatorias produciendo activación del complemento y causando una respuesta inflamatoria local exagerada, la cual incluso facilitaría la formación de más drusas e incrementaría el estrés oxidativo crónico (Kauppinen et al., 2016). Toda la combinación de estos factores conduciría a la disfunción del EPR cambiando la polaridad de secreción de moléculas claves para el mantenimiento de la retina y de los vasos coroideos como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF).

#### 1.2.1.1. Características clínicas de la degeneración macular asociada a la edad.

La DMAE es una enfermedad que comienza con la formación de depósitos focales de lípidos y proteínas en la membrana de Bruch y el EPR, conocidos como drusas (Figura 12B). En personas sanas mayores de 40 años puede haber presencia de drusas de tamaño pequeño sin que presenten ningún síntoma, pero si drusas de mayor tamaño se acumulan en torno a la mácula, el paciente puede empezar a tener una pérdida de la visión central (P. T. V. M. De Jong, 2006). Si la enfermedad progresa, pueden presentarse dos tipos de DMAE:

**DMAE húmeda o exudativa.** Representa aproximadamente en torno al 10-15% de los casos y se caracteriza porque su evolución es rápida y el pronóstico visual es peor (Figura 12C). El primer signo de este tipo de DMAE es la extravasación de un líquido seroso o hemorrágico que hace que la neuroretina o el EPR se desprenda de la membrana de Bruch provocando una alteración en la disposición de los fotorreceptores. Después, se produce una proliferación anormal de los vasos que irrigan la coroides llegando a infiltrar la retina dando lugar a la neovascularización coroidal (NVC). Muchos de estos vasos aberrantes pueden ocasionar hemorragias que luego llevan a la formación de extensas áreas de cicatrización en la retina (Ambati & Fowler, 2012; Bhutto & Lutty, 2012; Lim et al., 2012).

**DMAE seca o atrofia geográfica.** Representa del 85-90% del total de casos y se caracteriza por una evolución lenta y progresiva (Figura 12D) de la pérdida del EPR y de los fotorreceptores originando áreas de atrofia focal sobre la región macular conocida como atrofia geográfica (AG). (Ambati & Fowler, 2012; Bhutto & Lutty, 2012; Lim et al., 2012). Muchos pacientes con AG progresa a NVC, pero hay casos donde la NVC se da desde el inicio de la enfermedad. Incluso hay algunos pacientes que desarrollan DMAE seca en un ojo y húmeda en el otro



**Figura 12.** Representación gráfica de la anatomía de la retina en estadios normales y distintos tipos de DMAE. **A)** Retina normal con las distintas capas de células que la componen. **B)** A medida que la enfermedad avanza, la membrana de Bruch se espesa y aparecen las primeras drusas entre la membrana de Bruch y el EPR, atrayendo células inmunitarias como los macrófagos y la microglía. Eventualmente, la enfermedad puede progresar en una de las formas tardías: **C)** DMAE húmeda que se caracteriza por la invasión de vasos sanguíneos anormales y una acumulación de macrófagos y **D)** DMAE seca donde se observa

una degeneración general del EPR y los fotorreceptores. Abreviaturas: EPR (epitelio pigmentario de la retina) y MB (membrana de Bruch). Modificada de De Jong et al. (E. K. de Jong et al., 2020).

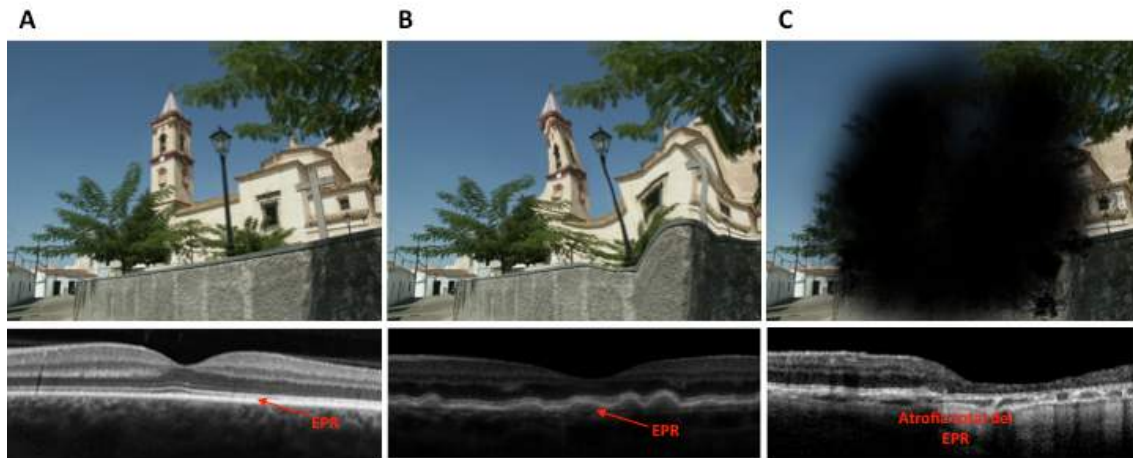
## SIGNOS Y SINTOMAS DE LA DMAE

**Visión deformada de los objetos o metamorfopsia.** Se manifiesta con una percepción ondulada de las líneas rectas y con las imágenes distorsionadas (Figura 13B).

**Pérdida progresiva de la agudeza visual.** Incapacidad de percibir formas y objetos que va en aumentando pudiendo llegar a producir una ceguera irreversible.

**Perdida de la visión central.** A medida que la enfermedad progresa el centro del campo visual del paciente puede estar manchado, distorsionado o perderse (escotoma central) lo que le provoca una incapacidad para realizar actividades cotidianas como conducir o leer, incluso pueden tener dificultad para diferenciar colores y reconocer rostros (Figura 13C).

**Sensibilidad al contraste.** Es más complicado distinguir las texturas y los cambios en el ambiente. El no ser capaz de detectar contrastes y texturas leves sobre aceras o escaleras puede ser peligrosa y aumentar el riesgo de caídas.



**Figura 13.** Simulación del campo visual y tomografía de coherencia óptica. **A)** Individuo sano. **B)** Paciente con DMAE en fase temprana. **C)** Paciente con DMAE tardía. Abreviatura: EPR (epitelio pigmentario de la retina).

**Poca tolerancia a los cambios en los niveles de luz.** Puede ser difícil que los ojos se adapten rápidamente a los cambios de luz como ocurre al conducir o caminar al atardecer, cuando el sol descende o cuando se pasa de una habitación muy iluminada a otra oscura.

**Necesidad de niveles más altos de luz.** Se pueden necesitar niveles de luz más brillantes para leer, cocinar y realizar tareas cotidianas.

**Percepción distorsionada de la profundidad.** La incapacidad de controlar las distancias puede hacer más difícil caminar, lo que puede llegar a provocar caídas.

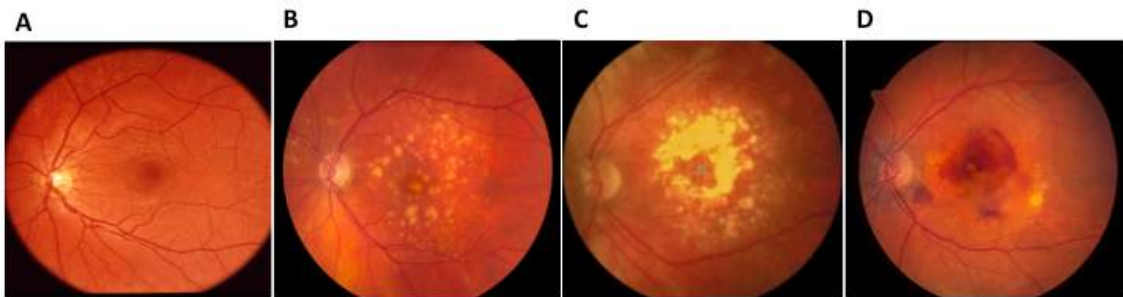
**Presencia de alucinaciones visuales conocidas como Síndrome de Charles Bonnet.** Este síntoma no es exclusivo de la DMAE y se puede presentar en otras enfermedades oftalmológicas que conducen a pérdida de la agudeza visual severa. Este tipo de alucinaciones pueden observarse hasta en un 10% de los casos de DMAE y en muchas ocasiones no se diagnostica. La principal característica de estas alucinaciones es que no se acompañan de trastornos psiquiátricos y se deben a la inadecuada aferencia de impulsos nerviosos generados en la retina, originando una mala interpretación de los estímulos visuales a nivel del SNC.

## DIAGNÓSTICO DE LA DMAE

**Test o rejilla de Amsler.** Consiste en un test rápido y simple que se puede

utilizar para detectar los primeros síntomas de alguna posible alteración de la zona central de la retina, lugar donde está situada la mácula. La rejilla de Amsler es un gráfico con una cuadrícula simple. El paciente mira a través de la cuadrícula para ver el grado de afectación o metamorfopsia.

**Estudio del fondo de ojo mediante oftalmoscopia.** Se realiza una exploración profunda de la mácula y este estudio nos permite detectar el tipo de DMAE que padece el paciente. La DMAE seca se caracteriza por la presencia de drusas grandes, alteraciones en el EPR y atrofia corioretiniana (Figura 14C). La DMAE húmeda se caracteriza por la presencia de un líquido subretiniano que se observa como una elevación de la retina, edema retiniano, cambio de coloración gris-verde debajo de la mácula, exudados maculares o perimaculares, desprendimiento del EPR y hemorragia subretiniana macular o perimacular (Figura 14D).



**Figura 14.** Estudio de fondo de ojo. **A)** Individuo sano. **B)** DMAE en fase temprana con drusas confluentes en torno a la región macular. **C)** DMAE seca o atrofia geográfica. **D)** DMAE húmeda.

**Estudio del árbol vascular mediante angiografía de fluoresceína.** Muestra y caracteriza las membranas neovasculares coroideas subretinianas, por lo que es útil para el diagnóstico de la DMAE húmeda, además, puede delinear áreas de atrofia geográfica.

**Estudio de la retina mediante tomografía de coherencia óptica (OCT).** Nos permite evaluar las diferentes capas de la retina permitiendo distinguir entre los dos tipos de DMAE atendiendo a la degeneración producida en las capas de la retina. En el caso de la DMAE seca, aporta información sobre los depósitos drusenoides subretinianos, los desprendimientos drusenoides del EPR, la coalescencia de las drusas y, además, ayuda a identificar el líquido intrarretiniano y subretiniano en ausencia de neovascularización coroidea (Gallego-Pinazo et al., 2012).

**Estudio genético.** Permite evaluar a través de un análisis de sangre si hay SNP de riesgo asociados con la enfermedad.

## 1.2.1.2. Polimorfismos de nucleótido único prevalentes en la DMAE.

Con el uso de las nuevas tecnologías enfocadas en genética médica se ha demostrado que la predisposición genética tiene un gran impacto como factor de riesgo en el desarrollo de la DMAE. Se han identificado numerosos SNPs que incrementan el riesgo de padecer la enfermedad (Black & Clark, 2016; Fritsche et al., 2014; Priya et al., 2012), quedando reflejados en la Tabla 3.

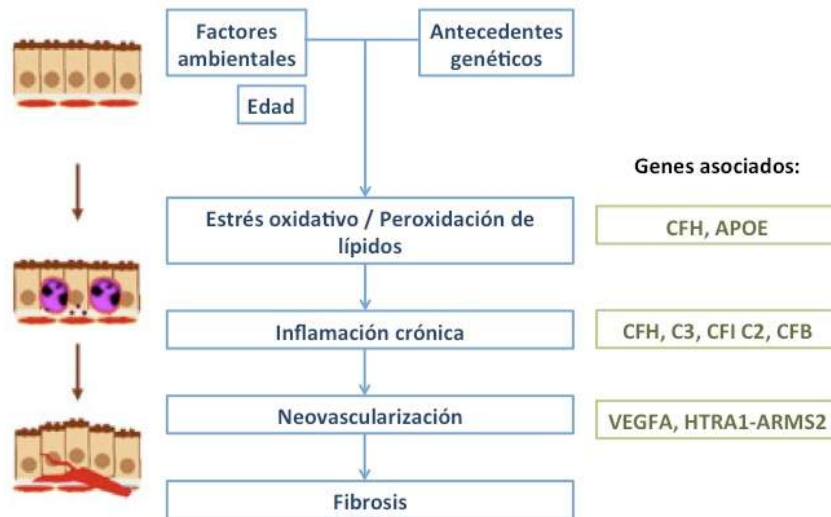
**Tabla 3.** SNPs prevalentes en DMAE identificados hasta la fecha.

Localización	GEN	Vías y funciones implicadas
rs10490924/T	ARMS2/HTRA1	Desconocida, probablemente mitocondrial/crecimiento celular
rs10737680/A	CFH	Complemento
rs429608/G	C2/CFB	Complemento
rs2230199/C	C3	Complemento
rs574982/G	TIMP1	Degradación matrix extracelular
rs4420638/A	APOE	Metabolismo lipoproteínas, arterosclerosis
rs1865163/G	CETP	Metabolismo lipoproteínas, arterosclerosis
rs943080/T	VEGFA	Angiogénesis
rs13278062/T	TNFRSF10A	Muerte celular
rs13081855/T	COL8A1/FILIP1L	Matriz extracelular/actividad antiangiogénica de células endoteliales
rs8017304/A	RAD51B	Recombinación homóloga
rs4698775/G	CFI	Complemento
rs920915/C	LIPC	Metabolismo lipoproteínas, arterosclerosis
rs334353/T	TGFBR1	Amplia, incluyendo angiogénesis
rs8135665/T	SLC16A8	Transporte de lactato
rs3130783/A	IER3/DDR1	Muerte celular/crecimiento celular
rs6795735/T	ADMTS9/MIR548A2	Anclaje de proteoglicanos, inhibición de angiogénesis
rs3812111/T	COL10A1	Arterosclerosis
rs9542236/C	B2GALT	Transporte de glucosa

Fuente: Black & Clark (Black & Clark, 2016)

Aunque los mecanismos moleculares exactos a través de los cuáles estos SNPs pueden llevar a la formación de drusas y al desarrollo de la DMAE siguen siendo desconocidos, como se mencionó anteriormente, el estrés oxidativo, el metabolismo de los carbohidratos para generar energía, la degradación de lípidos y la respuesta inflamatoria están involucrados en la fisiopatología de la enfermedad (Figura 15) y el efecto de todos estos factores se pueden ver incrementados por la presencia de ciertos SNPs.





**Figura 15.** Hipótesis de la patogénesis de la DMAE. Modificada de Peng Zhou et al. (Zhou & Li, 2014).

### 1.2.1.3 Gen *FACTOR DEL COMPLEMENTO H (CFH)*.

Los avances significativos en las tecnologías de secuenciación y los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) han proporcionado información adicional sobre la arquitectura genética de los fenotipo de DMAE. En el año 2005, se identificó una variante intrónica en el gen *factor del complemento H (CFH)* (OMIM 134370), localizado en la región cromosómica 1q32, que está asociado con un mayor riesgo de padecer DMAE (Edwards et al., 2005; Hageman et al., 2005; Haines et al., 2005; R. J. Klein et al., 2005). En este gen se observó un cambio de una timina (T) a una citosina (C) en el exón 9. El SNP asociado a este haplotipo de riesgo da como resultado un intercambio de tirosina (Y) a histidina (H) en la posición 402 de la proteína CFH (polimorfismo Y402H, rs1061170). Esta asociación de riesgo ha sido respaldada en muchos estudios posteriores y se estima que la variante Y402H es un factor que contribuye en más de la mitad de los caso de DMAE. Los individuos homocigotos para el alelo de riesgo (CC) son aproximadamente 6 veces más propenso a padecer la enfermedad en comparación con aquellos con el genotipo sin riesgo (TT) y los que presentan un genotipo heterocigoto (TC) tienen una elevación del riesgo de 2.5 veces. El polimorfismo Y402H se encuentra en la repetición de consenso corta 7 (SCR 7), una región que se sabe que media la unión de CFH a polianiones como la heparina, los glicosaminoglicanos, fosfolípidos oxidados y la proteína C reactiva (Khandhadia et al., 2012; Toomey et al., 2018).

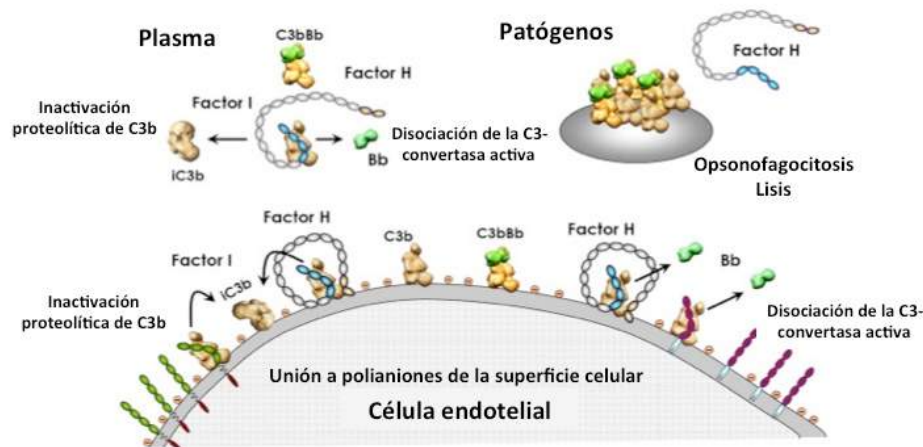
La identificación de variantes específicas en el gen *CFH* como uno de los principales factores de riesgo genético para el desarrollo de la DMAE permitió la comprensión de la enfermedad y sirvió de apoyo a estudios previos que habían relacionado la cascada del complemento con la inflamación crónica que produce la DMAE (Anderson et al., 2002; Hageman et al., 2001; Johnson et al.,

2001). Posteriormente, se encontraron asociaciones de riesgo genético en otros genes del sistema del complemento, lo que supuso el punto de partida para estudiar dicho sistema y sus componentes como objetivo terapéutico de la DMAE (Fagerness et al., 2009; Gold et al., 2006; Maller et al., 2007; Yates et al., 2007).

El sistema del complemento es uno de los componentes evolutivos más antiguos del sistema inmune. Está compuesto de más de 40 proteínas y reguladores que se encuentran en la regulación sistémica y desempeña un papel esencial en la defensa del huésped contra los patógenos, la eliminación de células apoptóticas y complejos inmunes y las respuestas inmunes adaptativa. Existen tres vías con un desencadenante específico: la vía clásica desencadenada por un complejo antígeno-anticuerpo, la vía alternativa desencadenada por la unión a una célula huésped o superficie patógena y la vía de lectina desencadenada por polisacáridos en las superficies microbianas de la vía del complemento. Estas vías convergen para convertir C3 en C3b formando la convertasa C3, enzima que es capaz de iniciar una cascada que da como resultado la formación de productos de desechos inmunoestimuladores o anafilotoxinas, C3a y C5a, y la formación del complejo de ataque membrana (C5b-9), un poro de la membrana celular que puede causar lisis celular (Khandhadia et al., 2012; Toomey et al., 2018).

*CFH* codifica el factor H del complemento que es principal regulador negativo de la fase fluida de la vía alternativa del complemento y cuyo control continuo es necesario debido a la naturaleza espontánea de la activación, sus propiedades amplificadoras y su potencial de provocar lisis celular en los tejidos sanos del huésped. *CFH* es una proteína abundante (218-654 µg/ml en suero) de 155 kDa compuesta por veinte unidades repetitivas de 60 aminoácidos conocidas como repeticiones de consenso cortas, que regulan el complemento, y separadas por una pequeña región de 3-8 aminoácidos. *CFH* se une a C3b y acelera la descomposición de la convertasa C3 alternativa (Figura 16). También actúa como cofactor para la inactivación de C3b por el factor I del complemento. *CFH* se une a las superficies de las células para regular la activación espontánea y la amplificación de la escisión de C3 y ayuda a la degradación de los productos de escisión de C3 activos en las células huéspedes. Cabe señalar que *CFH* no solo funciona en la fase fluida sino también en la matriz extracelular y en las superficies de las células huéspedes a través de sus dominios de unión a polianiones (Khandhadia et al., 2012; Toomey et al., 2018).





**Figura 16.** Regulación de la vía alternativa del complemento por el factor H en el plasma y en las superficies celulares. El factor H discrimina entre células propias y patógenos mediante su unión a polianiones, los cuales están presentes sólo en las superficies de las células propias. El factor H actúa de dos formas: disocia las subunidades C3b y Bb (fragmento B del factor B) en la C3-convertasa y actúa como cofactor del factor I del complemento permitiendo la inactivación proteolítica de C3b. Modificada de Rodríguez de Córdoba et al (de Córdoba et al., 2011).

### 1.2.2. Retinosis pigmentaria

La retinosis pigmentaria (RP, OMIM #26800) engloba a conjunto de enfermedades degenerativas de la retina con fenotipos clínicamente similares asociados con causas genéticamente heterogéneas (Jin et al., 2019). El inicio y la progresión de la enfermedad puede variar significativamente entre los pacientes, incluso dentro de la misma familia. Normalmente, los primeros síntomas de esta enfermedad comienzan en la adolescencia y van empeorando de forma progresiva hasta conducir a la ceguera en adultos jóvenes.

La RP es la forma hereditaria más común de las distrofias retinianas con una prevalencia estimada de 1 por cada 4000 personas. Aunque es una enfermedad rara, representa la forma más común de ceguera hereditaria en el adulto afectando a más de un millón de personas en el mundo (Menghini et al., 2020). Se han identificado más de 250 genes (Figura 11) que causan distrofias hereditarias de la retina de los cuales alrededor de 100 genes están asociados con RP (<https://sph.uth.edu/retnet/>). Los genes asociados a RP se pueden clasificar funcionalmente en cinco categorías: i) fototransducción; ii) metabolismo de la retina; iii) desarrollo tisular y mantenimiento; iv) estructura celular y v) conexiones (splicing) (Berger et al., 2010). Dentro de los genes relacionados con estructuras celulares, cabe mencionar la presencia de numerosas mutaciones en genes asociadas al cilio primario o cilio conector que están relacionadas con RP (Wright et al., 2010).

### 1.2.2.1. Características clínicas de la retinosis pigmentaria.

#### SÍNTOMAS DE LA RETINOSIS PIGMENTARIA

**Ceguera nocturna o nictalopía.** Se caracteriza por presentar una adaptación deficiente a la oscuridad y lugares poco iluminados. En las formas autosómica recesivas y ligadas al cromosoma X, la enfermedad suele aparecer en los primeros diez años de vida, mientras que en las formas dominantes lo hace en la segunda década. Es uno de los signos más distintivos de la enfermedad y se debe a la degeneración de los bastones. La ceguera nocturna no es un síntoma específico de RP, también puede acompañar a otras distrofias retinianas como la ceguera nocturna estacionaria.

**Pérdida del campo visual.** La segunda característica o síntoma principal de la RP es la reducción progresiva del campo visual periférico, lo que se conoce como “visión en túnel” y que obliga a las personas a girar la cabeza para ver lo que hay a su alrededor (Figura 17).



**Figura 17.** Simulación del campo visual periférico reducido de un paciente con RP (visión en túnel) en comparación con el campo visual de un individuo sano.

**Disminución de la agudeza visual.** Suele aparecer después de los dos síntomas anteriores y se manifiesta como la dificultad para percibir formas y objetos.

**Deslumbramientos y fotopsias.** Perciben luces o pequeños flashes en la periferia de su campo que dificultan la visión, sobre todo cuando hay excesiva luz. Son similares a los que sufren pacientes con migraña con aura visual.

**Alteración de la percepción de los colores.** Aunque de forma inespecífica, suele afectar más al eje azul-amarillo. Se produce cuando la enfermedad está muy avanzada en casos donde los conos centrales están afectados.

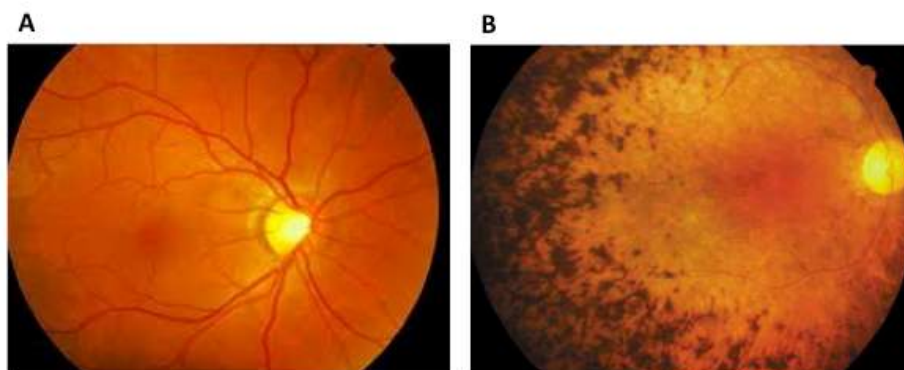
**Pérdida de la visión central.** En casos avanzados de la enfermedad.

A nivel celular, los fenotipos iniciales están relacionados con la afectación de los bastones. En etapas posteriores, la enfermedad puede afectar a los conos y finalmente causar la ceguera completa. Los fotorreceptores empiezan a morir lo que provoca una reducción del espesor de la capa nuclear externa así como lesiones y/o depósitos en el EPR. Antes de experimentar una pérdida de la agudeza visual, los pacientes pueden ya haber perdido una cantidad significativa de células fotorreceptoras.

#### DIAGNÓSTICO DE LA RETINOSIS PIGMENTARIA.

La RP requiere de valoraciones tanto funcionales como estructurales para su diagnóstico, dichas evaluaciones tendrán que ser valoradas dependiendo de la fase en la que se encuentre la enfermedad ya que los parámetros varían con el avance de la misma. Dentro de la evaluación estructural se encuentran las siguientes pruebas:

**Estudio del fondo de ojo mediante oftalmoscopia.** Las tres características clásicas del fondo de ojo de un paciente con RP son: i) pigmentación de tipo espícula ósea; ii) atenuación arteriolar y iii) palidez cérea del disco óptico (Figura 18B). La pigmentación de las espículas óseas representa el desplazamiento hacia la retina del pigmento procedente del EPR, que se acumula en los espacios intersticiales que rodean a los vasos retinianos y dan lugar a la aparición de depósitos con forma de espículas. El aspecto grisáceo de un fondo de ojo suele estar relacionado con la pérdida de pigmento del EPR, el epitelio se vuelve más transparente y se pueden apreciar con claridad los vasos coroideos subyacentes. Con la atrofia del EPR y de la coroides que se produce en etapas más avanzadas de la enfermedad, el fondo del ojo se vuelve más nítido y se visualizan con facilidad los vasos coroideos de mayor tamaño. Cuando la enfermedad llega a su fase final, la atenuación vascular puede ser tan intensa que los vasos retinianos pueden tener aspecto filiforme (Verbakel et al., 2018).



**Figura 18.** Estudio de fondo de ojo. **A)** Retina de un individuo sano. **B)** Retina de un paciente

con RP donde se observan las espículas óseas y la atrofia del nervio óptico y atenuación vascular (atrofia de los vasos que nutren la retina).

**Estudio del árbol vascular mediante angiografía de fluoresceína (AGF).** Permite evaluar con precisión la atenuación vascular, que aparecen en etapas tempranas, observándose un estrechamiento de las arteriolas hasta que finalmente desaparecen. También permite la evaluación de los cambios que se producen en la mácula en etapas avanzadas de la enfermedad (Verbakel et al., 2018).

**Estudio de la retina mediante tomografía de coherencia óptica (OCT).** Nos permite evaluar las diferentes capas de la retina y detectar los cambios que se producen en las diferentes etapas de la enfermedad. Los cambios se pueden detectar de manera precoz y ser medidos de forma objetiva. Las zonas de la retina con pigmentación anómala y en las que se encuentran espículas óseas hiperreflectantes están directamente relacionada con una disminución en el espesor de la misma.

Con respecto a la evaluación oftalmológica funcional se encuentran las siguientes pruebas:

**Estudio del campo visual o campimetría.** Es una herramienta muy útil para el diagnóstico y el seguimiento de la RP. Massof et al., observaron que podían dividir a sus pacientes en función de la campimetría diferenciando entre RP de tipo I, asociada a la pérdida de la sensibilidad de los bastones respecto a los conos de manera precoz y a ceguera nocturna en la infancia y, por otro lado, RP de tipo II que se caracteriza por una pérdida regional y combinada de la sensibilidad de los conos y bastones y por ceguera nocturna en adultos. No se ha visto que los pacientes cambien de un tipo a otro y aunque esta clasificación no es un reflejo de subtipos genéticos, puede que el fenotipo de mutaciones específicas de un gen determinado sea relativamente uniforme (Massof & Finkelstein, 1981; Verbakel et al., 2018).

**Prueba de adaptación a la oscuridad.** Son pruebas patológicas desde estadíos precoces de la enfermedad. Esta prueba detecta el aumento de la sensibilidad de la retina al ir adaptando el ojo a la oscuridad. Cuando sujetos sanos son expuestos a oscuridad después de una adaptación con una fuente de luz potente, reducen rápidamente el umbral psicofísico retiniano, utilizando el sistema de conos, el cual está estabilizado en 5 minutos aproximadamente. A partir de ese momento, la adaptación de los bastones aumenta lentamente, antes de que se produzca una segunda adaptación después de 30 minutos en oscuridad (Verbakel et al., 2018).

**Electrorretinograma (ERG).** Es una prueba fundamental para el diagnóstico

que mide el potencial de acción de la retina. Con esta prueba es evaluada la funcionalidad del fotorreceptor mediante respuestas eléctricas, las cuáles en el caso de la RP aparecen alteradas en fases muy tempranas. Gracias a esta detección precoz, el ERG es una de las pruebas neurofisiológicas más fiables en la para detectar precozmente la RP. El ERG consiste en aplicar flashes de luz de diferentes intensidades y duraciones para estimular la retina, para ello se emplea el electrorretinógrafo, que es el dispositivo que nos permite determinar la intensidad y la duración del flash. Durante la prueba, se coloca una lentilla corneal sobre la córnea del paciente que hará de electrodo de registro extravascular y recogerá las respuestas que se produzcan a la estimulación por la luz y las enviará a un ordenador para su procesamiento. Los distintos tipos de fotorreceptores presentan una fisiología diferente entre ellos, por lo tanto a la hora de evaluar sus respuestas, las condiciones de estimulación para el registro de sus respuestas también serán diferentes. En el caso de los ERG en RP, se observa una reducción de la respuesta de baja intensidad, inicialmente en evaluación escotópica (bajo nivel de luz u oscuridad, para evaluar principalmente bastones), que va empeorando conforme avanza la enfermedad (Sandberg et al., 1996; Verbakel et al., 2018)

**Otros exámenes complementarios.** Estudios genéticos de los pacientes y sus familiares permiten determinar si presentan mutaciones en genes asociados con la enfermedad.

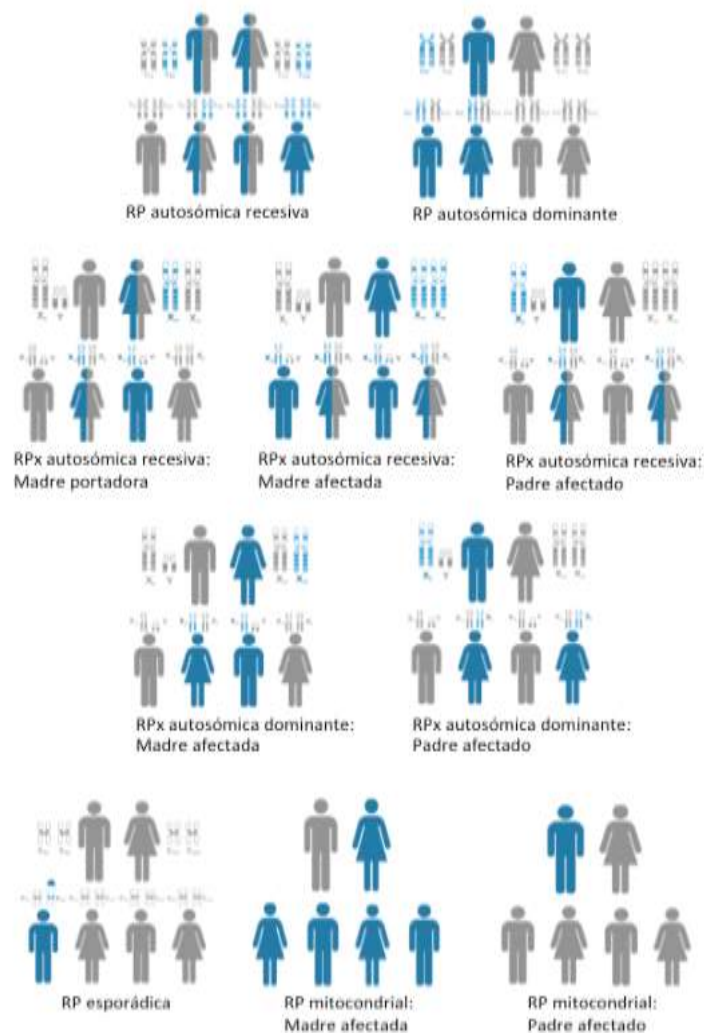
#### 1.2.2.2. Patrones de herencia de la retinosis pigmentaria.

La genética de la RP es muy compleja y aunque la forma ideal de clasificar la RP debería ser en función de la anomalía bioquímica y asociarla a datos clínicos útiles y característicos, aún se está lejos de disponer de una clasificación unificada que sirva tanto para médicos, biólogos y genetista. Aunque existen múltiples clasificaciones, la del modelo de herencia mendeliano sigue siendo la más utilizada y se clasifica en:

**RP autosómica dominante (RPad).** Es el segundo tipo más frecuente de RP hereditaria. Representa entre el 15-20% de los casos con 30 genes identificados (Tabla 4). Son los casos en los cuales si uno de los padres padece la enfermedad, se la puede transmitir a alguno de los hijos (Figura 19). Aunque es una de las formas menos graves de retinosis, ya que los síntomas aparecen más tarde, la probabilidad de transmisión a la descendencia es del 50% (Jay, 1982; D. Y. Wang et al., 2005).

**RP autosómica recesiva (RPar).** Es el tipo de RP hereditaria más frecuente y supone entre el 20-30% de los casos. Son aquellos casos en los cuales ambos padres son portadores asintomáticos de la enfermedad, al tener solo uno de los alelos afectados. La enfermedad se manifiesta en el caso de que el hijo reciba

el alelo mutado de cada progenitor (Figura 19). La RPar afecta de la misma manera a hombres y mujeres y la consanguinidad aumenta la probabilidad de que un rasgo recesivo se manifieste. Su gravedad es mayor aunque las posibilidades de transmisión están reducidas al 25%. Hasta la fecha, se han identificado 63 genes para RPar (Tabla 4). Entre los genes con más prevalencia para el desarrollo de la enfermedad están *EYS* (*Eyes Shut Homolog of Drosophila*), *RPE65*, *PDE6A* y *PDE6B* (Isabelle Audo et al., 2010; Barragán et al., 2010; Daiger et al., 2017; Ferrari et al., 2011; Hosono et al., 2012).



**Figura 19.** Patrones de herencia de la retinosis pigmentaria.

**RP ligada al cromosoma X (RPx).** Es el tipo de RP hereditaria menos frecuente representando del 6-10% de los casos. A día de hoy, se han identificado 3 genes implicados en este tipo de herencia (Tabla 4). En estos casos encontramos que el gen recesivo afectado se localiza en el cromosoma

X por lo que la expresión fenotípica del gen está ligada al género, lo que significa que las mujeres son portadoras de gen anómalo pero solo se ven afectados los varones (Figura 19). La RPx se caracteriza porque la enfermedad no se transmite de varón a varón. Es la forma más grave de RP ya que los síntomas aparecen en edades temprana y la evolución es muy rápida (Daiger et al., 2017).

### Otras formas de RP.

RP simple o esporádica. Aquellos casos en los que el afectado es el primer miembro de su familia en padecer la enfermedad y sin una vinculación a la herencia (Figura 19). Suponen en torno al 70% de los casos de RP (Bessant et al., 2001).

RP digénica. Es el tipo de RP hereditaria en el que los genes alterados que provocan la enfermedad se localizan en dos cromosomas diferentes y la interacción entre ambos genes provoca la RP. Algunos casos se han asociado con mutaciones heterocigosis simultáneas en los genes *ROM1* y *PRPH2* (Daiger et al., 2017).

RP mitocondrial. Las mitocondrias tienen su ADN propio y son heredadas de la madre (Figura 19). Defectos en el ADN mitocondrial conducen a una gran variedad de trastornos sindrómicos, aunque su aparición es variable debido a la complejidad genética mitocondrial. Algunas de las formas del síndrome de Usher, que provoca RP, se cree que heredan un patrón mitocondrial (Bessant et al., 2001).

**Tabla 4.** Genes causantes de RP identificados hasta la fecha.

Enfermedad	LOCI	GEN
RP autosómica dominante	<i>RPE63</i>	<i>ADIPOR1, ARL3, BEST1, CA4, CRX, FSCN2, GUCA1B, HK1, IMPDH1, IMPG1, KLHL7, NR2E3, NRL, PRPF3, PRPF4, PRPF6, PRPF8, PRPF31, PRPH2, RDH12, RHO, ROM1, RP1, RP9, RPE65, SAG, SEMA4A, SNRNP200, SPP2, TOPORS</i>
RP autosómica recesiva	<i>RP22, RP29</i>	<i>ABCA4, AGBL5, AHR, ARHGEF18, ARL6, ALR2BP, BBS1, BBS2, BEST1, C2orf71, C8orf37, CERKL, CLCC1, CLRN1, CNGA1, CNGB1, CRB1, CYP4V2, DHDDS, DHX38, EMC1, EYS, FAM161A, GPR125, HGSNAT, IDH3B, IFT140, IFT172, IMPG2, KIAA1549, KIZ, LRAT, MAK,</i>

		MERTK, MVK, NEK2, NEUROD1, NR2E3, NRL, PDE6A, PED6B, PED6G, POMGNT1, PRCD, PROM1, RBP3, REEP6, RGR, RHO, RLBP1, RP1, PR1L1, RPE65, SAG, SAMD11, SLC7A14, SPATA7, TRNT1, TTC8, TULP1, USH2A, ZNF408, ZNF513
<b>RP ligada al cromosoma X</b>	RP6, RP24, RP34	OFD1, RP2, RPGR

Fuente: RETNET 2020 (<https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm#B-diseases>).

### 1.2.2.3. Gen *EYES SHUT HOMOLOG (EYS)*.

En 2008, un equipo de investigadores liderado por el Dr. Bhattacharya y Dr. Antiñolo, como resultado de un estudio genético realizado con 10 familias españolas, identificaron un nuevo gen asociado a RP autosómica recesiva, el gen *EYS* correspondiente al locus RP25 (6q12. 1-6q15). *EYS* (OMIM 612424, NM\_001142800) ocupa más de 2 Mb de ADN genómico, convirtiéndose en uno de los genes de mayor tamaño expresados en el ojo humano. Los detalles moleculares, clínicos y las investigaciones sobre el papel de *EYS* en la retina se describen, a continuación, en el artículo de revisión bibliográfica “*Dissecting the role of EYS in retinal degeneration: Clinical and molecular aspects and its implications for future therapy*” que se ha enviado a la revista científica “*Orphanet Journal of Rare Disease*” y actualmente se encuentra en fase de revisión.



1.2.2.3.1. Artículo 1.

Review: Dissecting the role of EYS in retinal degeneration: Clinical and molecular aspects and its implications for future therapy.

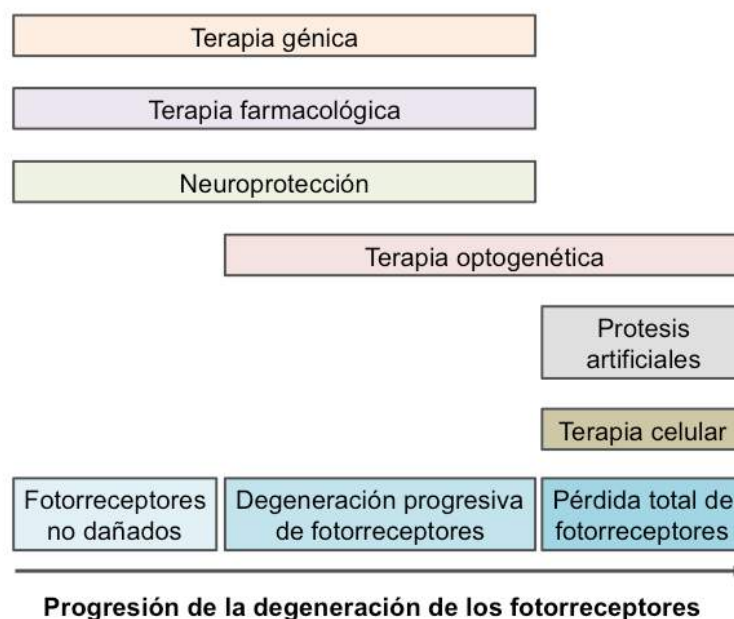
**Ana B Garcia-Delgado**, Lourdes Valdes-Sanchez, Francisco J Diaz-Corrales, Berta de la Cerda.

Manuscrito enviado a la revista "*Orphanet Journal of Rare Disease*" y actualmente en fase de revisión.



### 1.3. Opciones terapéuticas para DMAE y RP.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las EDR comprenden un grupo de patologías oftalmológicas que hasta la fecha tienen pocos o ningún tratamiento. La complejidad genética de las EDR, así como la diversidad de los mecanismos moleculares que llevan a la muerte de los fotorreceptores y el EPR ha limitado el poder encontrar tratamientos efectivos para estas enfermedades. Sin embargo, los avances tecnológicos y científicos de la última década en biomedicina y ciencias de la visión han permitido desarrollar tratamientos innovadores para muchas de estas EDR que hasta hace poco eran incurables. Con la aparición de las terapias avanzadas basadas tanto en terapias de reemplazo de células y de expresión de genes, así como, el estudio de nuevas moléculas que pueden alcanzar y modular dianas terapéuticas claves en el proceso degenerativo de la retina se ha abierto un nuevo abanico de opciones terapéuticas en oftalmología. Es importante destacar que ninguna de las alternativas terapéuticas que se están barajando a día de hoy debe verse como definitiva o excluyente del resto, sino complementaria de las demás y aplicable en determinados momentos atendiendo al estadio de la enfermedad. Las opciones terapéuticas para las EDR y el momento en el que pueden ser aplicadas quedan resumidas en la Figura 20. Existen diferentes enfoques terapéuticos, unos más conservadores como el uso de fármacos o medicamentos neuroprotectores y otros más punteros en cuanto a desarrollos tecnológicos innovadores como las prótesis artificiales y las terapias avanzadas.



**Figura 20.** Diferentes estrategias para tratar las enfermedades degenerativas de la retina. Las terapias farmacológicas y neuroprotectoras son los mejores enfoques para tratar la enfermedad

cuando la degeneración de los fotorreceptores se está iniciando o ya está en curso. La terapia génica es apropiada durante las primeras etapas de la enfermedad cuando los fotorreceptores aún no están dañados. La terapia celular, la optogenética y las prótesis artificiales son necesarias para restaurar la visión durante las últimas etapas de la degeneración de la retina. Modificada de Scholl et al. (Scholl et al., 2016).

### **1.3.1. Terapia farmacológica.**

Los fármacos pueden compensar un defecto bioquímico y podría ser una buena elección en los casos en los que se conocen algunos aspectos de la fisiopatología de las EDR.

En la actualidad, la única terapia farmacológica disponible son inhibidores del factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF), indicados para el tratamiento de la DMAE húmeda. Los inhibidores de VEGF son principalmente anticuerpos recombinantes, por lo que se trata de medicamentos caros parcialmente eficientes en DMAE húmeda que no proporcionan beneficios para la DMAE seca. Además, su posología de administración en inyecciones intravítreas es incómoda tanto para el oftalmólogo como el paciente, propensos a complicaciones. Desde un punto de vista farmacodinámico, los anti-VEGF actúan como supresores de la acción de VEGF, que aunque es una molécula esencial en la patogenia de la NVC, también exhibe efectos tróficos beneficiosos sobre los coriocapilares que participan en el mantenimiento de la función de la retina. Teniendo en cuenta lo anterior, en la actualidad se están llevando a cabo ensayos clínicos con nuevas moléculas que junto a VEGF se están aplicando para el tratamiento de DMAE neovascular. Algunos de estos ensayos clínicos están basados en el bloqueo combinado del VEGF y del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y, por otro lado, ensayos basados en el uso de PEDF que disminuye los niveles de VEGF entre otros. Estos ensayos están demostrando resultados positivos para DMAE neovascular (Muñoz-Ramón et al., 2020).

Hasta la fecha, no existe un tratamiento para la DMAE atrófica aunque se están llevando a cabo ensayos clínicos basándose en dos estrategias, por un lado, las acciones destinadas a frenar la AG tanto como sea posible y limitarla a áreas lo más alejadas posible de la mácula, y por otro lado, tratamientos centrados en la regeneración de EPR y fotorreceptores en los estadios avanzados de la enfermedad. Los medicamentos que se están probando para contrarrestar la AG están centrados en el control de la inflamación actuando en la cascada del complemento. Aún no hay resultados claros aunque si se ha visto que en algunos pacientes la atrofia geográfica ha disminuido (Muñoz-Ramón et al., 2020).

Al igual que en la DMAE seca, en la actualidad no hay ningún tratamiento farmacológico para otras distrofias de la retina. Múltiples vías y mecanismos

bioquímicos se ven afectados en los fotorreceptores de pacientes con enfermedades degenerativas de la retina. Estas incluyen la fototransducción, la estructura de los IS y OS de los fotorreceptores, el cilio conector, el metabolismo de los lípidos, la transcripción y el empalme del ácido ribonucleico (ARN), el desarrollo retiniano y la función sináptica. En el EPR, los mecanismos afectados incluyen el ciclo visual, la fagocitosis, el tráfico de membranas y el transporte de iones. Esta complejidad fisiopatológica plantea desafíos para el desarrollo de nuevos tratamientos.

Los avances en genética molecular han permitido la identificación de genes que codifican enzimas y proteínas de unión a retinoides del ciclo visual que están mutadas en enfermedades como la LCA, la enfermedad de Stargardt, las distrofias de conos, las distrofias de conos y bastones y la RP. En la actualidad, continúa en marcha un ensayo clínico donde los pacientes están siendo tratados con acetato de 9-cis-retinilo (QLT091001), cuyo objetivo es evitar el defecto bioquímico que causan la pérdida de dos enzimas esenciales en el ciclo visual como son RPE65 y LRAT y que conducen a la ausencia de *11-cis retinal* y rodopsina con el consecuente deterioro de la función de los bastones y la degeneración de la retina. Los primeros resultados de este ensayo clínico han mostrado la tolerancia al tratamiento y una función visual mejorada (Hussain et al., 2018).

En las enfermedades degenerativas de la retina causadas por mutaciones en *ABCA4*, un ciclo visual genéticamente defectuoso conlleva a la dimerización no enzimática de la vitamina A, lo que conduce a la agregación de retinoides tóxicos y acumulación de lipofuscina. Los ensayos clínicos que se están llevando a cabo con resultados positivos tienen como enfoque terapéutico el secuestro de *all-trans*-retinal tóxico para reducir la disponibilidad de vitamina A en los fotorreceptores usando inhibidores de RPE65 o antagonistas de la proteína de unión a retinol 4 o se administra por vía oral vitamina A con C20, reduciendo su dimerización (Sundaramurthi et al., 2019).

Por último, mencionar los ensayos clínicos que se están realizando con medicamentos antiinflamatorios como la dexametasona, la minociclina y el acetónido de fluocinolona, que están mostrando una reducción de la inflamación de la retina y una conservación de la estructura y la función de la misma. Por otro lado, se encuentran los ensayos clínicos con antioxidantes como la N-acetilcisteína, protectora frente al estrés oxidativo promoviendo la supervivencia de los conos e inhibiendo el eje proinflamatorio del factor de necrosis tumoral alfa - factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas (TNF $\alpha$ -NF/ $\kappa$ B) (Sundaramurthi et al., 2019).

### 1.3.2. Neuroprotección.

Los enfoques neuroprotectores tienen como objetivo preservar la viabilidad neuronal mediante el bloqueo de la muerte celular o fortaleciendo los mecanismos endógenos de supervivencia. Se han realizado estudios de varios factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), el factor neurotrófico derivado de células de la glía (GDNF) y el PEDF. Se ha evaluado la neuroprotección en términos de prevención de la muerte celular de los fotorreceptores o aumento de la liberación endógena de otras moléculas neuroprotectoras demostrando ser eficaces en el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina. Otro candidato neuroprotector bien estudiado es el factor neurotrófico ciliar (CNTF), cuyos efectos neuroprotectores y el aumento de la supervivencia de los conos y bastones se ha demostrado en modelos animales de EDR. CNTF ha sido probada en ensayos clínicos utilizando la tecnología de células encapsuladas en el ojo demostrando una reducción de la degeneración de los fotorreceptores (Muñoz-Ramón et al., 2020; Scholl et al., 2016).

Durante los últimos años, se están llevando a cabo numerosos ensayos clínicos con factores neurotróficos y diferentes moléculas cuyos efectos neuroprotectores parecen ser positivos. Cabe mencionar el factor protector de conos derivado de bastones (RdCVF) que se ha identificado como un candidato prometedor para el tratamiento de la RP y otras distrofias de conos y bastones. Este factor ofrece una opción de tratamiento independiente de la mutación. También hay que mencionar un dispositivo de liberación sostenida de brimonidina, agonista de los receptores alfa-2, que ha demostrado su capacidad de disminuir la progresión de la atrofia geográfica de manera significativa (Scholl et al., 2016; Sundaramurthi et al., 2019).

La levodopa que controla la liberación de factores neurotróficos beneficiosos en enfermedades neurodegenerativas y que se ha demostrado que retrasa el desarrollo de la DMAE; el ácido valproico, que es un inhibidor de la histona desacetilasa y cuyos estudios han demostrado que hay una mejora del campo visual en pacientes con RP; y los cannabinoides, en concreto el cannabinoide sintético HU-210 que conserva la función retiniana y reduce la pérdida de fotorreceptores (Sundaramurthi et al., 2019).

Por último, mencionar que en nuestro laboratorio también hemos llevado a cabo algunos ensayos basados en la neuroprotección con el fin de ofrecer esta tipo de terapia a aquellos pacientes propensos de padecer la enfermedad, o en pacientes en estadios muy tempranos con el fin de producir un enlentecimiento en la progresión de la misma. A día de hoy continuamos realizando estos ensayos con diferentes moléculas derivadas del resveratrol y rasagilina (Diaz-

Corrales et al., 2016; Garcia-Delgado et al., 2018; Valdés-Sánchez et al., 2019).

### **1.3.3.Terapia génica.**

Se puede definir como una forma experimental de tratamiento, incluida dentro de la definición de **terapias avanzadas**, que utiliza la transferencia de genes a la células de un paciente para curar una enfermedad. La Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) define terapias avanzadas como aquellos medicamentos de uso humano basados en genes (terapia génica), células (terapia celular) o tejidos (ingeniería tisular) y que incluyen productos de origen autólogo, alogénico o xenogénico. Se trata de nuevas estrategias terapéuticas y su desarrollo contribuirá a ofrecer oportunidades para algunas enfermedades que hasta el momento carecen de tratamientos eficaces.

La autorización de comercialización de estos medicamentos se realiza mediante el procedimiento centralizado solicitado a la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), en la que se ha creado en 2009 un comité especializado, el Comité de Terapias Avanzadas. El Reglamento (CE) N°1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de noviembre de 2007 sobre medicamentos de terapia avanzada contempla la exclusión de algunos medicamentos de ese procedimiento centralizado y su autorización corresponde a las autoridades nacionales, en el caso de España a la AEMPS (página web AEMPS: <https://www.aemps.gob.es/medicamentos-de-uso-humano/terapias-avanzadas/>).

La terapia génica es un método que nos acerca al tratamiento de las patologías que afectan al ser humano basadas en la transferencia de material genético a las células de un individuo. Normalmente el fin de transferir material genético es restablecer una función celular que estaba anulada o defectuosa, introducir una nueva función o bien interferir con una función que ya existía. Las diferentes estrategias de la terapia génica se basan en la combinación de tres elementos básicos: el material genético que se va a transferir; el método de transferencia que suele ser mediante el uso de vectores virales que utilizan sus capacidades biológicas propias para entrar en la célula; y el tipo celular que incorporará dicho material genético (Ruiz Castellanos & Sangro, 2005).

La terapia de reemplazo de genes, también conocida como terapia de adición o aumento de genes, es la opción más sencilla para tratar enfermedades hereditarias de la retina causadas por un defecto genético recesivo (Scholl et al., 2016). En 2008, tres grupos de investigación informaron del éxito al usar vectores virales para administrar el gen *RPE65* sano en la retina de tres

pacientes con LCA. En estos ensayos, los pacientes recuperaron alguna función visual sin efectos secundarios, lo que despertó en todo el mundo interés en el uso de la terapia génica para el tratamiento de enfermedades de la retina (Bainbridge et al., 2008a; Cideciyan et al., 2008a; Maguire et al., 2008a). En la actualidad hay en marcha numerosos ensayos clínicos basados en terapia génica para el tratamiento de las EDR.

#### 1.3.3.1. Definición y vías de administración.

A menudo, una mutación genética conduce a la producción de una proteína que exhibe una disminución o ausencia de su función, o bien adquiere un papel nuevo o perjudicial, lo que permite conocer la fisiopatología de las enfermedades asociadas a mutaciones. Los avances recientes han producido dos enfoques terapéuticos para tratar estas enfermedades a nivel molecular: la terapia génica y la edición génica.

El Reglamento del Parlamento Europeo (CE N° 1394/2007) define a los medicamentos de terapia génica como:

*“Un medicamento biológico con las siguientes características:*

- incluye un principio activo que contiene un ácido nucleico recombinante o está constituido por él, utilizado en seres humanos, o administrado a los mismos, con objeto de regular, reparar, sustituir, añadir o eliminar una secuencia génica;*
- Su efecto terapéutico, profiláctico o diagnóstico depende directamente de la secuencia del ácido nucleico recombinante que contenga, o del producto de la expresión genética de dicha secuencia.*

*Los medicamentos de terapia génica no incluyen las vacunas contra enfermedades infecciosas”.*

Atendiendo a esta definición, se puede decir que el objetivo final de la terapia génica es la transferencia de nuevo material genético a la célula diana con el fin de modular la expresión de las proteínas que están alteradas, restablecer una función celular que estaba anulada o defectuosa, introducir una nueva función o interferir con una función ya existente (Novelli & Gruenert, 2002; Wood et al., 2019). Teniendo en cuenta todo lo mencionado, hay diferentes métodos de actuación como pueden ser:

- Sustitución del gen mutado por una copia funcional del mismo. Se utiliza para enfermedades de herencia recesiva y de herencia dominante cuando se trata de una haplosuficiencia.



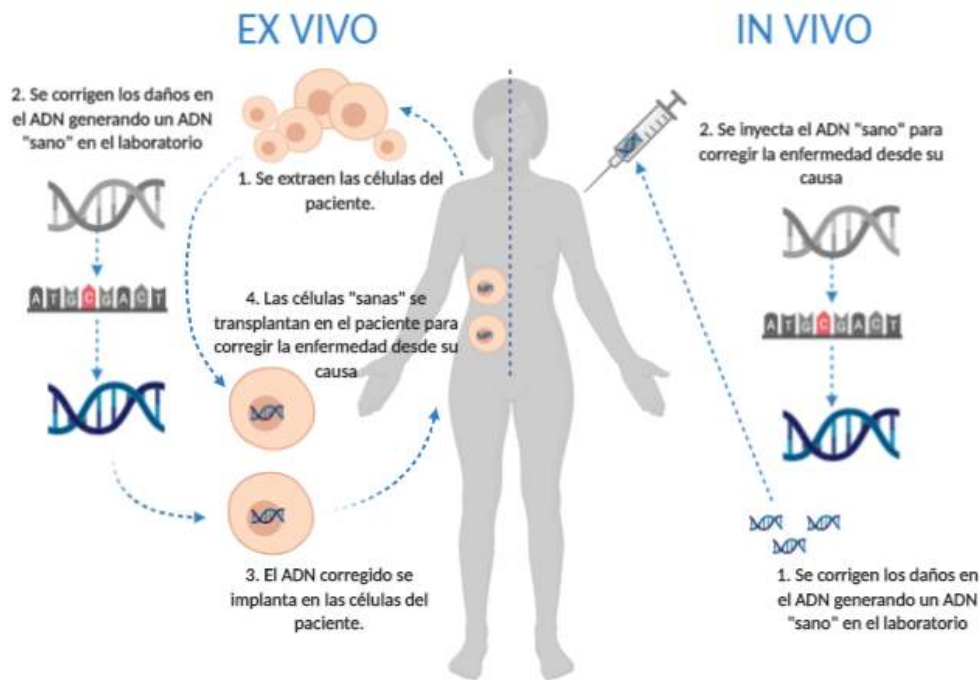
- Inactivación del gen mutado que no está funcionando de la manera adecuada o introducción de un gen entero nuevo, cuando se trata de enfermedades autosómicas dominantes.
- Reparación del gen anormal por una mutación selectiva que sea capaz de revertir la situación
- Regulación del grado en el que un gen se encuentra sobre o infra-expresado.
- Incorporación de un gen nuevo cuyo material genético aporte efectos beneficiosos de manera independiente al gen que está dañado originalmente.
- Silenciamiento de un alelo defectuoso cuando el efecto sea tipo dominante negativo.

Una enfermedad es candidata a ser tratada mediante terapia génica cuando se conoce cuál es el papel del gen en la fisiopatología de la enfermedad (Flotte, 2007). Además, es necesaria la caracterización adecuada del sistema de administración del gen o vector, lo que va a permitir controlar su localización en el organismo así como la duración de la expresión génica.

La terapia génica puede aplicarse a través de dos vías de administración del material genético (Figura 21). Por un lado, la terapia génica *ex vivo* que consiste en la extracción de las células del paciente a las que se le administra el material genético terapéutico *in vitro* y posteriormente son incorporadas de nuevo en el paciente. Por otro lado, la terapia génica *in vivo*, método mediante el cual el material genético terapéutico es administrado directamente en las células del paciente sin extracción previa. Aunque el control del proceso es mucho menor en el caso de la terapia *in vivo*, desde el punto de vista clínico y farmacéutico, es más aceptable su uso con respecto a la terapia *ex vivo*, ya que permite la utilización de vías de administración habituales.

La transfección celular, proceso mediante el cual se introducen las moléculas de ADN en el núcleo celular, se lleva a cabo utilizando diferentes métodos. Una de las posibilidades, en el caso de la terapia *in vivo*, es la administración del ADN desnudo, es decir, la doble hélice de ADN se multiplica en algún tipo de bacteria y posteriormente es administrada. El principal inconveniente del uso del ADN desnudo es la degradación enzimática. Para evitar dicha degradación, se utilizan los vectores, que son sistemas de administración que protegen al plásmido, facilitan su captación celular y lo liberan en el citoplasma lo que le permite su correcta expresión. Existen dos tipos de vectores: virales y no virales. Tradicionalmente, los vectores virales han sido los más utilizados ya que tienen mayores niveles de transfección y de expresión del gen terapéutico. A día de hoy, los estudios en la tecnología de los vectores no virales han dado lugar al desarrollo de nuevas moléculas y técnicas con una eficiencia similar a los virus que cuentan con la ventaja de que se pueden producir a gran escala y

su baja inmunogenicidad (Aramburu del Boz et al., 2015; Pensado et al., 2016).



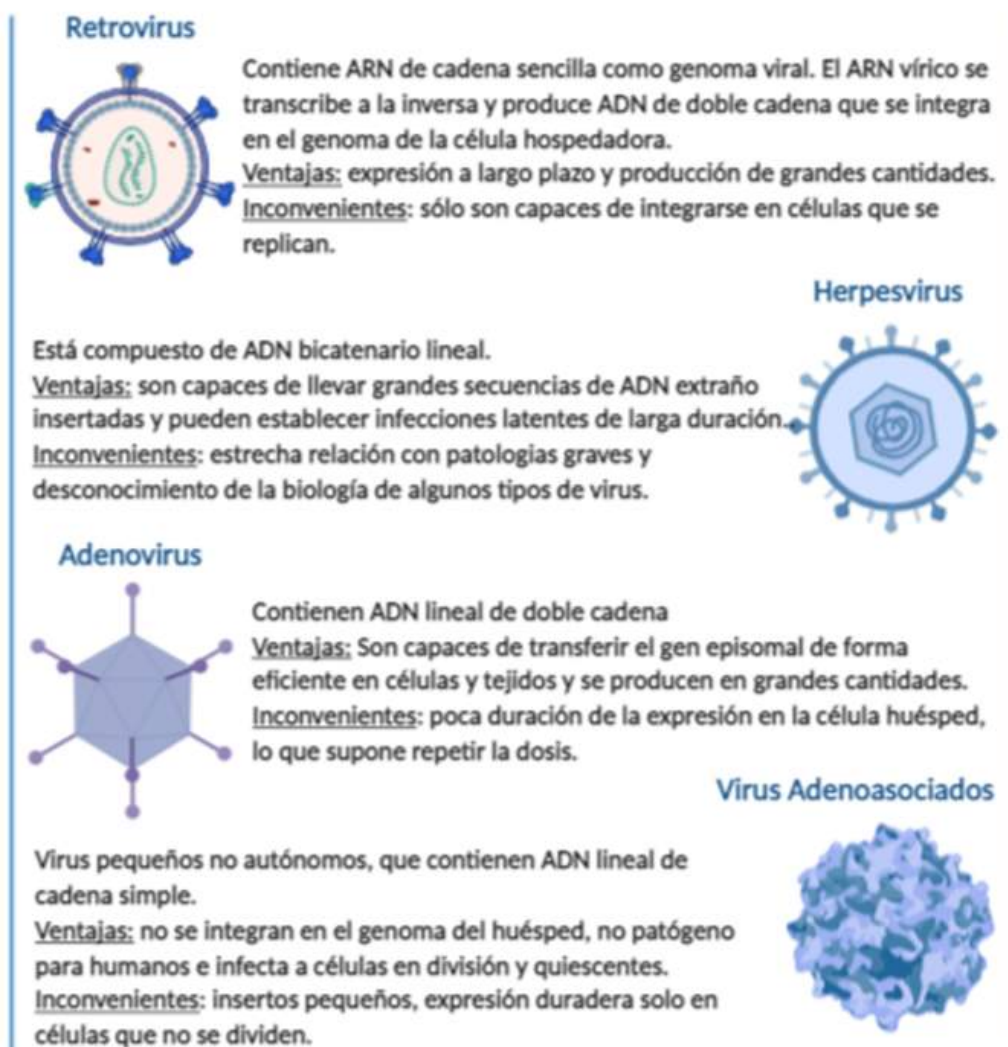
**Figura 21.** Tipos de terapia génica: *ex vivo* e *in vivo*. Imagen diseñada con el software BioRender.

### 1.3.3.2. Tipos de vectores usados en terapia génica.

- Vectores virales

Los virus se unen a las células diana donde liberan el material genético como parte del ciclo de replicación viral. El material genético liberado tiene "instrucciones" para producir copias del virus y llevar a cabo el secuestro de la maquinaria de producción normal de la célula y de esta manera el virus satisface sus propias necesidades.

A diferencia de los virus, los vectores virales son sistemas compuestos por virus modificados genéticamente, lo que permite que el gen se exprese en las células diana sin que se produzca la replicación del virus. Estos sistemas son altamente eficientes en cuanto a la transfección aunque el tamaño del ADN que transportan es muy limitado. Además, presentan problemas de inmunogenicidad y un alto potencial oncogénico (Heilbronn & Weger, 2010). En terapia génica, cuatro tipos de virus son los más utilizados para formar los vectores virales: retrovirus, herpesvirus, adenovirus y virus adenoasociados (AAV) (Robbins & Ghivizzani, 1998). En la figura 22 se muestran los cuatro tipos de virus empleados como vectores y sus principales características.



**Figura 22.** Tipos de vectores virales: retrovirus, herpesvirus, adenovirus y virus adenoasociados. Imagen diseñada con el software BioRender.

- Vectores no virales

Son sistemas donde el ADN es replicado en bacterias y después se combina con diferentes componentes como pueden ser polímeros, péptidos, lípidos o mezcla de ellos. Aunque su capacidad de transfección es menor que la de los vectores virales, son producidos a gran escala y su coste es bajo. Pueden transportar moléculas de ADN más grandes y son seguros ya que no son inmunogénicos, ni oncogénicos puesto que el ADN que transportan no se inserta en el genoma de las células. Algunos de los vectores no virales que más se usan en terapia génica se encuentran recogidos en la figura 23 (Adijanto & Naash, 2015; Cryan et al., 2004; de la Fuente et al., 2008; T. H. Kim et al., 2004; G. Liu et al., 2001; Ramaswamy et al., 2003; Trapani et al., 2014; Wasungu & Hoekstra, 2006; C. Zhang et al., 2004).



**Figura 23.** Tipos de vectores no virales usados en terapia génica: polímeros catiónicos, liposomas catiónicos y nanopartículas. Abreviaturas: PLL (poli L-lisina); PEI (polietilenimina). Imagen diseñada con el software BioRender.

- Otro tipo de transporte de ADN a la célula

Además de los vectores no virales químicos anteriormente descritos hay que mencionar los vectores no virales físicos que facilitan el paso del ADN al interior de las células (Trapani et al., 2014). Entre ellos destacan:

- Electroporación que usa pulsos de alto voltaje para facilitar el paso del ADN a través de la membrana celular
- Sonoporación que a través de cavitación producida con ultrasonidos produce una disrupción en la membrana celular.
- Bombardeo de partículas donde el ADN es recubierto por unas pequeñas partículas de oro o tungsteno, dichas partículas son aceleradas por un pulso de gas o una descarga eléctrica y salen "disparadas" hacia el interior de la célula ya que la fuerza física del impacto supera la barrera de la membrana celular.

La terapia génica es un método terapéutico que puede tratar una amplia gama de enfermedades genéticas devastadoras que van desde la diabetes mellitus tipo 1, la fibrosis quística e incluso el cáncer. Desde los primeros experimentos realizados y aprobados en 1990, los primeros ensayos en humanos en 2003 y el primer producto de terapia génica aprobado por la Unión Europea en 2013, el interés del sector privado en el uso de la terapia génica como producto farmacéutico ha ido creciendo junto con los avances en la investigación (Wood et al., 2019). En el campo de las patologías oculares, las terapias avanzadas ya son una realidad gracias a que el ojo presenta una serie de ventajas para el uso de este tipo de terapias: es un órgano externo y transparente, de fácil acceso tanto para la introducción del material terapéutico como para la monitorización de seguridad y eficacia por evaluación oftalmológica (funduscopia, ERG, OCT, etc). Por otra parte, el ojo se encuentra relativamente aislado del resto del organismo por la barrera hemato-ocular, lo que limita la dispersión de virus, genes o células ectópicas por el resto del organismo (Ochakovski et al., 2017). Como prueba de estos avances, en 2018 fue aprobado y comercializado el primer medicamento de terapia génica para ceguera hereditaria causada por mutaciones en el gen *RPE65*. El tratamiento consiste en una inyección en el espacio subretiniano de una dosis de virus adeno-asociado de serotipo 2 (AAV2) que sirve como vector para una copia funcional del gen *RPE65*. El nombre de comercialización es Luxturna® y es el resultado de 14 años de estudios preclínicos y clínicos en laboratorios de Estados Unidos y Reino Unido. Los investigadores implicados en su desarrollo han demostrado un claro beneficio en los pacientes tratados con esta terapia de aumento génico, con mejoras en la sensibilidad a la luz, el campo visual y la capacidad de deambulación (Russell et al., 2017). Los estudios iniciales de terapia con *RPE65*, que demostraron seguridad y eficacia, supusieron un enorme impulso en el campo de la terapia génica ocular (Bainbridge et al., 2008a; Cideciyan et al., 2008a; Hauswirth et al., 2008; Maguire et al., 2008a). Actualmente se están desarrollando ensayos clínicos en fase I/II para los genes *CHM* (MacLaren et al., 2014), *MERTK* (del inglés proto-oncogen tyrosine-protein kinase MER) (Ghazi et al., 2016) y otros ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

A pesar de que la terapia de aumento de genes es muy prometedora, hay dudas y problemas aún por resolver. Si con el tiempo se produce una pérdida de eficacia clínica y fuera necesario re-administrar una segunda dosis de AAV2, es muy posible que la respuesta inmune al virus sea activada. Por otra parte, algunos ensayos han mostrado ineficacia terapéutica del aumento génico por falta de control de los niveles de expresión del gen ectópico o bien por efecto dominante-negativo. Por último, destacar la limitación en el tamaño de empaquetamiento de los vectores disponibles para terapia génica que hace inviable esta aproximación para enfermedades causadas por pérdida de función con un ADN de gran tamaño como es el caso de *EYS*, *ABCA4* y

*USHA2*, que suponen más del 25% de todas las retinopatías hereditarias (Verbakel et al., 2018).

### 1.3.3.3. Edición génica.

La terapia génica se ha definido históricamente como la adición de nuevos genes a las células humanas. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la edición del genoma es una prometedora tecnología con la que puede manipularse con precisión la secuencia del genoma humano para lograr un efecto terapéutico (Maeder & Gersbach, 2016). Esto incluye la corrección de mutaciones que causan enfermedades, la adición de genes terapéuticos a sitios específicos del genoma y la eliminación de genes letales o secuencias del genoma.

Clásicamente, la manipulación dirigida del genoma se puede conseguir mediante recombinación homóloga (RH), sin embargo, su baja eficiencia en células de mamíferos, llegó a limitar el uso de esta estrategia. El diseño de nucleasas dirigidas es un método de selección que aumenta la eficiencia de la RH debido a la introducción del corte en la doble cadena de ADN (DSBs, del inglés *DNA Double-Strand Breaks*). En el caso de enfermedades monogénicas, las herramientas de corrección incluyen nucleasas de dedos de zinc (ZFN, del inglés *Zinc-finger nucleases*), nucleasas efectoras parecidas al activador transcripcional (TALEN, del inglés *transcription activator-like effector nucleases*) y repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR, del inglés *Clustered Regularly interspaced Short Palindromic Repeats*) – proteína asociada a CRISPR (Cas9, del inglés *CRISPR-associated protein*) (Carroll et al., 2006; Cong et al., 2013; Sanjana et al., 2012). ZFNs y TALENs son proteínas que se unen al ADN fusionadas a la nucleasa Fok1. Fok1 actúa como dímero y el DSB solamente se produce cuando las proteínas quiméricas ZFNs o TALENs actúan en las secuencias próximas. Sin embargo, el sistema CRISPR-Cas9 corta las secuencias diana vía nucleasa Cas9 usando el ARN complementario como guía hacia al secuencia de ADN de interés. Una vez que se ha creado una ruptura específica de DSBs, la secuencia de ácidos nucleicos puede ser reparada al azar mediante recombinación no homóloga (NHEJ, del inglés *non-homologous end joining*), o específicamente mediante recombinación homóloga (HDR, del inglés *homology directed repair*).

Resumiendo, los principios fundamentales de todas las tecnologías de edición de genes son: i) la creación de rupturas del ADN bicatenario en sitios específicos predeterminados y ii) corrección de estas rupturas de la doble hebra mediante modificación o introducción de genes (Ceasar et al., 2016).

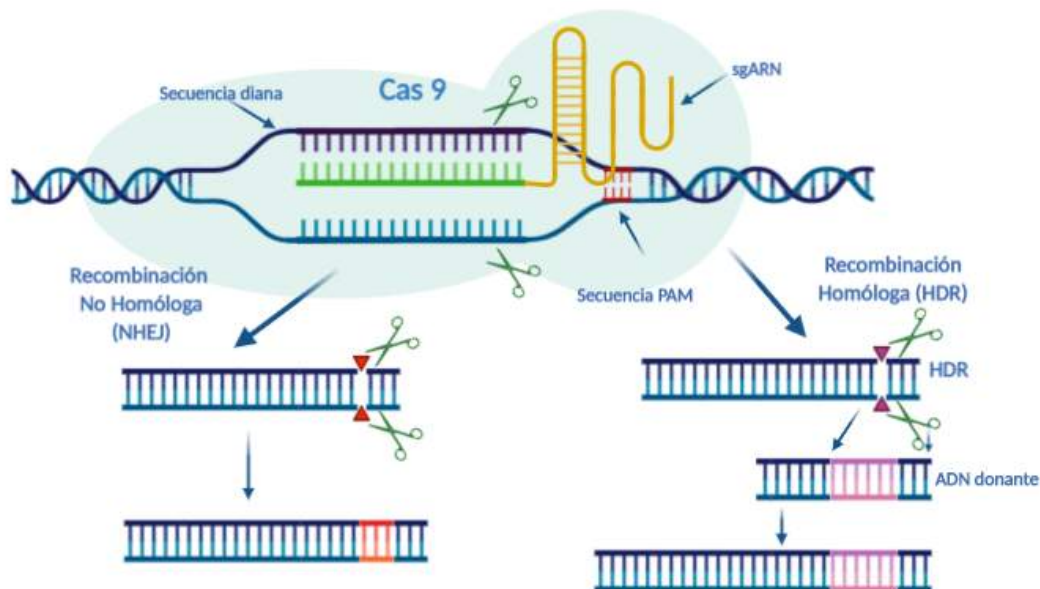
Comparando las tres herramientas de corrección citadas, el sistema CRISPR-Cas9 posee algunas ventajas con respecto a los otros dos sistemas. En primer lugar, el sistema CRISPR-Cas9 es más fácil de diseñar y de usar porque solo requiere el diseño de un ARN simple en lugar de la síntesis de una proteína



guía nueva como en el caso de ZFN y TALENs. Además, CRISPR-Cas9 puede dirigirse simultáneamente a múltiples sitios del ADN genómico de las células si se proporcionan múltiples ARN simples (Dai et al., 2016).

- CRISPR-Cas9: definición y aplicaciones.

La metodología CRISPR-Cas9 (Figura 24) se basa en un sistema de defensa bacteriano frente a otras bacterias y virus que introducen cortes de doble cadena de ADN en secuencias específicas (Bhaya et al., 2011; Mojica et al., 2005). Su manipulación como herramienta biotecnológica permite diseñar e introducir cambios en la secuencia de ADN genómico de células eucariotas de manera altamente específica, por lo que en los últimos años CRIPR-Cas9 ha adquirido numerosas aplicaciones biotecnológicas (Jinek et al., 2012).



**Figura 24.** Esquema que representa la edición génica mediante el sistema CRISPR-Cas9. Cas9 dirigida por el ARN guía (sgARN) corta el ADN en un sitio específico gracias a la presencia de la secuencia PAM (del inglés *protospacer adjacent motif*). Las roturas que se producen en la doble cadena se reparan mediante recombinación no homóloga (NHEJ) o recombinación homóloga (HDR). Abreviaturas: sgARN (ARN guía); PAM (del inglés *protospacer adjacent motif*); NHEJ (recombinación no homóloga); HDR (recombinación homóloga). Imagen diseñada con el software BioRender.

El sistema está formado por una ribonucleoproteína (RNP) que contiene la nucleasa, denominada Cas9 y es la que produce una rotura de doble cadena en el ADN de la célula huésped, junto con el ARN guía, que lleva la información de la especificidad de la secuencia (Dai et al., 2016; Jinek et al., 2012). Para dirigir el corte a una secuencia diana, el ARN guía contiene una zona de

restricción denominada PAM (del inglés *protospacer adjacent motif*). Se trata de una secuencia de 2 a 6 bases adyacentes a la secuencia de reconocimiento del ARN guía. En el caso de Cas9, la nucleasa más usada hasta el momento, procedente de *Streptococcus pyogenes*, la secuencia PAM es un triplete NGG. Un corte de doble cadena en el ADN es incompatible con la supervivencia de la célula, por lo que la actividad de la nucleasa induce la reparación sin molde homólogo, o bien con un molde por recombinación homóloga (Iliakis et al., 2004). La reparación NHEJ genera mutaciones de inserción o deleción (indel) y no requiere de un ADN molde, además este mecanismo tiene un nivel de actividad en la célula muy superior al HDR, por lo que las aproximaciones terapéuticas en las que el objetivo sea destruir la expresión de un gen son mucho más sencillas de alcanzar que cuando se trata de reparar una mutación específica (Burnight et al., 2018).

CRISPR-Cas se puede utilizar para eliminar la expresión de genes específicos, activar la expresión de otros, ayudar en la introducción de ADN extraño en el genoma y modificar epigenéticamente el ADN *in vivo* (Cabral et al., 2017). Similar a la terapia génica, los vectores virales recombinantes se usan normalmente para administrar los componentes del sistema CRISPR-Cas a las células de interés, pero existen otros métodos de administración que incluyen vectores no virales físicos como por ejemplo la electroporación, así como otros vectores no virales como liposomas y nanopartículas (Lino et al., 2018).

Aunque estamos en una fase muy activa de innovación y puesta a punto de esta metodología, ya ha habido ensayos prometedores para su uso terapéutico. La primera demostración de que este sistema se puede usar en terapia, se realizó sobre modelos de ratón de tirosinemia, a los que se les inyectó un sistema de edición CRISPR-Cas9 y gracias a la recombinación homóloga se llevó a cabo la corrección de 1/250 hepatocitos. Posteriormente, la expansión de las células corregidas tuvo un efecto terapéutico (Yin et al., 2014). A pesar de que el uso de CRISPR-Cas para el tratamiento de enfermedades aún está en su infancia, existe un gran potencial para que esta tecnología tenga un impacto dentro de la oftalmología, donde ya se está implantando con éxito a través del tratamiento *ex vivo* de células iPS derivadas de pacientes enfermos con RP, LCA y otras (Bassuk et al., 2016; Cho et al., 2018; Tang et al., 2016). Además, esta tecnología se ha utilizado *in vivo* para corregir una variedad de mutaciones en modelos de ratón con distrofias retinianas (Bassuk et al., 2016; Cho et al., 2018; W. H. Wu et al., 2016). Por otro lado, se está utilizando CRISPR-Cas para generar modelos animales que permitan estudiar enfermedades humanas (H. Yang et al., 2013; Zuo et al., 2017).

Una de las preocupaciones más importantes que genera el sistema CRISPR-Cas son las mutaciones no intencionadas que surgen por un corte esporádico



de la doble hebra de ADN por inexactitud del direccionamiento de la guía de ARN y su reconocimiento defectuoso de la secuencia PAM. Esto ha llevado a las áreas de investigación activas a aumentar la especificidad de CRISPR-Cas y detectar mutaciones fuera del objetivo a través de predicciones de algoritmos *in silico*, selección *in vitro* y ensayos completos del genoma (Wood et al., 2019).

Aunque los intereses del sector privado en la edición de genes no han progresado tanto como la terapia génica, ya comienza a causar un impacto. Dos empresas están a la vanguardia de los ensayos clínicos basados en CRISPR-Cas. Editas Medicine (Cambridge, MA) anunció recientemente su intención de presentar una nueva solicitud de un medicamento en investigación para tratar la LCA. Además, la compañía planea tener tres ensayos clínicos en etapa inicial y dos en etapa tardía para 2022. Por otro lado, CRISPR Therapeutics (Zug, Suiza) está llevando a cabo ensayos clínicos para tratar la beta talasemia, un tipo de trastorno sanguíneo hereditario que se caracteriza por la síntesis reducida o ausencia de cadenas beta de hemoglobina lo que provoca el desarrollo de anemia (Wood et al., 2019). Por lo tanto, se podría concluir que aunque a día de hoy CRISPR-Cas es un sistema que aún no ha alcanzado su madurez, está adquiriendo un fuerte impacto en la comunidad científica y existe un gran potencial para que esta tecnología sea empleada para el tratamiento de enfermedades dentro del campo de la oftalmología así como otras muchas áreas.

#### **1.3.4. Terapia optogenética.**

La optogenética es una técnica combina métodos ópticos (destellos de luz que provienen de un láser o un diodo de emisor de luz (LED)) con métodos genéticos para transferir a un grupo específico de neuronas el ADN que codifica proteínas de origen microbiano sensibles a la luz. Está centrada en el uso de opsinas microbianas que con una alta precisión temporal, pueden ser activadas por la luz. Estas opsinas destacan porque son capaces de cambiar de configuración ante una adecuada frecuencia electromagnética y abrir poros en las membranas neuronales, produciendo una alteración del nivel de polarización de las neuronas. Además, estas opsinas son consideradas la parte óptica de la optogenética ya que tienen la capacidad de controlar su expresión dentro de unas células y no de otras (Figura 25). Gracias a los avances en biología e ingeniería genética, este control genético es posible. La terapia optogenética una herramienta ideal para identificar el funcionamiento de circuitos cerebrales neuronales y está levantando muchas expectativas dentro de la comunidad neurocientífica, ya que supone un gran avance para estudiar y tratar diversas enfermedades neurodegenerativas (Scholl et al., 2016; Tye & Deisseroth, 2012)



**Figura 25.** Principio de optogenética en neurociencia. Tanto para activar como para inhibir, la optogenética resuelve el problema de falta de especificidad de estimulación eléctrica. Solo las neuronas que expresan opsinas son activadas por el láser. Modificada de Deisseroth (Deisseroth, 2011).

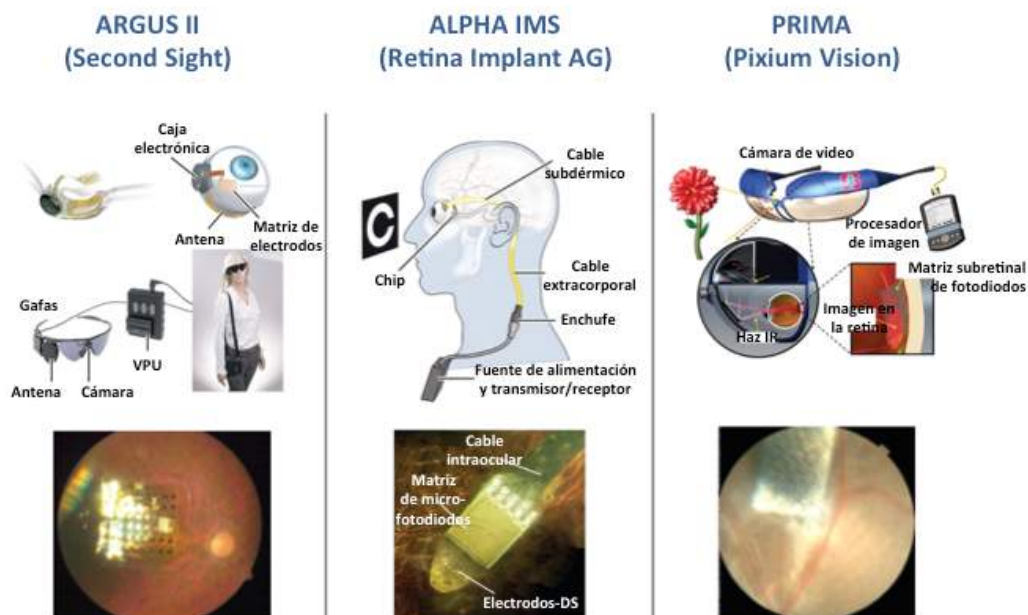
En el campo de la oftalmología, se han visto resultados prometedores en modelos celulares y animales y los primeros ensayos clínicos se han iniciado, concretamente en pacientes con RP donde se pretende aplicar la terapia optogenética como forma de restaurar la visión al enfocar tipos específicos de células en la retina con optogenes que permiten que las células no sensibles a la luz se vuelvan sensibles (Scholl et al., 2016; Tye & Deisseroth, 2012).

### 1.3.5. Prótesis artificiales.

Las prótesis retinianas son pequeños dispositivos que contienen microelectrodos capaces de convertir la luz en impulsos eléctricos. Dentro del ojo, se han implantado microchips en posición epiretinal, subretinal y supracoroidal. Cada tipo de implante tiene sus ventajas e inconvenientes (Cheng et al., 2017). Actualmente se están llevando a cabo investigaciones en prótesis de retina, algunas de las cuáles ya han sido aprobadas en Europa y Estados Unidos. Entre estas están, Argus II de Second Sight Medical Products (Figura 26) e IRIS II de Pixium Visium que están formadas por un conjunto de electrodos múltiples que se implantan en la zona epiretinal del ojo para estimular eléctricamente las células ganglionares. Ambos dispositivos son electrodos que requieren de la interacción de una serie de componentes como una cámara de video alojada en las gafas del paciente y una unidad de procesamiento que procesa la imagen y convierte la información visual en un patrón espacio-temporal de estímulos eléctricos que eventualmente se envían a los electrodos. La resolución relativamente baja de los chips (60 electrodos en el caso de Argus II y 150 en el caso de IRIS II) permite a los pacientes experimentar percepciones simples, lo que indica que el cerebro puede aprender a elaborar señales primitivas de la retina. A día de hoy ambos dispositivos se han usado en pacientes afectados con RP aunque Argus II ya se ha empezado a implantar en casos de DMAE (Benfenati & Lanzani, 2018;

Cheng et al., 2017; Özmert & Arslan, 2019).

Los chips sensibles a la luz, compuestos de fotodiodos conectados a electrodos estimulantes que imitan la función de los fotorreceptores, generalmente se implantan en el espacio subretiniano sustituyendo a los fotorreceptores degenerados. Los dispositivos Alpha IMS de Retina Implant AG y Prima de Pixium Visium (Figura 26), son chips activos en los que una gran variedad de unidades de fotodiodos convierten la luz en una estimulación eléctrica de la retina externa. Alpha IMS es directamente sensible a luz ambiental pero necesita cableado para la fuente de alimentación. Por otro lado, Prima se alimenta de forma inalámbrica con un haz de infrarrojos que alimenta y envía la información al chip fotovoltaico, pero necesita una cámara externa para convertir la imagen visual en la información y el suministro de infrarrojos. Prima muestra una arquitectura más avanzada en la que cada “unidad de píxeles” se compone de 3 fotodiodos en serie que son sensibles a la luz infrarroja y un electrodo que inyecta corriente en el tejido con un retorno concentrado a nivel local que evita que la corriente se difunda a las áreas retinianas adyacentes. Alpha IMS se encuentra en una etapa avanzada de experimentación humana en pacientes con RP y ya ha sido aprobado su uso en Europa, mientras que Prima se ha implantado en ratas y monos con resultados prometedores de rescate visual y sus estudios están centrados en la aplicación del dispositivo en pacientes con DMAE seca atrófica (Benfenati & Lanzani, 2018; Manfredi et al., 2019).



**Figura 26.** Ejemplos de algunas de las prótesis retinianas que actualmente se encuentran en desarrollo. Abreviaturas: VPU (unidad de procesamiento de la visión); DS (DropSens); IR (infrarrojo). Modificada de Manfredi et al. (Manfredi et al., 2019).

A pesar de las propiedades tecnológicas avanzadas de los dispositivos mencionados, los problemas comunes que presentan son la biocompatibilidad limitada de los chips rígidos, la incapacidad de cubrir áreas retinianas grandes, altos niveles de impedancia y producción de calor. Es por ello que actualmente se están llevando a cabo investigaciones con polímeros orgánicos que se pueden fabricar fácilmente y son compatibles con los tejidos debido a la conformación y biocompatibilidad intrínseca ya que se trata de polímeros de carbono similares a las macromoléculas biológicas. Cabe mencionar el poli (3-hexiltiofeno-2,3-diilo) regioregular (RR-P3HT) ya que es el material más estudiado a día de hoy para prótesis orgánica de retina y el único empleado con éxito en experimentos *in vivo* hasta el momento (Benfenati & Lanzani, 2018; Manfredi et al., 2019).

### 1.3.6. Terapia celular.

El Reglamento del Parlamento Europeo (CE N° 1394/2007) define a los medicamentos de terapia celular como:

*“Un medicamento biológico con las siguientes características:*

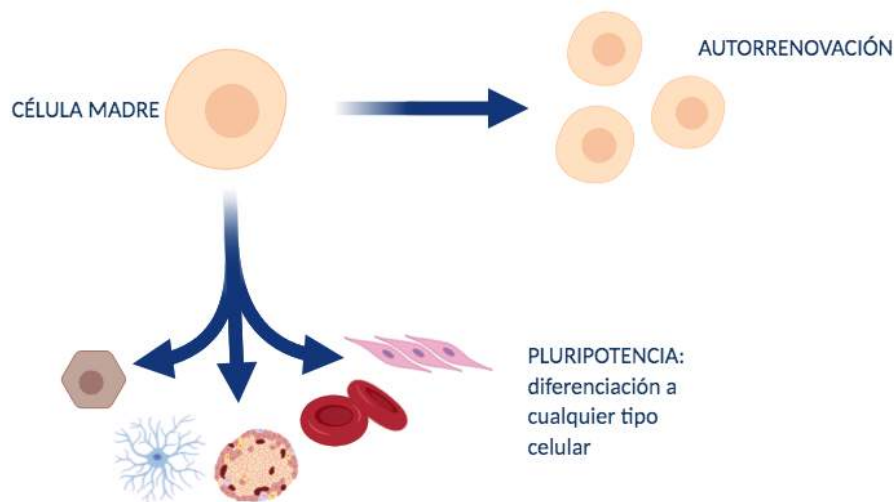
- *contiene células o tejidos, o está constituido por ellos, que ha sido objeto de manipulación sustancial de modo que se hayan alterado sus características biológicas, funciones fisiológicas o propiedades estructurales pertinentes para uso clínico previsto, o por células o tejidos que no se pretende destinar a la misma función esencial en el receptor y en el donante.*
- *se presenta con propiedades para ser usado por seres humanos, o administrado a los mismos, con objeto de tratar, prevenir o diagnosticar una enfermedad mediante la acción farmacológica, inmunológica o metabólica de sus células o tejidos”*

#### 1.3.6.1. Células madre: definición y clasificación.

Una célula madre se define como aquella célula que tiene la capacidad de renovarse durante la vida del organismo y al mismo tiempo produce una progenie celular que madura y se diferencia en las células específicas de los órganos que constituyen. El equilibrio entre las poblaciones de células madre y las células diferenciadas es fundamental para el desarrollo embrionario y para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos.

Como se ha mencionado, hay dos características principales que definen a una célula madre, su capacidad de autorrenovarse y su capacidad pluripotente (Figura 27), ya que bajo ciertas condiciones fisiológicas o experimentales,

puede ser inducida a convertirse en células con funciones especializadas (Evans & Kaufman, 1981; Thomson, 1998). La autorrenovación y la pluripotencia hace que las células madre sean únicas. La capacidad pluripotente es quizás la característica más relevante de las células madre desde un punto de vista terapéutico, ya que las células madre tienen la capacidad de diferenciarse a cualquier tipo de célula que constituya un organismo adulto porque han demostrado que son capaces de diferenciarse hacia las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo.



**Figura 27.** Características de las células madre. Las capacidades de autorrenovación y de pluripotencia son cruciales para la formación de los 200 tipos celulares diferentes que forman un individuo sano. Imagen diseñada con el software BioRender.

Hay dos formas de clasificar las células madre, dependiendo de su capacidad de diferenciación o potencial o dependiendo de su origen. Atendiendo a su capacidad para diferenciarse en otros tipos celulares, las células madre pueden ser totipotentes, pluripotentes, multipotentes o unipotentes.

**Células totipotentes.** Células madre que son capaces de diferenciarse en todos los tipos celulares posibles. Tienen una capacidad de organización para generar un organismo completo (Niwa, 2007). En mamíferos, solo el cigoto y los primeros blastómeros son totipotentes.

**Células pluripotentes.** Células madre que pueden dar lugar a tipos celulares de las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. Se diferencian de las totipotentes en que las células pluripotentes no dan lugar al trofoblasto, que es el tejido que formará la placenta en un embrión en desarrollo. Un ejemplo de células pluripotentes son las células de la masa

celular interna (ICM), específicas del embrión temprano (Pera & Tam, 2010).

**Células multipotentes.** Células madre más diferenciadas que pueden dar lugar a todos los tipos celulares dentro de la misma capa germinal. Esta propiedad es típica de células madre adultas que permiten la regeneración del tejido dentro del órgano donde están localizadas. Por ejemplo, las células madre mesenquimales pueden dar lugar a células óseas, musculares o adiposas.

**Células unipotentes.** Células madre que solo pueden generar un tipo celular, como por ejemplo las células madre espermatogoniales que solo pueden formar espermatozoides (Jaenisch & Young, 2008).

Por otro lado, la clasificación de las células madre atendiendo a su origen tiene en cuenta el tejido del que han sido aisladas y se pueden clasificar en células madres embrionarias, células madre germinales y células madre somáticas o adultas.

**Células madre embrionarias (ESC).** Son células derivadas del epiblasto del blastocisto obtenidas en las fases iniciales del desarrollo embrionario. Se pueden expandir de forma indefinida en condiciones de cultivos *in vitro* adecuadas aunque es difícil encontrar una fuente estable de ESC humanas, y además, hay que tener en cuenta las consideraciones éticas asociadas al uso de embriones humanos para aislarlas (Evans & Kaufman, 1981; Thomson, 1998; J. Yu & Thomson, 2008)

**Células madre germinales.** Se aíslan de la cresta germinal de un feto con varias semanas de desarrollo y son las células que dan lugar a los gametos (espermatozoides y ovocito) aunque potencialmente podrían originar otros tipos celulares (J. Yu & Thomson, 2008)

**Células madre adultas o somáticas.** Son células indiferenciadas que se localizan en tejidos adultos o fetales ya diferenciados. Tienen una capacidad limitada de autorrenovarse y generalmente solo pueden diferenciarse en los tipos celulares asociados con el tejido del que proceden. Muchos tejidos tienen nichos de células madre somáticas, como es el caso del páncreas, el cerebro, la médula ósea, la piel, la sangre y el ojo, entre otros.

#### 1.3.6.2. Células madre de pluripotencia inducida (iPSCs).

Durante muchos años, atendiendo al “paisaje epigenético” descrito por Conrad Waddington, la diferenciación celular se consideró un proceso que se producía en un único sentido, es decir, desde un estado inmaduro hasta un estado

diferenciado maduro, pensándose que la información genética que no era necesaria se inactivaba o se eliminaba de forma definitiva en las células relacionadas con un estado de diferenciación específico o totalmente diferenciadas (Creighton & Waddington, 1958; Weismann et al., 1894).

En 1962, Sir John Gurdon logró transferir el núcleo de una célula somática de un renacuajo a un ovocito, generando ranas clonadas y demostrando que las células somáticas son capaces de retener la información genética y que podían revertir su estado diferenciado si eran manipuladas artificialmente (Gurdon, 1962). Años más tarde, fue demostrado que forzando la expresión del gen de diferenciación miogénica 1 (*Myod1*) se permitía la conversión directa de fibroblastos de ratón en mioblastos (Davis et al., 1987).

Por lo tanto, se puede afirmar que tanto la transferencia nuclear de células somáticas como la reprogramación directa fueron dos descubrimientos que sentaron las bases para desarrollar el concepto de “pluripotencia inducida”. Aunque fue en el año 2006 cuando Shinya Yamanaka y su grupo de investigación descubrieron las células madre de pluripotencia inducida (iPSCs), lo que supuso un gran salto en esta área de investigación ya que demostraron que activando una serie de genes en las células somáticas se revertía su estado diferenciado hacia un estado pluripotente. Este descubrimiento le supuso ser galardonado con el Premio Nobel a finales de 2012.

#### 1.3.6.3. Sistemas de reprogramación.

Las iPSCs fueron generadas por primera vez utilizando retrovirus para introducir y expresar ectópicamente cuatro factores de transcripción asociados a pluripotencia (*octamer-binding transcription factor 4 (Oct4)*, *sex determining region Y-box 2 (Sox2)*, *Kruppel-like factor 4 (Klf4)*, *avian myelocytomatosis viral oncongen homolog c (c-Myc)*) (OSKM) definidos en células embrionarias y adultas de ratón (Takahashi & Yamanaka, 2006). Un año después, Yamanaka y colaboradores, utilizaron la misma metodología para generar iPSC humanas partiendo de fibroblastos humanos (Takahashi et al., 2007). Ese mismo año y de forma paralela, Yu y colaboradores reprogramaron fibroblastos humanos utilizando los factores de transcripción *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* y *Lin28* (J. Yu et al., 2007).

Desde su descubrimiento, una gran variedad de células somáticas obtenidas de diferentes tipos de tejidos han sido reprogramadas exitosamente para generar iPSCs como por ejemplo: fibroblastos adultos y embrionarios (Takahashi et al., 2007; J. Yu et al., 2007), queratinocitos (Aasen et al., 2008), tejido adiposo (Sun et al., 2009), sangre periférica (Loh et al., 2009), sangre del cordón umbilical (Giorgetti et al., 2009), células derivadas del líquido amniótico (Ye et al., 2009) y células precursoras neurales (J. B. Kim et al., 2009) entre

otras.

La introducción de los factores de transcripción OSKM en las células diana es un proceso esencial para inducir la pluripotencia. A día de hoy, hay distintos sistemas de reprogramación que se agrupan en función de su naturaleza viral (vectores virales y no virales) o de su capacidad para integrarse en el genoma de la célula huésped (sistemas integrativos y no integrativos). Dentro de los sistemas integrativos destaca el uso de lentivirus y retrovirus, aunque al ser métodos integrativos pueden producir alteraciones cromosómicas e influir en las características de las líneas celulares obtenidas (Kang et al., 2015; Rony et al., 2015; Schlaeger et al., 2015).

Se ha llevado a cabo el desarrollo de diferentes sistemas no integrativos como son transposones, vectores lentivirales extraíbles, vectores episomales y minicirculares, vectores virales no integrativos (adenovirus y virus Sendai), proteínas recombinantes, vectores sintéticos de ARN mensajero (ARNm) o reprogramación química con el fin de reducir o eliminar las posibles alteraciones en el genoma y para mantener o mejorar la eficiencia del proceso de reprogramación (Malik & Rao, 2013).

Entre todos los métodos mencionados hay que destacar el virus Sendai (del inglés *Sendai virus*, SV) ya que es uno de los métodos no integrativos más seguro y eficaz para reprogramar células somáticas dando lugar a iPSCs sin alteraciones en el genoma (del inglés *footprint-free iPSCs*) (Schlaeger et al., 2015). SV es un virus de ARN monocatenario negativo que no está integrado en el genoma del huésped y no es patógeno para los humanos (Li et al., 2000). El genoma del SV codifica para las distintas subunidades de la ARN polimerasa, el receptor de ácido siálico o hemaglutinina-neuraminidasa, las proteínas estructurales que forman la envuelta viral y una proteína de fusión que se activa por acción de una proteasa y fusiona la envuelta viral con la membrana de la célula huésped. El SV destaca por dos propiedades fundamentales, por un lado, se trata de un virus que infecta una gran cantidad de células de distintas especies animales debido al ácido siálico, compuesto que está presente en la superficie de gran cantidad de especies animales, y es el mecanismo por el cual el SV infecta a las células y por otro lado, los vectores de ARN que componen el virus permanecen en el citoplasma, por lo tanto, no alteran la información genética de la célula huésped ya que no se integran en su genoma (Fusaki et al., 2009; Seki et al., 2010).

Para llevar a cabo la reprogramación celular, se utilizan vectores del virus donde se ha modificado el gen que codifica la proteína de fusión, y, también se han introducido mutaciones para que determinadas proteínas sean sensibles a la temperatura. Gracias a estas modificaciones se evita la transmisión y propagación del virus hasta que finalmente son eliminados del citoplasma de la



célula que infectan (Fusaki et al., 2009; Inoue et al., 2003). A día de hoy, ya existe un kit de reprogramación de grado clínico (del inglés, *CTS™ CytoTune™-iPS 2.1 Sendai Reprogramming Kit*) lo que supone un avance importante a la hora de reprogramar células somáticas bajo condiciones de buenas prácticas de producción (GMP, del inglés *Good Manufacturing Practice*). Por último, mencionar algunos de los inconvenientes del sistema SV entre los que conviene destacar la eliminación del virus relativamente lenta de la célula huésped y la dificultad de usar otros factores de reprogramación ya que se depende de un kit comercial (Schlaeger et al., 2015).

#### 1.3.6.4. Cultivo y caracterización de iPSCs.

- Cultivo

Desde que las iPSCs fueron descubiertas en 2006, se han descrito numerosas condiciones de cultivos con el fin de ir mejorando y satisfacer todas las necesidades que presenta este tipo celular. Para mantener la línea celular en unas condiciones de cultivo óptimas y que, además, mantengan su capacidad pluripotente, es necesario que tanto el medio de cultivo, las matrices como los métodos de subcultivo se utilicen de manera adecuada.

Generalmente, se podrían distinguir dos sistemas de cultivo de iPSCs: cultivos basados en el uso de células *feeder* o alimentadoras (*feeder-systems*) y cultivos libres de células *feeder* o alimentadoras (*feeder-free systems*) (Skottman & Hovatta, 2006).

Por un lado, los sistemas de cultivo *feeder* están basados en el uso de fibroblastos que se han inactivado mitóticamente y cuya función es principalmente el enriquecimiento del medio de cultivo con proteínas de la membrana extracelular y factores de crecimiento necesarios para el cultivo de las iPSCs. Este tipo de sistemas se uso por primera vez para el aislamiento y cultivo de ESCs y, a día de hoy, se sigue utilizando (Hoffman & Carpenter, 2005; Skottman & Hovatta, 2006). Por otro lado, los sistemas libres de *feeders* son aquellos en los que el medio es suplementado con proteínas y factores de crecimiento que compensen la ausencia de las células alimentadoras. El uso de estos sistemas permite realizar experimentos de citometría de flujo o análisis molecular que no se pueden realizar con los sistemas de cultivo *feeders* debido a la mezcla de tipos celulares. Cuando es preciso cambiar de un sistema de cultivo con *feeders* a otro sin *feeders*, es importante tener en cuenta que este pase puede ser muy dañino para las células y deben utilizarse protocolos que se adapten mejor a las células con las que estamos trabajando (Wagner & Welch, 2010).

Conviene destacar que tanto para los sistemas *feeders* como para los libres de *feeders* es imprescindible un correcto mantenimiento de los cultivos basado principalmente en el cambio diario de medios y evitando la diferenciación celular mediante subcultivos realizados manera regular. Para llevar a cabo el subcultivo celular, es necesario saber que las células se levantan formando agregados o fragmentos, excepto en aquellos experimentos donde sea necesario una separación total de las células. Además, para que el mantenimiento de las iPSCs sea el correcto, es muy importante conocer el tamaño óptimo de los agregados, ya que si son demasiado pequeños no se adhieren al cultivo y si son demasiado grandes de lo normal se diferencian (Beers et al., 2012; Skottman & Hovatta, 2006).

- Caracterización

Cuando se genera una nueva línea de iPSCs es necesario testar su calidad mediante la caracterización de la misma. Para ello se llevan a cabo una serie de pruebas donde se estudia la capacidad pluripotente de la línea generada y se detectan las posibles anomalías que pueden afectar al comportamiento y seguridad celular. Por lo general, para realizar la caracterización de una nueva línea de iPSCs se llevan a cabo las siguientes pruebas (Adewumi et al., 2007; Crook et al., 2010; Martí et al., 2013):

- ✓ Estudio de la morfología. Morfológicamente, las colonias de iPSCs obtenidas deben ser idénticas a las ESCs. Deben tener un ratio núcleo/citoplasma elevado, bordes muy definidos y nucléolos prominentes.
- ✓ Evaluación de la capacidad pluripotente. La detección de la capacidad pluripotente de la línea generada se puede estudiar a través de su específica actividad enzimática mediante el uso de enzimas como la fosfatasa alcalina que como resultado de su actividad enzimática aporta una coloración azul/morada a las células (Sharma et al., 2014). Posteriormente, para continuar confirmando la capacidad pluripotente de la línea generada, se realizan técnicas de inmunocitoquímica y microscopía o de inmunocitoquímica y citometría de flujo donde se detectan marcadores de superficie como por ejemplo SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 y TRA-1-81, y marcadores intracelulares como por ejemplo NANOG, SOX2 y OCT4.
- ✓ Estudios de expresión génica. Se estudia la expresión de genes relacionados con la pluripotencia ya que las iPSCs tienen que tener un perfil de marcadores similar a las ESCs. Estos genes son *NANOG*, *OCT4*, *SOX2* o *TERT*, entre otros. Por otro lado, a nivel de expresión génica, es necesario confirmar el silenciamiento o eliminación de los vectores que se han utilizado para introducir los

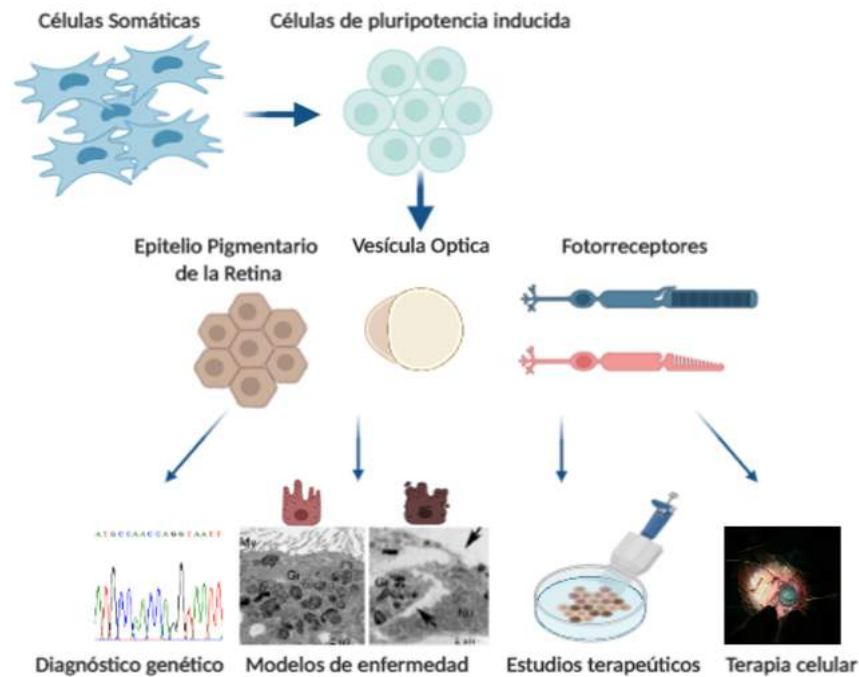
factores de reprogramación en las células dianas.

- ✓ Evaluación de la estabilidad genética. Está demostrado que largos periodos de cultivo de las células iPSCs pueden dar lugar a alteraciones cromosómicas, por ello es necesario realizar técnicas de cariotipado que verifiquen la ausencia de estas alteraciones. Normalmente, para detectar cambios en la dotación cromosómica de las iPSCs, la técnica más utilizada es el cariotipo convencional por bandas G.
- ✓ Estudios de identificación celular. Mediante análisis de microsatélites (del inglés *short tandem repeats*, STRs) se estudia la huella genética necesaria para confirmar que la línea de iPSCs generada procede de la célula somática de origen. Esta técnica también se utiliza para detectar la presencia de un tipo celular de diferente origen, lo que indicaría contaminación por células *feeders* (si es el caso).
- ✓ Capacidad de diferenciación. Se puede llevar a cabo con ensayos *in vitro* mediante la formación de cuerpos embrionarios o ensayos *in vivo* mediante la formación de teratomas en ratones inmunodeprimidos y se utiliza para estudiar la capacidad de las iPSCs para diferenciarse hacia las tres capas germinales: endodermo, ectodermo y mesodermo.

#### 1.3.6.5. Aplicaciones biomédicas de las iPSCs.

La tecnología de las iPSCs es una herramienta prometedora de gran potencial para su uso en biomedicina. Las iPSCs son una fuente celular de fácil acceso e inagotable que tienen la capacidad de diferenciarse hacia cualquier tipo celular bajo los estímulos adecuados. Además, las iPSCs se alejan de los problemas éticos relacionados con las ESCs, ya que se obtienen sin necesidad de trabajar con embriones humanos (Hirschi et al., 2014; J. Zhao et al., 2013).

Basándonos en estas propiedades y teniendo en cuenta que pueden utilizarse para recapitular aspectos del desarrollo embrionario humano *in vitro*, las iPSCs son reconocidas por tres aplicaciones fundamentales (Figura 28): i) modelos celulares *in vitro* utilizados para el estudio de enfermedades humanas, ii) testado de fármacos *in vitro* y iii) uso terapéutico en medicina regenerativa mediante la generación de líneas de iPSCs derivadas de individuos sanos o líneas de iPSCs derivadas de pacientes con enfermedades genéticas cuyo defecto genético es corregido gracias al uso de herramientas de edición génica (S. M. Wu & Hochedlinger, 2011; J. Zhao et al., 2013).



**Figura 28.** Diferentes aplicaciones de las iPSCs en las patologías de la retina. Imagen diseñada con el software BioRender.

#### 1.3.6.6. iPSCs como modelo para enfermedades degenerativas de la retina.

Las iPSCs se han convertido en una herramienta vital de investigación aunque aún quedan importantes barreras clínicas para su uso, como el potencial de oncogenicidad, la falta de homogeneidad en poblaciones de células diferenciadas, la inestabilidad genética y los recursos masivos necesarios para generar líneas seguras y efectivas a partir de un paciente (Singh et al., 2018). Hasta la fecha, hay numerosos trabajos publicados, algunos de ellos de nuestro laboratorio, en los que se han generado líneas de iPSCs como modelo celular *in vitro* de enfermedades de la retina (Figura 28) que pueden ayudarnos a profundizar en el estudio de las bases moleculares de las mismas y desarrollar terapias personalizadas, ya que es difícil recapitular muchas de estas enfermedades en modelos de roedores (Ikelle et al., 2020). Como ejemplo, Lukovic et al. (2015) generaron iPSCs a partir de fibroblastos de un paciente diagnosticado con una forma severa y de inicio temprano de RPar causada por una mutación en *MERTK*. Tras la diferenciación de las iPSCs hacia EPR, las células de EPR específicas del paciente mostraron una fagocitosis defectuosa, fenotipo característico por la deficiencia de *MERTK* ya observado en modelos animales y humanos (Lukovic et al., 2015). Un modelo de iPSCs exitoso puede confirmar la causa genética de la enfermedad,

recapitular el fenotipo de la misma, aclarar los mecanismos celulares de la enfermedad, realizar un cribado de reactivos terapéuticos y diseñar terapias combinadas de células y genes (Doss & Sachinidis, 2019).

La mayoría de los modelos de iPSCs de EDR normalmente se han desarrollado utilizando un enfoque bidimensional mediante la diferenciación de las iPSCs hacia EPR o fotorreceptores en función del tipo celular afectado por el gen causante de la enfermedad. Un ejemplo que involucró la generación de organoides 3D fue el que realizaron Deng y col (2018) para el estudio de iPSCs de pacientes con mutaciones en el gen regulador de GTPasa de retinosis pigmentaria (*RPGR*, del inglés Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator) que causa una RPad afectando a la morfología y función de los cilios. Los organoides 3D de retina se generaron a partir de células epiteliales escamosas del tracto urinario de tres pacientes enfermos y tres individuos sanos que fueron reprogramadas para obtener las iPSCs y posteriormente se diferenciaron y organizaron como ocurre en la formación de la retina fetal, volviéndose electrofisiológicamente sensibles. La retina obtenida de las células de los pacientes con la enfermedad mostró diferentes alteraciones proporcionando una información significativa sobre la causa de pérdida de los fotorreceptores que presentan los pacientes (W. L. Deng et al., 2018). En ese mismo artículo, Deng y col. utilizaron el sistema CRISPR-Cas9 para corregir la mutación que provocaba la enfermedad obteniendo iPSCs corregidas. Al igual que con las iPSCs mutantes, llevaron a cabo el proceso de diferenciación de las células corregidas y mostraron que había una mejora bioquímica y fisiológica significativa de estas con respecto a las mutantes (W. L. Deng et al., 2018).

Por lo tanto, se puede decir que las iPSCs de pacientes con mutaciones específicas pueden tratarse mediante edición génica, sin embargo, existen limitaciones para el uso de este sistema CRISPR-Cas9 en el caso de enfermedades poligénicas más complejas como es el caso de la DMAE o la retinopatía diabética, ya que la enfermedad puede ser el resultado de variantes genéticas combinadas con factores ambientales y sistémicos (Ikelle et al., 2020).

#### 1.3.6.7. Células madre de pluripotencia inducida para el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las EDR son un grupo heterogéneo de enfermedades que provocan una pérdida irreversible de la visión. Aunque dichas patologías difieren fenotípicamente, todas tienen en común los tipos celulares de la retina que se ven afectados: fotorreceptores, EPR y vasos coroideos subyacentes (Dalvi et al., 2019). La terapia basada en células madre representa un nuevo enfoque terapéutico emergente mediante el cual se pueden tratar las EDR. Las células madre podrían proporcionar una fuente

ilimitada de células de reemplazo apropiadamente diferenciadas. Las terapias de reemplazo celular pueden ayudar a ralentizar el proceso degenerativo o proporcionar nuevos elementos celulares a la retina. Los trasplantes de células diferenciadas a partir de células madre pueden suministrar enzimas que falten, proporcionar factores de crecimiento y contrarrestar el proceso atrófico. Para el tratamiento de las EDR a través de terapia celular se han utilizado diferentes fuentes del material celular para los trasplantes.

Como se mencionó anteriormente, las células madre embrionarias humanas se derivan del blastocisto humano, mientras que las células madre pluripotentes inducidas humanas pueden generarse a partir de fibroblastos humanos u otros tipos de células adultas como las células sanguíneas. Ambos tipos de células se han empleado para generar y reemplazar células de la retina como fotorreceptores y EPR (Scholl et al., 2016).

Descubiertas en 1998, las hESCs se derivan de la masa celular interna de un embrión preimplantado producido por fertilización *in vitro*, lo que supone una serie de inconvenientes como el rechazo del injerto después del trasplante, lo que requeriría inmunosupresión sistémica previa al trasplante, así como razones éticas y prácticas para generar una colección grande y suficientemente diversa de líneas hESCs (Wood et al., 2019).

Por el otro lado, en 2006 con los trabajos de Yamanaka y Takahashi se descubrió una nueva fuente de células pluripotentes. Las iPSCs son una fuente de líneas de células madre autólogas o alogénicas que carecen de los condicionantes éticos de las ESCs. A día de hoy, siguen existiendo desafíos para encontrar la estrategia óptima para generar y usar iPSCs, ya que el largo proceso de reprogramación, cultivo y diferenciación celular puede conducir a la aparición de mutaciones no deseadas (Takahashi & Yamanaka, 2006; Wood et al., 2019).

Un tercer tipo de célula madre pluripotente se puede obtener mediante transferencia nuclear, técnica mediante la cual el núcleo de una célula somática adulta es trasplantado en un ovocito sin núcleo para producir una ESC genéticamente idéntica al donante nuclear. Estas células son más difíciles de generar que las iPSCs aunque tienen la capacidad de reemplazar las mitocondrias envejecidas o enfermas, por lo que puede tener aplicaciones clínicas en enfermedades mitocondriales (Wood et al., 2019).

Se están llevando a cabo numerosos ensayos clínicos con células de EPR derivadas de hESCs e iPSCs. Estos ensayos clínicos pioneros deben revelar los méritos relativos de los dos tipos de células madre para aplicaciones clínicas; no solo en términos de seguridad y eficacia, sino también en términos de eficiencia y consistencia en la generación de células de la retina.

La terapia celular de sustitución representa un nuevo enfoque terapéutico emergente mediante el cual se pueden tratar la EDR. En los últimos años se han producido importantes avances en esta dirección, siendo la terapia de sustitución del EPR la opción que está más avanzada en pacientes con DMAE (Chichagova et al., 2018; Dang et al., 2015) y en aquellas retinosis en las cuales el tipo celular primariamente afectado es el EPR (Schwartz et al., 2015). En la actualidad, para llevar a cabo el reemplazo del EPR (Figura 28) se están utilizando dos enfoques: i) inyección subretiniana de una suspensión de células de EPR y ii) trasplante de láminas de EPR (Wood et al., 2019).

Aparte de abundante información preclínica (Jin et al., 2019; Bin Lu et al., 2009; M. Zarbin, 2016), hay numerosos ensayos clínicos que están sentando las bases para el futuro de esta terapéutica. En 2015, *Astellia Pharma* (Tokio, Japón), inicialmente conocida como *Advanced Cell Technology*, realizó varios ensayos en fase I/II para evaluar inyecciones subretinianas de suspensiones celulares de EPR derivadas de ESCs humanas en pacientes con DMAE no exudativa avanzada, distrofia macular de Stargardt o degeneración macular miópica y aunque se trataba de un ensayo de seguridad, observaron una leve mejora en la visión de los pacientes tratados (Schwartz et al., 2015, 2016).

En 2018, se publicaron los resultados del primer ensayo clínico europeo que utilizó una suspensión de células del EPR derivadas de ESCs para tratar a pacientes con la enfermedad de Stargardt. En este estudio, aunque no se observaron eventos adversos graves, las mejoras en la agudeza visual no fueron significativas concluyendo que la inyección subretiniana de suspensión de células EPR aunque es segura tiene un efecto terapéutico mínimo (Mehat et al., 2018). Una de las principales razones por las que estos estudios han demostrado una baja eficacia, es el hecho de que las células de EPR inyectadas en suspensión difícilmente van a formar una monocapa que esté funcionalmente polarizada con los fotorreceptores y la membrana de Bruch. Fue este el principal motivo para pensar que una estrategia alternativa al uso de suspensiones celulares de EPR era el trasplante de láminas de células de EPR. Los estudios preclínicos han sugerido que la supervivencia y la función de las células del EPR es mejor después del trasplante de láminas del EPR (Diniz et al., 2013).

Actualmente, en Reino Unido, se encuentra en curso un ensayo clínico que utiliza membranas de poliéster. En 2018, fueron publicados los resultados de dicho ensayo clínico, en el que se realizó el trasplante de láminas de poliéster con las células EPR derivada de ESCs humanas en dos pacientes con DMAE húmeda, mostrando una mejora de la agudeza visual de los pacientes y, además, no se observaron reacciones adversas graves. (Da Cruz et al., 2018a). Por otro lado, también en 2018, Kashani y cols., implantaron una

monocapa de EPR derivada de ESCs humanas en pacientes con DMAE no exudativa, mostrando que los implantes permanecieron intactos en los ojos de los pacientes durante 180 días y además observaron una mejora en la integración de los fotorreceptores del paciente con la membrana de EPR trasplantada (Kashani et al., 2018).

También ahora, en California se encuentra en curso un ensayo de fase I/II de carácter prospectivo y de intervención aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (del inglés *U.S. Food and Drug Administration*, FDA) para evaluar la seguridad y eficacia de un implante subretiniano en pacientes con DMAE no exudativa avanzada. Se trata de una monocapa polarizada de EPR derivado de ESCs humanas sembradas sobre un sustrato de parileno ultrafino que trata de imitar a la membrana de Bruch. En el análisis intermedio que se ha llevado a cabo durante la fase I, se ha visto que ha habido integración de la membrana trasplantada con los fotorreceptores del huésped y una mejora de la agudeza visual sugiriendo dichos estudios que las estrategias de reemplazo del EPR pueden retrasar la progresión de la enfermedad o incluso restaurar la visión (Wood et al., 2019).

En 2017, el Instituto RIKEN de Japón presentó los datos del primer ensayo clínico en fase I donde se utilizaron células de EPR derivadas de iPSCs autólogas humanas (Mandai et al., 2017). Las iPSCs se generaron a partir de fibroblastos cutáneos de dos pacientes con DMAE neovascular avanzada y un año después de la cirugía se observó que la membrana trasplantada había permanecido intacta aunque no se observaron cambios en la agudeza visual. Este ensayo fue detenido debido a la identificación de mutaciones en el ADN de las iPSCs que no fueron identificadas en los fibroblastos de partida. Poco después, el ensayo fue reemplazado por un estudio que utilizó células iPSCs alogénicas (Garber, 2015). Recientemente, se han introducido cambios en el cóctel de inducción de las iPSCs y se han mejorado las estrategias de transfección episomal no integradora, lo que ha disminuido significativamente las preocupaciones sobre el potencial oncogénico de las iPSCs. Como consecuencia de estos avances, el Instituto Nacional del Ojo (del inglés *National Eye Institution*, NEI) ha comenzado ensayos clínicos de fase I/IIa en pacientes con DMAE seca para probar la seguridad y eficacia de las células EPR autólogas derivadas de iPSCs (NCT04339764, 2020) (Ikelle et al., 2020).

Hasta hace unos meses, no había ensayos clínicos de trasplante de células fotorreceptoras derivadas de células madre pluripotentes. En octubre del 2020, en el hospital de Kobe (Japón), el grupo de investigación liderado por Yasou Kurimoto, ha llevado a cabo el primer trasplante de células fotorreceptoras derivadas de iPSCs para tratar a una paciente con retinosis pigmentaria. Las células fueron cultivadas en un tejido retiniano tridimensional utilizando diversas moléculas dando lugar a los fotorreceptores que se han trasplantado



en la retina del paciente. El paciente será observado durante un año para comprobar que el organismo no rechaza las células trasplantadas y además se investigará si las nuevas células realizan conexiones con las células del huésped y transmiten información al cerebro.

Por último, hay que destacar que aunque los resultados de los ensayos clínicos que se están realizando son prometedores, debemos ser cautelosos y tener un alto grado de responsabilidad a la hora de comercializar los resultados al público, ya que hasta la fecha, la tecnología iPSCs y la producción de organoides retinianos en 3D son desarrollos importantes que se encuentran todavía en sus inicios y requieren de un refinamiento mayor. Además, el uso de terapias combinadas, como la terapia génica, la celular y los medicamentos neuroprotectores ampliará el abanico de tratamientos para estas enfermedades, aunque aún queda camino por recorrer.



## **2. Justificación y objetivos**

El descubrimiento de las células madre de pluripotencia inducida constituyen una fuente celular prometedora ya son consideradas un nuevo instrumento con gran potencial en Biomedicina debido a sus aplicaciones en ingeniería tisular y medicina regenerativa permitiendo realizar trasplantes autólogos y, además, su uso elude el conflicto ético derivado de la obtención de células madre embrionarias. En la actualidad, las terapias avanzadas han abierto la posibilidad de tratar enfermedades degenerativas de la retina que anteriormente no tenían cura. El trasplante de EPR derivado tanto de iPSCs como de ESCs ha demostrado su seguridad en varios ensayos clínicos. Sin embargo, la eficacia de los trasplantes de EPR mediante suspensión celular es menor que cuando estos trasplantes se realizan sobre membrana que garantizan la polaridad del EPR.

Por otra parte, las iPSCs nos permiten el estudio de enfermedades humanas en una placa de cultivo y su uso como una plataforma para profundizar en su estudio, así como para descubrir nuevos compuestos y dianas terapéuticas. Sin embargo, en el caso de enfermedades hereditarias como la retinosis pigmentaria, el trasplante de células autólogas podría ser ineficaz ya que las células a trasplantar tienen la mutación original, es por ello, que el descubrimiento de herramientas de edición génica como CRISPR-Cas9, ha supuesto otro gran avance en Biomedicina y ha abierto la puerta para llevar a cabo trasplantes autólogos de células previamente tratadas a las que se le ha corregido la mutación causante de la enfermedad.

Por esta razón, los objetivos llevados a cabo en la realización de este trabajo de investigación han sido:

## Objetivo 1.

### **1. Generar líneas de iPSCs de pacientes con DMAE y de individuos sanos para su diferenciación en células de EPR, con las cuales realizar trasplantes o insertos en animales de experimentación.**

- 1.1. Generar líneas de iPSC a partir de muestras de sangre de pacientes con la enfermedad e individuos sanos.
- 1.2. Caracterizar morfológica, fenotípica y molecularmente las células madre de pluripotencia inducida obtenidas.
- 1.3. Evaluar los polimorfismos que presentan las células obtenidas a partir de los pacientes con la enfermedad.

- 1.4. Diferenciar las iPSCs de individuos sanos y pacientes hacia células de EPR.
- 1.5. Trasplantar células de EPR derivadas de iPSCs de individuos sanos y pacientes en ratones *Nrf2*<sup>-/-</sup>.
- 1.6. Evaluar los ratones tratados.
- 1.7. Cultivar las células EPR derivadas de iPSCs de un individuo sano sobre membrana de fibrina-agarosa.
- 1.8. Evaluar morfológica y funcionalmente las células de EPR obtenidas.
- 1.9. Trasplantar la membrana de EPR-fibrina-agarosa en animales de experimentación.
- 1.10. Evaluar la seguridad del trasplante realizado en los animales tratados.

## Objetivo 2.

### **2. Generar líneas de iPSCs de un individuo sano y paciente con RP causada por una mutación en el gen *EYS*, realizar la corrección génica de la mutación mediante CRISPR-Cas9 y diferenciar hacia células de EPR.**

- 2.1. Generar líneas de iPSCs a partir de muestras de sangre de pacientes con la enfermedad e individuo sano.
- 2.2. Caracterizar morfológica, fenotípica y molecularmente las células madre de pluripotencia inducida generadas.
- 2.3. Corregir la mutación de las iPSCs del paciente con RP utilizando CRISPR-Cas9 como herramienta de edición génica.
- 2.4. Diferenciación de iPSCs de individuo sano, paciente con la mutación y corregidas hacia células de EPR.
- 2.5. Evaluar el fenotipo de la enfermedad mediante estudios morfológicos y funcionales.



## **3. Métodos y resultados**

### **3.1. Artículo 2.**

Generation of a human iPS cell line (CABi003-A) from a patient with age-related macular degeneration carrying the *CFH Y402H* polymorphism.

**Ana B Garcia-Delgado**, Sofia M Calado, Lourdes M Valdes-Sanchez, Adoracion Montero-Sanchez, Beatriz Ponte-Zuñiga, Berta de la Cerda, Shom Shanker Bhattacharya, Francisco J Diaz-Corrales.

Stem Cell Research 2019 Jul;38:101473. doi:10.1016/j.scr.2019.101473. Epub 2019 May 29.





Contents lists available at ScienceDirect

Stem Cell Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scr](http://www.elsevier.com/locate/scr)

Lab resource: Stem Cell Line

## Generation of a human iPS cell line (CABi003-A) from a patient with age-related macular degeneration carrying the CFH Y402H polymorphism



Ana B. Garcia-Delgado<sup>a</sup>, Sofia M. Calado<sup>a</sup>, Lourdes M. Valdes-Sanchez<sup>a</sup>, Adoracion Montero-Sanchez<sup>a</sup>, Beatriz Ponte-Zuñiga<sup>b,c</sup>, Berta de la Cerda<sup>a</sup>, Shom Shanker Bhattacharya<sup>a</sup>, Francisco J. Diaz-Corrales<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Regeneration and Cell Therapy, Andalusian Molecular Biology and Regenerative Medicine Centre-CABIMER (Junta de Andalucía, CSIC, Universidad de Sevilla, Universidad Pablo de Olavide), Seville, Spain

<sup>b</sup> Macarena University Hospital, Department of Ophthalmology, Seville, Spain

<sup>c</sup> RETICS Oftared, Carlos III Institute of Health (Spain), Ministry of Health RD16/0008/0010, Seville, Spain

### ABSTRACT

Age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of adult blindness in developed countries and is characterized by progressive degeneration of the macula, the central region of the retina. A human induced pluripotent stem cell (hiPSC) line was derived from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from a patient with a clinical diagnosis of dry AMD carrying the *CFH* Y402H polymorphism. Sendai virus was used for reprogramming and the pluripotent and differentiation capacity of the cells were assessed by immunocytochemistry and RT-PCR.

### Resource table

Unique stem cell line identifier	CABi003-A
Alternative name(s) of stem cell line	OF 163/DH05-C16
Institution	Andalusian Molecular Biology and Regenerative Medicine Centre (CABIMER), Seville, Spain.
Contact information of distributor	Francisco Diaz-Corrales; <a href="mailto:francisco.diaz@cabimer.es">francisco.diaz@cabimer.es</a>
Type of cell line	Induced pluripotent stem cell
Origin	Human
Additional origin info	Age: 81 Sex: Female Ethnicity: Caucasian
Cell Source	Peripheral blood mononuclear cells
Clonality	Clonal
Method of reprogramming	Sendai viral reprogramming
Genetic modification	Yes
Type of modification	Hereditary
Associated disease	Age-related macular degeneration
Gene/locus	<i>CFH</i> /p.Y402H polymorphism (rs1061170)
Method of modification	N/A
Name of transgene or resistance	N/A
Inducible/constitutive system	N/A

Date archived/stock date	2018/11/30
Cell line repository/bank	<a href="https://hpscereg.eu/user/cellline/edit/CABi003-A">https://hpscereg.eu/user/cellline/edit/CABi003-A</a>
Ethical approval	Cellular Reprogramming Board of Andalusia. Ethical Approval number: PR-01-2015

### 1. Resource utility

hiPSCs from AMD patients allow us the generation of a cellular model to better understand the pathophysiology of the disease and to test new therapeutic strategies.

### 2. Resource details

PBMCs were collected from 4 mL of peripheral blood sample from 81-year-old woman who was diagnosed with dry AMD carrying a single-nucleotide polymorphism (SNP) in the *complement factor H* gene (*CFH*) caused by a substitution of a thymine (T) for a cytosine (C) in the position 1204 of the exon 9 (c.1204 T > C p.Y402H), this is the most frequent SNP linked to the risk of developing AMD (Toomey et al., 2018). The human reprogramming factors *OCT3/4*, *c-MYC*, *KLF4*, and *SOX2* (Takahashi et al., 2007) were transduced into the PBMCs via the non-integrative Sendai virus according to manufacturer's instructions. After 21–27 days, we obtained the hiPSC line DH05-C16 (registered as

\* Corresponding author at: Andalusian Molecular Biology and Regenerative Medicine Centre, Avda. Americo Vesputio N°24 Edif. CABIMER, Parque Científico y Tecnológico Cartuja, 41092 Sevilla, Spain.

E-mail address: [francisco.diaz@cabimer.es](mailto:francisco.diaz@cabimer.es) (F.J. Diaz-Corrales).

<https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101473>

Received 25 April 2019; Received in revised form 21 May 2019; Accepted 28 May 2019

Available online 29 May 2019

1873-5061/ © 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

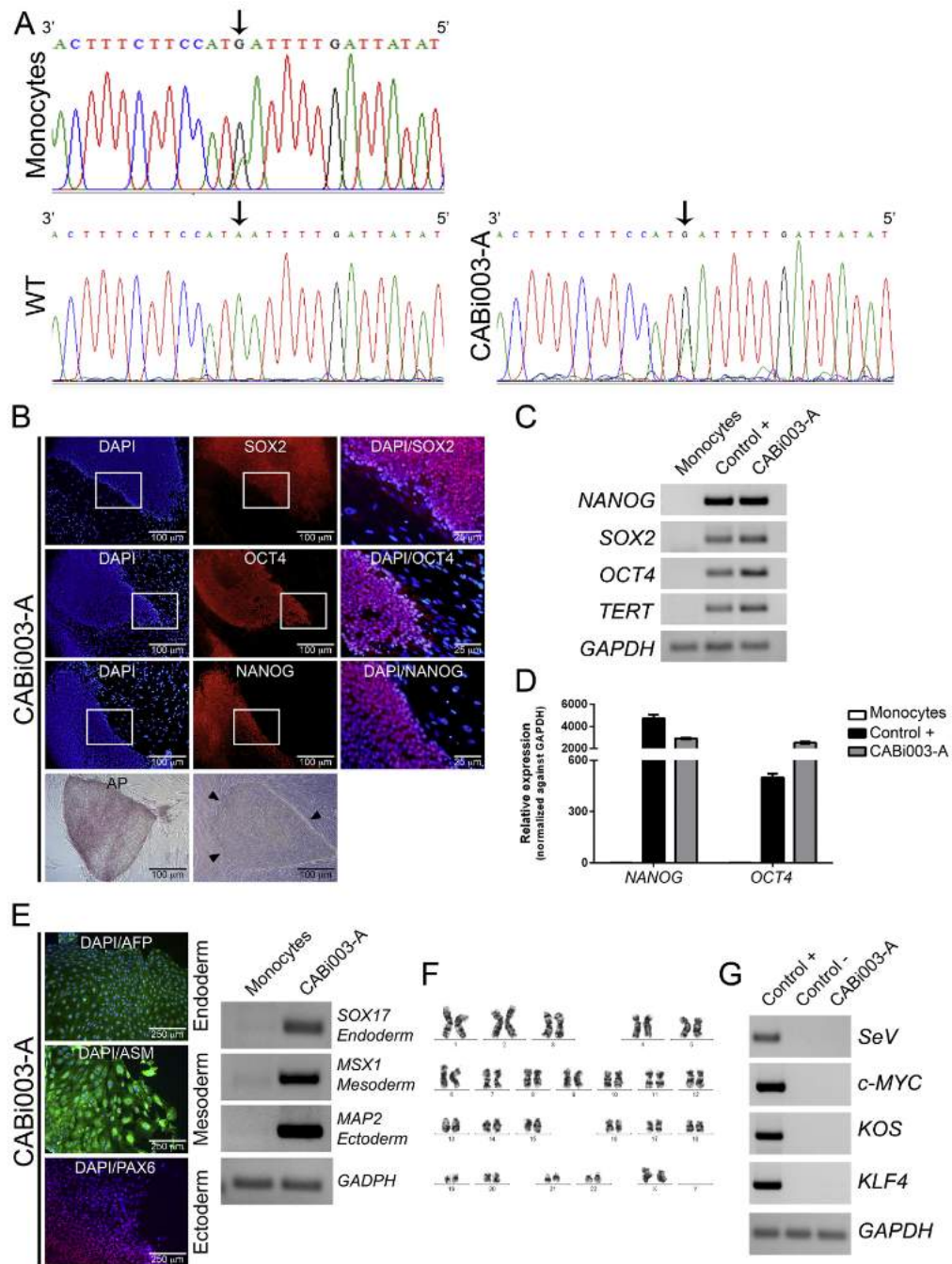


Fig. 1. iPSC characterization.

CABI003-A at [www.hPSCreg.com](http://www.hPSCreg.com)). To genotype the patient's PBMCs (Monocytes) and the CABI003-A cell line, we performed DNA sequencing to confirm the presence of the *CFH* polymorphism (C;T) compared to a wild-type hiPSC line (T;T), the reverse and complement sequences

are shown in Fig. 1A. At 27 days, hiPSC showed a typical stem-like growth and morphological features, including high nuclear/cytoplasmic ratio, refractive edges and polygonal shape (Fig. 1B; arrowheads). To evaluate the pluripotency state of CABI003-A cell line,



alkaline phosphatase (Fig. 1B; AP) test and immunostaining for pluripotency markers were performed (Fig. 1B). Qualitative assessment of a panel of pluripotency markers was analyzed by RT-PCR, RNA samples of the PBMCs (Monocytes) were used as negative control and RNA samples of a previously characterized wild-type hiPSC line was used as positive control (Fig. 1C). The expression level of endogenous pluripotency markers *NANOG* and *OCT4* was also quantified by qPCR relative to the PBMCs (Fig. 1D). Moreover, pluripotency was tested by the ability of CABi003-A to generate the three germ layers in vitro: endoderm, mesoderm and ectoderm, as confirmed by immunofluorescent staining of  $\alpha$ -fetoprotein (AFP), actin-smooth muscle (ASM) and PAX-6, respectively (Fig. 1E, left) and RT-PCR (Fig. 1E, right). Our results on the karyotype analysis showed that the CABi003-A cell line exhibited a normal and diploid (46, XX) chromosomal content (Fig. 1F) and the genetic fingerprinting proved the genetic identity to parental mononuclear blood cells. After eight cell culture passages, the clearance of Sendai viral vector was checked by absence of gene expression corresponding to the viral capsid (SeV) and the ectopic reprogramming factors (*c-MYC*, *KOS*, *KLF4*) compared to iPSCs in passage 1, which was used as positive control for viral expression, RNA samples of the PBMCs (Monocytes) were used as negative control (Fig. 1G). Characterization is summarized in Table 1. Mycoplasma test was negative (Supplementary Table 1).

3. Materials and methods

3.1. PBMCs primary culture

Ficoll-Plaque was used to isolate PBMCs from 4 mL of peripheral blood using Vacutainer® CPT™ tubes (BD Biosciences) and cultured for one week in Expansion Medium (EM; QBSF-60 medium (Quality Biological); 50 µg/mL ascorbic acid (Sigma-Aldrich), 1% Pen/Strep (Gibco), 50 ng/mL SCF (StemCell Technologies), 10 ng/mL IL-3 (StemCell Technologies), 2 U/mL EPO (StemCell Technologies), 40 ng/mL IGF-1 (StemCell Technologies) and 1 µM Dexamethasone (Sigma-Aldrich).

3.2. Reprogramming PBMCs to iPSC

PBMCs were transduced with CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Thermo Fisher Scientific). Briefly,  $0.25 \times 10^5$  cells were transduced using MOI of 5–5-3 (hKOS, hc-MYC, hKLF4, respectively). After 24 h of incubation cells were collected, centrifuged and seeded in a 24 well plate containing EM. Two days later  $0.1 \times 10^5$  cells were transferred onto a 6 well plated covered with  $0.25 \times 10^6$  irradiated human foetal foreskin fibroblasts (ATCC CRL2429) in QBSF-60

medium (Quality Biological), supplemented with 50 µg/mL ascorbic acid (Sigma-Aldrich) and 1% Pen/Strep (Gibco). Seven days post-transduction, culture medium was replaced by iPS medium (KO DMEM (Gibco), 20% KO serum (Gibco), 1% GlutaMAX (Gibco), 1% MEM NEAA (Gibco), 0.23 mM β-mercaptoethanol (Gibco), 1% Pen/Strep (Gibco), 10 ng/mL bFGF (Peprotech)). Individual colonies with stem-like morphology, including CABi003-A (clone 16), were manually isolated and expanded 21 to 27 days post-transduction. hiPSCs were cultured on 6 well plate coated  $0.25 \times 10^6$  irradiated human foetal foreskin fibroblasts (irHFF) and maintained in iPS medium with change of medium three-times per week. The hiPSCs were mechanically passage once a week with a 1:3 split ratio. All cell culture was performed at 37 °C in humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> and 20% O<sub>2</sub>.

3.3. SNP sequencing

Genomic DNA from hiPSCs was isolated using the QIAamp DNA Blood mini kit (Qiagen). Primers for exon 9 of *CFH* gene were used for amplification and directed sequencing was made with complement and reverse primer as described in Table 2.

3.4. Immunocytochemistry

Cells were allowed to grow in glass coverslip and washed in ice-cold PBS before fixation in 4% PFA, for 15 min. Fixed cells were washed twice in PBS and placed in blocking solution (2% donkey serum in 0.2% Triton-X 100/PBS) for 1 h at room temperature. Cells were incubated for 1 h at room temperature with the primary antibody in blocking solution. After incubation, samples were washed 3 times in 0.2% Triton-X100/PBS, and incubated with the secondary antibodies in blocking solution at room temperature for 1 h. After 3 washes, coverslips were mounted with Vestashield mounting medium (Vector H-1200) containing 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Imaging was performed in a fluorescence microscope Leica DM6000 B. Antibodies are listed in Table 2.

3.5. RT-PCR and qPCR for detection of viral clearance and pluripotency markers

Total RNA was isolated from cultured hiPSC cells with Rneasy Mini Kit (Qiagen) and treated with DnaseI (Qiagen) to removed genomic DNA contamination. 1 µg of total RNA was used as template to obtain cDNA, using QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Viral clearance and pluripotency markers detection were analyzed using the primers described in Table 2. RT-PCR reaction was performed using MyTaq DNA Polymerase (Bioline GmbH) using Veriti™ 96-Well Thermal

Table 1  
Characterization and validation.

Classification	Test	Result	Data
Morphology	Photography	Visual record of the line: Normal	Fig. 1 panel B
Phenotype	Qualitative analysis: immunocytochemistry* and RT-PCR	Positive for: Oct4, Nanog, SOX2. RT-PCR: NANOG, SOX2, TERT, OCT4	Fig. 1 panel B and C
	Quantitative analysis: qPCR	Positive for: Nanog and OCT4	Fig. 1 panel D
Genotype	Karyotype (G-banding) and resolution	46 XX, Band resolution: 400–550	Fig. 1 panel F
Identity	Microsatellite PCR (mPCR) OR STR analysis	Not performed	N/A
	Sequencing	10 loci analyzed: all matched with patient's monocytes	Available with the authors.
Mutation analysis (If Applicable)	Southern Blot OR WGS	Heterozygous mutation <i>CFH</i> exon 9 c.1204 T > C	Fig. 1 panel A
	Mycoplasma	N/A	N/A
Microbiology and virology	Embryoid body formation	Mycoplasma testing by luminescence: Negative	Supplementary Table 1
Differentiation potential		Immunocytochemistry of AFP (endoderm), ASM (mesoderm) and PAX6 (ectoderm). RT-PCR of SOX17 (endoderm), MSX1 (mesoderm) and MAP2 (ectoderm).	Fig. 1 panel E
Donor screening (Optional)	HIV 1 + 2 Hepatitis B, Hepatitis C	N/A	N/A
Genotype additional info (Optional)	Blood group genotyping	N/A	N/A
	HLA tissue typing	N/A	N/A

**Table 2**  
Reagents details.

Antibodies used for immunocytochemistry/flow-citometry			
	Antibody	Dilution	Company Cat # and RRID
Pluripotency markers	Rabbit anti-OCT4	1:400	Cell Signaling Technology Cat# 2840, RRID:AB_2167691
	Rabbit anti-NANOG	1:400	Cell Signaling Technology Cat# 4903, RRID:AB_10559205
	Rabbit anti-SOX2	1:400	Cell Signaling Technology Cat# 3579, RRID:AB_2195767
Differentiation markers	Rabbit anti- PAX6	1:100	BioLegend, Cat# PRB-278P RRID:AB_2749901
	Mouse anti-ASM	1:300	Sigma-Aldrich Cat# A5228, RRID:AB_262054
	Mouse anti-AFP	1:20	Sigma-Aldrich Cat# A5228, RRID:AB_262054
Secondary antibodies	Donkey anti-Mouse 488	1:500	Molecular Probes Cat# A-21202, RRID:AB_141607
	Donkey anti-Rabbit 594	1:500	Molecular Probes Cat# A-21207, RRID:AB_141637
Primers			
	Target size (bp)	Forward/Reverse primer (5'-3')	
Episomal Plasmids (RT-PCR)	SeV plasmid/181 bp	GGATCACIAGGTGATATCGAGC/ACCGAGACAAGAGTTAAGAGAIATGIATC	
Episomal Plasmids (RT-PCR)	KOS plasmid/528 bp	ATGCACCGTACGACGTGAGCGG/ACCTTGACAATCCTGATGTGG	
Episomal Plasmids (RT-PCR)	KLF4 plasmid/410 bp	TTCTTCGATGCCAGAGGAGCC/AAATGATGGAAGGTGCTCAA	
Episomal Plasmids (RT-PCR)	c-MYC plasmid/532 bp	TAACTGACTAGCAGGCTTGTTCG/TCCACATACAGCTCTGGATGATGATG	
Pluripotency Markers (RT-PCR)	NANOG/260 bp	CCAAATTCCTCTGCCAGTGAC/CACGTGGTTTCCAAACAAGAAA	
Pluripotency Markers (RT-PCR)	OCT4/165 bp	AAGCCCTCATTTCACCAGG/CTTGAAGCTTAGCCAGGTC	
Pluripotency Markers (RT-PCR)	SOX2/181 bp	TCACATGTCCAGCACTACC/CCCATTTCCCTCGTTTTTCT	
Pluripotency Markers (RT-PCR)	TERT/259 bp	CGCTTGTGGATGATTCT/GGCATAGCTGGAGTAGTCCG	
Differentiation Potential (RT-PCR)	MAP2/225 bp	GCACGGCTGAGCTGCATC/TCTCCACCACCCCGTACGCA	
Differentiation Potential (RT-PCR)	MSX1/350 bp	CGAGAGGACCCGTTGGATGCAGAG/GGGGCCATCTTCAGCTTCCAG	
Differentiation Potential (RT-PCR)	SOX17/182 bp	CGCTTTCATGGTGGGTAAGGACG/TAGTTGGGGTGGCTGCGATGTGCTG	
House-Keeping Genes (RT-PCR)	GAPDH/86 bp	TGACCACCAACTGCTTAGC/GGCATGGACTGTGGTTCATGAG	
Genotyping	CFII exon 9/126 bp	GAAATGTTATTTTCCTTATTGGAAAAATGG/GACACGGATGCATCTGGGA	

Cycler 9902 (Applied Biosystems) with the program: 35 cycles of 94 °C for 15 s, 58 °C for 45 s and 72 °C for 45 s (for GAPDH, 30 cycles). PCR products were analyzed on 2% agarose gels (Pronadisa). For qPCR a CFX96 Realtime PCR detection system (BioRad) was used with a program: 95 °C for 1 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Triplicate reactions were prepared with TaqMan Gene expression Master Mix and TaqMan probes: NANOG (Hs02387400g1), OCT4 (Hs01654807s1) and GAPDH (Hs02786624g1), all for Applied Biosystems.

### 3.6. Three lineage differentiation

In vitro differentiation was performed by embryoid body (EB) formation to generate the three germ layers (endoderm, mesoderm and ectoderm). The hiPSCs were separated manually from feeder cells and cultured in non-adherent conditions in iPS medium without bFGF for the following 7 days. Then, the EBs were seeded on glass coverslips and plates treated with 0.1% gelatin for 2 h/RT and cultured between 7 and 9 days with EBs medium (DMEM/F12 (Thermo Scientific), 10% FBS (Gibco), 1% GlutaMAX (Gibco), 1% MEM NEAA (Gibco) and 1% Pen/Strep (Gibco)). The EBs were analyzed by immunofluorescence and RT-PCR.

### 3.7. Karyotype analysis

Metaphase arrest was performed as usually and 30 metaphase were counted and genome integrity of the hiPS cells was analyzed by G-banding at 400–550 band resolution in Biobanco de Sistema Sanitario Publico, Granada, Spain.

### 3.8. Fingerprinting

Genomic DNA from PBMCs and hiPS cells were extracted using

QIAamp DNA Blood mini kit (Qiagen). STR analysis was performed by Biobanco de Sistema Sanitario Publico, Granada, Spain using the GenePrint 10 System (Promega) to check STRs for AMEL, CSF1PO, D13S317, D16S539, D21S11, D5S818, D7S820, TH01, TPOX and vWA.

### 3.9. Mycoplasma detection

The presence of mycoplasma was tested regularly by luminescence using the MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit (Lonza) (Supplementary Table 1).

### Funding

This work was supported by ISCIII, Spain (Miguel Servet-I, 2015) and cofinanced by European Regional Development Fund (ERDF) (CP 15/00071).

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101473>.

### References

- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>.
- Toomey, C.B., Johnson, L.V., Bowes Rickman, C., 2018. Complement factor H in AMD: bridging genetic associations and pathobiology. *Prog. Retin. Eye Res.* 62, 38–57. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.09.001>.

### 3.1.1. Información adicional del artículo 2.

Supplementary Table 1

<b>MycoAlert Plus™ (04/02/2019)</b>	
<b>Sample</b>	<b>Read B/Read A</b>
C+	39,59
C-	0,06
CABi003-A	0,26

The manufacturer considers a negative value for mycoclasma contamination when Read B/Read A is less than 1.

**3.1.2. Anexo Artículo 2 (datos no publicados).**

### **3.2. Artículo 3.**

Subretinal transplant of induced pluripotent stem cell–derived retinal pigment epithelium on nanostructured fibrin–agarose.

**Ana B Garcia-Delgado\***, Berta de la Cerda\*, Julia Alba-Amador, Lourdes M Valdes-Sanchez, Beatriz Fernandez-Muñoz, Isabel Relimpio-Lopez, Enrique Rodriguez de la Rúa, Andrea Diez-Lloret, Sofia M Calado, Rosario Sanchez-Pernaute, Shom S Bhattacharya, Francisco J Diaz-Corrales.

\* equal contribution author

Tissue Eng Part A. 2019 May;25(9-10):799-808. doi:  
10.1089/ten.TEA.2019.007.



**ENGINEERED TISSUES DERIVED FROM INDUCED-PLURIPOTENT STEM CELLS (IPSCs) FOR DISEASE MODELING, DRUG DISCOVERY, AND REPLACEMENT THERAPIES\***

## Subretinal Transplant of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium on Nanostructured Fibrin-Agarose

Ana B. García Delgado, MSc,<sup>1,\*\*</sup> Berta de la Cerda, PhD,<sup>1,\*\*</sup> Julia Alba Amador, MSc,<sup>2</sup> Maria Lourdes Valdés Sánchez, PhD,<sup>1</sup> Beatriz Fernández-Muñoz, PhD,<sup>2</sup> Isabel Relimpio López, PhD,<sup>3,4</sup> Enrique Rodríguez de la Rúa, PhD,<sup>3,4</sup> Andrea Díez Lloret, PhD,<sup>1</sup> Sofía M. Calado, PhD,<sup>1</sup> Rosario Sánchez Pernaute, PhD,<sup>2</sup> Shom S. Bhattacharya, PhD,<sup>1</sup> and Francisco J. Díaz Corrales, PhD<sup>1</sup>

Damage to the retinal pigment epithelium (RPE) in age-related macular degeneration and other diseases results in photoreceptor cell death and blindness. Replacement of RPE is therefore being explored as a therapy for several retinal diseases. To move toward a future personalized autologous transplant approach, we have prepared a biocompatible implant using RPE derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs) reprogrammed from a healthy donor's monocytes. The correct positioning of the polarized RPE is essential to fulfill its role and protect photoreceptors from degeneration. Hence, we have used a biocompatible hydrogel matrix of fibrin and agarose that allows the surgical placement of an RPE sheet in the subretinal space, keeping its functional orientation. Our aim was to demonstrate safety and viability of the transplant in preclinical models. Pigs were used to test the feasibility of a regular vitreoretinal surgery. Our results show that this implant is suitable for subretinal transplantation allowing human RPE cells to survive and maintain their phenotype and orientation without any local or systemic adverse events. The ability to transplant the iPSC-derived RPE sheet in its natural orientation will surely increase the chance to obtain a therapeutic effect in future translational studies.

**Keywords:** macular degeneration, retinal pigment epithelium, induced pluripotent stem cells, subretinal implant, fibrin-agarose hydrogel

### Impact Statement

In the promising field of cellular therapy for retinal degenerative diseases, a new biomaterial is proposed as a scaffold to grow and surgically introduce a monolayer of retinal pigment epithelial cells into the subretinal space, keeping the orientation of the cells for a proper functional integration of the transplant. The use of induced pluripotent stem cells as the starting material for retinal pigment epithelial cells is intended to advance toward a personalized medicine approach.

### Introduction

**A**GE-RELATED MACULAR DEGENERATION (AMD) and other degenerative diseases of the retina, such as Stargardt disease, affect primarily the retinal pigment epithelium (RPE) layer of the retina. Being the monolayer of RPE cells essential for the correct function and survival of the photoreceptor cells, the natural course of any dysfunction or

degenerative process of the RPE is the subsequent death of photoreceptor cells leading to blindness.<sup>1</sup> Currently, there is no treatment to prevent, delay, or restore the damaged RPE; therefore, cellular replacement therapies appear as an attractive alternative for the treatment of these diseases.<sup>2</sup>

The RPE cell layer is a highly polarized monostratified epithelium with specialized apical microvilli that interact with the photoreceptor cells and basolateral tight junctions

<sup>1</sup>Regeneration and Cell Therapy Department, Andalusian Center for Molecular Biology and Regenerative Medicine (CABIMER), Sevilla, Spain.

<sup>2</sup>Unidad de Producción y Reprogramación Celular, Iniciativa Andaluza en Terapias Avanzadas, Sevilla, Spain.

<sup>3</sup>University Hospital Virgen Macarena, Sevilla, Spain.

<sup>4</sup>RETICS Oftared, Carlos III Institute of Health (Spain), Ministry of Health RD16/0008/0010, Sevilla, Spain.

\*\*Both authors contributed equally to this work.

\*This article is part of a special issue, Engineered Tissues Derived from Induced-Pluripotent Stem Cells (iPSCs) for Disease Modeling, Drug Discovery, and Replacement Therapies.



participating in the blood–ocular barrier. The RPE cells lay on the Bruch's membrane, limiting with the choroidal vasculature,<sup>3</sup> so the neuroretina communication with the systemic circulation, including exchange of nutrients and waste, depends on the correct, polarized functioning of this epithelium.

*In vitro* cellular differentiation toward RPE has been achieved from both embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs).<sup>4</sup> Subretinal injection of a suspension of *in vitro* differentiated RPE cells<sup>5,6</sup> has been reported to be safe although with very limited therapeutic effect. Indeed, it is difficult that a suspension of RPE cells forms a functional polarized monolayer between photoreceptors and the Bruch's membrane.<sup>7</sup> Moreover, considering the degenerative changes found in the Bruch's membrane in advanced AMD cases, which will affect cell adhesion to its surface,<sup>8</sup> an alternative is the use of sheets of RPE cells that can be properly positioned in the subretinal space. In a recent report,<sup>9</sup> ESC-RPE were grown onto a synthetic membrane covered with vitronectin. After extensive safety and feasibility testing, as well as optimization of the surgical technique, a clinical trial started with two severe cases of wet AMD. The main results of the study are the correct surgical placement of the implant in one eye of each patient, the survival of the graft for 12 months, and more importantly, the evidence of therapeutic benefit in the 12-month evaluation, as visual acuity gain.

To our knowledge, only a one-patient clinical study has been performed using iPSC-derived RPE (iPSC-RPE).<sup>10</sup> In this case report, the iPSCs were derived from skin fibroblasts of a patient with advanced wet AMD. An RPE sheet of cells was generated and implanted in the subretinal space with the only support of the basal membrane secreted by the cells. No immunosuppression was used. Tomography showed good retinal integrity in the implant area after a year, but no visual gain was reported, possibly due to the very advanced AMD disease. Nevertheless, there was a stabilization of the disease, so the patient did not require anti-vascular endothelial growth factor (i.e., the standard treatment for the wet form of AMD) after the intervention. Regarding safety, no rejection and no local or systemic adverse events were reported in the evaluations at 12 and 25 months.

The ultimate goal of our research is to generate a suitable implant for the treatment of AMD composed of a sheet of cells attached to a scaffold. The ideal substrate should support the growth of a sheet of fully differentiated and functional epithelial cells, facilitating not only the handling and positioning during surgery but also the engraftment of the cells in the adverse environment of a damaged Bruch's membrane.<sup>7</sup>

Moreover, considering that AMD patients are usually elderly people who may not respond well to sustained immunosuppression,<sup>11</sup> the chosen biological cell material was iPSC-RPE to investigate feasibility of an autologous implant. In this study, we report the characterization of our candidate implant, composed of iPSC-RPE grown onto a hydrogel matrix composed of fibrin and agarose and the preclinical data on safety and viability of the transplant in mouse and pig models. A biocompatible nanostructured (NS) fibrin-agarose hydrogel (FAH) was the selected material to support the RPE because of its optimal performance in different preclinical and clinical applications: FAH has been successfully used without cells as a hemostatic patch in hepatic surgery<sup>12</sup> and with different cell types as a substitute

for cornea,<sup>13</sup> skin,<sup>14</sup> oral mucosa,<sup>15</sup> and peripheral nerves.<sup>16</sup> This scaffold has been proved to be safe and biodegradable in different animal models<sup>14,17–19</sup>; shows good surgical handling properties and is being currently tested in a clinical trial for patients with corneal trophic ulcers.<sup>20</sup>

## Materials and Methods

The iPSC generation and characterization has been previously described.<sup>21</sup> Differentiation to RPE and characterization has been described by Lukovic *et al.*<sup>22</sup> Funduscopy and electroretinogram (ERG) were performed as described by Valdés-Sánchez *et al.*<sup>23</sup> Details are provided in Supplementary Methods. The list of antibodies and primers used for characterization are provided in Supplementary Tables S1 and S2, respectively.

### Generation of the FAH scaffold for the RPE

The protocol for the NS-FAH production was adapted from methods described previously.<sup>13,14</sup> FAH scaffolds were generated using 12-mm Transwell® porous inserts (Corning; Corning, Inc., Corning, NY). To prepare a volume of 10 mL of FAH, 8.33 mL of human AB plasma (Tebu-bio, Le-Perray-en-Yvelines, France), 0.166 mL of tranexamic acid (Amchafibrin 500 mg; Rottapharm, Milan, Italy), and 0.666 mL of culture medium were added into a 15 mL conical tube. To induce gelation, a solution containing 0.2 mL of 10% calcium chloride (B. Braun, Melsungen, Germany), 0.133 mL of phosphate-buffered saline, and 0.5 mL of 2.2% type VII agarose (Sigma-Aldrich) was added. After mixing, 0.25 mL of the resulting mixture was added to each insert, and the plate was left at 37°C for 2 h. Once gelation was completed, cells were seeded on the hydrogel, either before (protocol 1) or after (protocol 2) NS, and were maintained in culture for 4 weeks before final processing.

NS is a process of dehydration by mechanical compression that preserves the fibrin matrix while removing most of the water content (80% dehydration). As a consequence, the biomechanical properties of FAH are changed with increasing elasticity and mechanical strength.<sup>24,25</sup> For NS, hydrogels were placed between two 10- $\mu$ m nylon net filters (Merck Millipore, Burlington, MA) and compressed by extra thick western blotting filter paper (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) under a flat glass surface of 77.6 g during 40 s. At the end of the culture stage, hydrogels were carefully detached from inserts leaving the nylon porous membrane at the bottom to identify the side containing the epithelium and maintained in Ringer's lactate solution (Grifols, Barcelona, Spain) until implantation.

To assess viability, we used the LIVE/DEAD® viability/cytotoxicity Kit (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's instructions. Viable and dead cells were counted in at least five fields using ImageJ® software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Finally, the RPE-FAH construct was cut to the size needed for transplantation.

The FAH preparation and NS were performed in a good manufacturing practice facility.

### Animal handling

All animal manipulations have been performed in compliance with the Spanish and European Union laws on animal

care in experimentation, and methods have been approved by the Committee of Ethics in Animal Experimentation of CABIMER, Seville, Spain (CEEA-CABIMER).

#### Surgical procedure

**Mouse surgery.** A 32-gauge needle was used to gently open the choroid 1 mm posterior to the sclerocorneal limbus. Incision length was extended to about 3 mm with a microsurgical scissor and the RPE was carefully dissected. Subsequently, 1 mm<sup>2</sup> of the iPSC-RPE-FAH was introduced with microsurgery forceps.

**Pig surgery.** Three-port pars plana vitrectomy with 23-gauge (Stellaris; Bausch Lomb) was followed by the creation of a complete posterior vitreous detachment and total vitrectomy. A 41-gauge injection cannula was used to infuse a balanced salt solution into the subretinal space to develop a retinal detachment. The vitreous body was filled with perfluorooctane to reattach the retina and a fluid air-exchange followed by an air/silicone oil exchange at the end of the surgery to maintain the retina attached. Images of the surgical room and equipment used are provided in Supplementary Figure S1.

## Results

### iPSC-RPE generated from blood sample

A primary cell culture of mononucleated cells (peripheral blood mononuclear cells) was established after selection using the Ficoll-Paque method from a peripheral blood sample from a healthy 25-year-old male donor. A nonintegrative Sendai virus was used to transfect the reprogramming factors *hOCT3/4*, *hSOX2*, *hc-MYC*, and *hKLF4*.<sup>26</sup> Afterward, isolation of iPSC colonies, propagation, and a complete characterization were performed (Fig. 1). Endogenous pluripotency markers were evaluated by immunofluorescence staining, showing nuclear localization of OCT4, NANOG, and SOX2, stained in red; and membrane localization of SSEA3 and TRA1-81, stained in red; and SSEA4 stained in green (Fig. 1a). Clearing of the virus after passage 8 was verified by absence of expression of ectopic reprogramming factors (*c-MYC*, *KOS*, and *KLF-4*) and viral capsid gene *SeV* relative to passage 1-iPSCs (Fig. 1b). The iPSC colonies were positive for alkaline phosphatase activity (Fig. 1c) and had a normal male karyotype (Fig. 1d).

In addition, pluripotency was demonstrated by the ability to generate derivatives of the three embryonic layers *in vitro* by generation of embryoid bodies, in which expression of markers of endoderm (FOXA2 and AFP), mesoderm (desmin and SMA), and ectoderm (PAX6 and TUJ1) was demonstrated (Fig. 1e).

RPE was obtained following an established standard methodology<sup>27</sup> as described in Supplementary Methods. In brief, embryoid bodies spontaneously developed pigmented areas when cultured without basic fibroblast growth factor and reduced serum. The RPE from the pigmented areas was enriched to purity in two sequential passages and grown as a monolayered epithelium.

### Preparation of iPSC-RPE-FAH construct

The procedure to prepare the implant with RPE cells attached to the FAH scaffold is summarized in Figure 2a. Two protocols for iPSC-RPE-FAH production were evaluated: (1)

FAH gelation and NS before seeding the RPE cells that are then kept for 4 weeks on the NS-FAH and (2) RPE seeding after FAH gelation, 4 weeks of maturation on the FAH and final NS. Cellular viability was always evaluated at the end of the production protocol, after 4 weeks of RPE maturation on the scaffold. Many dead cells were found when grown on the NS-FAH (protocol 1), while cell viability was not affected by the actual NS procedure (protocol 2, Fig. 2a). In addition, the laminar structure was better preserved and the cells were more homogeneously distributed through the scaffold when NS was performed at the end of the maturation process. Therefore, for implantation, we performed NS at the end of the culture stage, ~1–2 h before the surgery.

The RPE cells seeded onto the scaffold were pigmented before seeding (Fig. 2b) and kept their pigmentation after 4 weeks of growth on the matrix (Fig. 2c). An image of the final aspect of the iPSC-RPE NS-FAH implant used for the surgery is shown in Figure 2d.

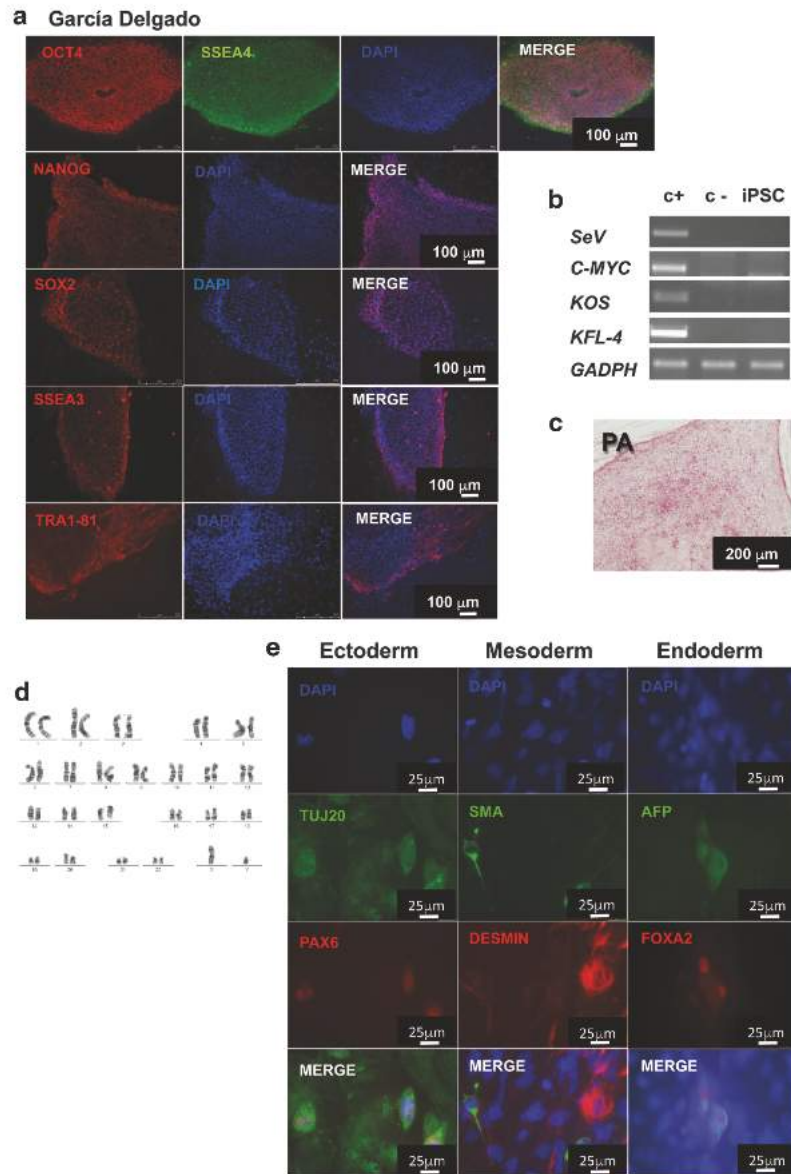
### iPSC-RPE grown onto FAH keeps its specific features

The RPE cells are usually cultured *in vitro* on plates coated with Matrigel or other attaching substrates. We had to test whether the iPSC-RPE cells were able to grow onto the FAH matrix, attaching properly and keeping all the RPE typical characteristics. The RPE is morphologically a monolayered epithelium of polygonal-shaped cells, in which specific proteins such as BEST1 and the tight junction marker ZO-1 localize to the basolateral membranes of the cells, while other specific proteins of the retinoid cycle, such as RPE65 and CRALBP, localize to the cytoplasm. Other typical features of RPE are the polarization of the cells, with apical microvilli and basal infoldings and the presence of pigment granules in the cytoplasm.

Four weeks after seeding onto the FAH, optical microscopy showed that iPSC-RPE cells grew as a monolayer epithelium with the expected cobblestone morphology (Fig. 3a). Further analyses of the cell phenotype included expression of the retinoid cycle genes *RPE65* and *CRALBP* and the sodium channel *BEST1* at RNA level (Fig. 3b) and a correct subcellular localization for the corresponding proteins *BEST1*, *CRALBP*, *RPE65*, and *ZO-1* (Fig. 3d). Moreover, ultrastructural characterization of the RPE grown on FAH (Fig. 3e) using transmission electron microscopy confirmed the presence of apical microvilli, basal infoldings, tight junctions between adjacent cells, and the expected intracellular distribution of organelles, pigment granules, and vacuoles. RPE cells grew as a monolayer of epithelial cells on top of the FAH with no infiltration of cells inside the matrix (Fig. 3c).

### Safety study in mouse

A 1 mm<sup>2</sup> patch of iPSC-RPE-FAH implant was subretinally placed in 12 animals. In all cases, only one eye received the implant, and the contralateral eye served as control. Four weeks after surgery mice were evaluated for retinal damage using standard ophthalmoscope to get both light and fluorescent fundus images (Fig. 4a–d), which were normal in all eyes subjected to transplantation. In addition, ERG waves were recorded, and quantification of the waves amplitude showed no significant differences in the electrical function of the photoreceptor cells (Fig. 4e–g), indicating that the transplant does not impair retinal function.



**FIG. 1.** Characterization of the iPSC line obtained from a healthy donor blood sample. **(a)** Immunofluorescence staining of pluripotency markers OCT4, NANOG, SOX2, SSEA3, and TRA1-81 in red and SSEA4 in green. **(b)** Expression of ectopic reprogramming factors (*c-MYC*, *KOS* and *KLF-4*) and the capsid gene (*SeV*) in passage 8-iPSC compared to passage 1-iPSC (c+) and primary cells (c-). **(c)** Phosphatase alkaline test. **(d)** Control for normal karyotype. **(e)** Ability to *in vitro* differentiate the three germ layers: immunofluorescence staining of markers of ectoderm: beta tubulin (TUJ20) in green and PAX6 in red; markers of mesoderm: ASM in green and desmin in red; and markers of endoderm: AFP in green and FOXA2 in red. AFP, alpha-fetoprotein; ASM, actin smooth muscle; iPSC, induced pluripotent stem cell.

Histological analysis of eye sections was performed 4 weeks after the surgery. As shown in Figure 4h, the implant was found adjacent to the host RPE layer. Both mouse and human RPE cells were identified by the expression of RPE65 (in green) that in the implanted cells was colocalized with human nuclei marker (in red, Fig. 4i). In addition, a histological control for inflammation was performed by immunostaining for IBA1, a marker of microglia and macrophages (in red, Fig. 4j, k) that showed no differences between transplanted and control eyes.

These positive results showing no damage of the host retina and survival of transplanted cells encouraged us to

perform a surgical test of the transplantation in a larger animal model, with an eye size closer to that of the human eye.

*Surgery assay in pig*

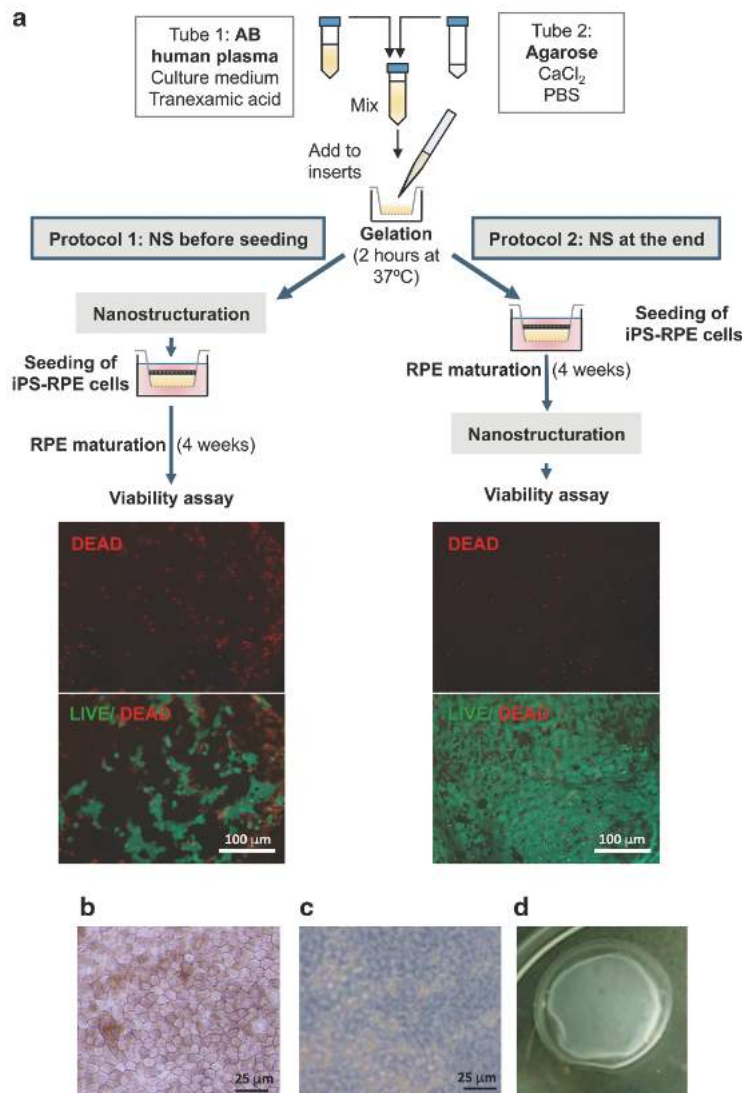
Using standard equipment and tools for vitreoretinal surgery in a facility for experimental animal surgery, two young pigs were transplanted with a 1 cm<sup>2</sup> piece of the iPSC-RPE-FAH implant in one eye.

To mimic the surgical implantation in the macular region, the implant was located in the posterior pole using a



## PRECLINICAL STUDY OF A TISSUE-ENGINEERED RETINAL IMPLANT

803



**FIG. 2.** Production of the RPE-FAH construct. **(a)** Schematic diagram of the two protocols tested for the production of the implant and representative images of the viability assay at the end of each protocol: protocol 1, NS before cell seeding (*left*) and protocol 2, NS after RPE maturation (*right*). The cytoplasm of live cells was stained with calcein in *green* and the nucleus of dead cells was stained with ethidium homodimer-1 in *red*. **(b)** Microscopy image of pigmented iPS-RPE cell culture used to seed the FAH. **(c)** Microscopy image of the FAH-RPE construct before implantation shows pigmentation, although the cells attached to the FAH were difficult to focus. **(d)** Macroscopic aspect of the FAH-RPE construct before implantation. FAH, fibrin-agarose hydrogel; RPE, retinal pigment epithelium.

bimanual surgical technique with complete vitrectomy and retinal detachment. In the first surgery in pig, a peripheral retinectomy was performed in the temporal area, while a posterior retinectomy was used in the second animal to evaluate the different surgical approaches in the subretinal access of the implant. An intraocular lens injector was used as tool to introduce the sheet inside the eye through the cornea as a lensectomy was performed at the beginning of the surgery.

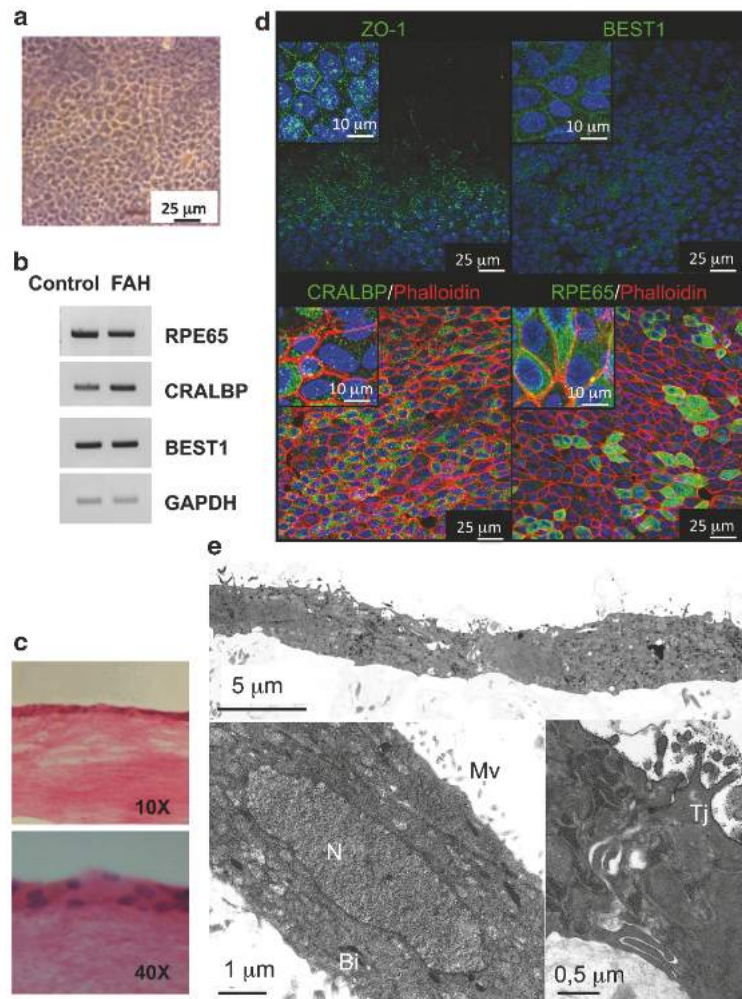
The main problems during surgery were the difficulty to keep the implant from folding as well as the rigidity of the material in the vitreous cavity. These problems can be solved using a thinner matrix and a wider injector in future experiments.

Recovery from anesthesia and external healing of the implanted eyes were good and animals were kept under

daily control and antibiotic-immunosuppression treatment until sacrifice 3 weeks later. Histological analysis revealed the location of transplanted iPS-RPE cells (RPE65 in green, Fig. 5). In the first transplanted eye, the implant was located in the subretinal space, but due to some difficulties, it remained in a folded conformation resulting in the appearance of a mass of cells instead of a monolayer (Fig. 5a). In the surgery of the second eye, the implant was correctly inserted in the subretinal space, resulting in a flat configuration, as shown in Figure 5b.

Due to immunosuppression, one of the pigs developed a mild respiratory infection. Immunostaining with IBA1 in sections of transplanted and control eyes (in red Fig. 5c, d) showed some reactivity in the implant, but no sign of an inflammatory process is found in the surrounding retina.

**FIG. 3.** Authentication of iPSC-RPE cell culture grown onto FAH. **(a)** Microscopy image showing normal RPE morphology in the iPSC-RPE cells cultured onto FAH 4 weeks after seeding. **(b)** Gene expression of the specific RPE markers *ZO1*, *BEST1*, *CRALBP*, and *RPE65* in RPE cells grown onto FAH matrix compared to RPE grown in standard substrate (control). **(c)** Microscopy images of an hematoxylin and eosin-stained section of iPSC-RPE-FAH, showing the cells on the surface of the matrix at low and high magnification. **(d)** Protein expression and localization of RPE markers by immunofluorescence: *ZO-1*, *BEST1*, *CRALBP*, and *RPE65* were stained in green. Phalloidin-stained f-actin, in red, highlighting the polygonal RPE cell morphology. Nuclei stained in blue with DAPI. **(e)** Ultrastructural characterization of iPSC-RPE grown on the matrix: the upper panel shows two adjacent cells and the lower panels present details at higher magnification of cell nucleus (N), apical microvilli (Mv), basal infoldings (Bi), and tight junctions (Tj). DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole.



To examine the biodistribution of the transplanted cells, samples of different tissues were collected for DNA extraction and polymerase chain reaction amplification of human specific repetitive DNA elements used in forensics to identify human biological material (hAlu) (Supplementary Fig. S2), finding no signal for cornea, contralateral retina, optic nerve, brain, medulla, lung, heart, liver, and kidney. A faint band was found in the adrenal gland samples, but this is most likely a contamination, given the complete absence of signal in surrounding tissues, although further analyses will be performed in follow-up experiments.

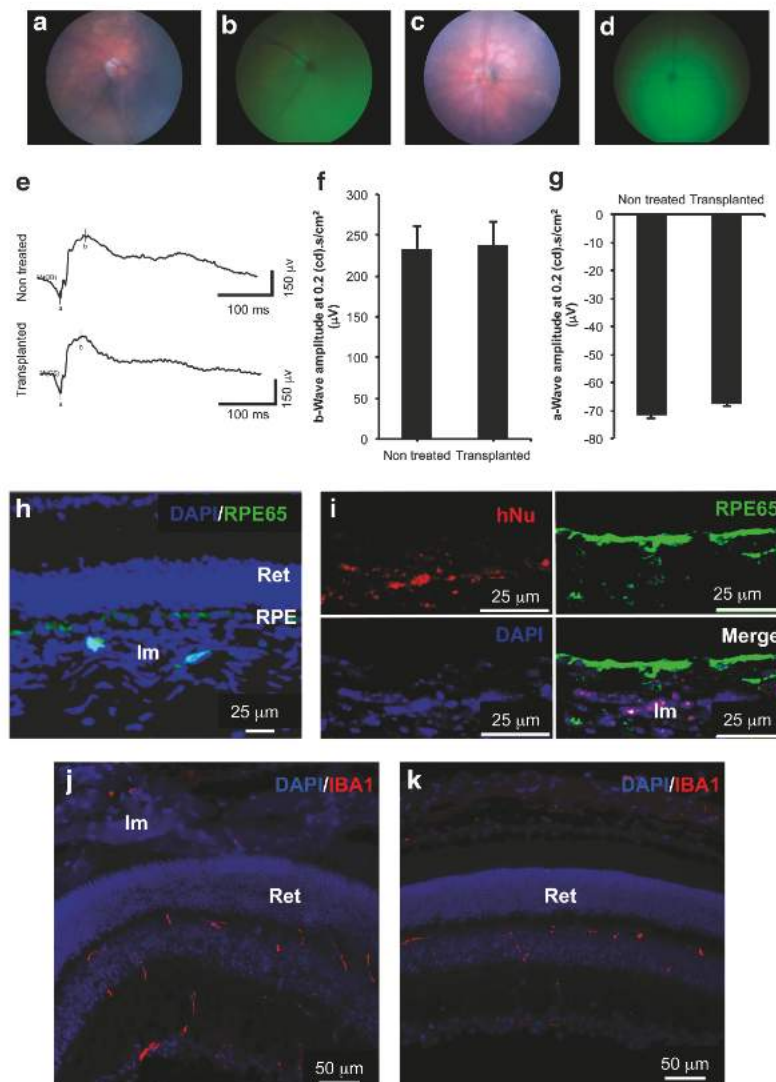
### Discussion

In this study, we describe the fabrication and characterization of a novel iPSC-RPE-FAH patch, in which cells derived *in vitro* from a blood sample of a healthy donor were reprogrammed to iPSCs and differentiated to RPE. The iPSC-RPE cells were grown onto FAH and, after NS, transplanted

into the subretinal space in two different animal models. In the rapidly evolving field of RPE cell therapy, this is the first time to the best of our knowledge that iPSC-RPE cells are used in combination with a FAH matrix as biocompatible support with the aim to produce a functional subretinal implant.

The first steps of the process were the generation of the iPSC line, its full characterization and the differentiation toward RPE using standard methodology. So far, most of the cell therapy studies aiming to replace RPE in degenerative diseases have used ESC as the biological source for cell differentiation.<sup>5,6,9</sup> The clinical use of a biological material originated from a pluripotent cell line requires a safety clearance not only for toxicity but also for the risk of differentiation into undesired cell types and tumorigenicity. The standardization of a clinical-grade ESC line is more straightforward and cost-effective than that of individual iPSC lines for autologous use<sup>7</sup> because a single well-characterized cellular product can be used to treat multiple patients. In the case of iPSC lines, the demonstration





**FIG. 4.** Study of mouse implanted eyes. Retinal structure was assessed by funduscopy (**a, c**) and autofluorescence images (**b, d**) without difference between images of the transplanted eyes (**a, b**) and the control eyes (**c, d**). ERG waves were recorded to assess retinal function. *a*- and *b*-waves of a representative animal showed no difference between the treated and the control eye (**e**). Quantification of *b*-wave (**f**) and *a*-wave (**g**) mean amplitudes. *t*-Test statistical analysis showed no difference between treated and control eyes. Histological study: immunofluorescence staining of RPE65, in green, showed the localization of the implant (Im) adjacent to the host RPE (**h**). Detail images in (**i**) with additional staining of human nuclei (hNu) in red. Assessment of inflammation by staining of IBA1, in red, in sections of a transplanted eye (**j**) and a control eye (**k**). Ret is for retina. ERG, electroretinogram.

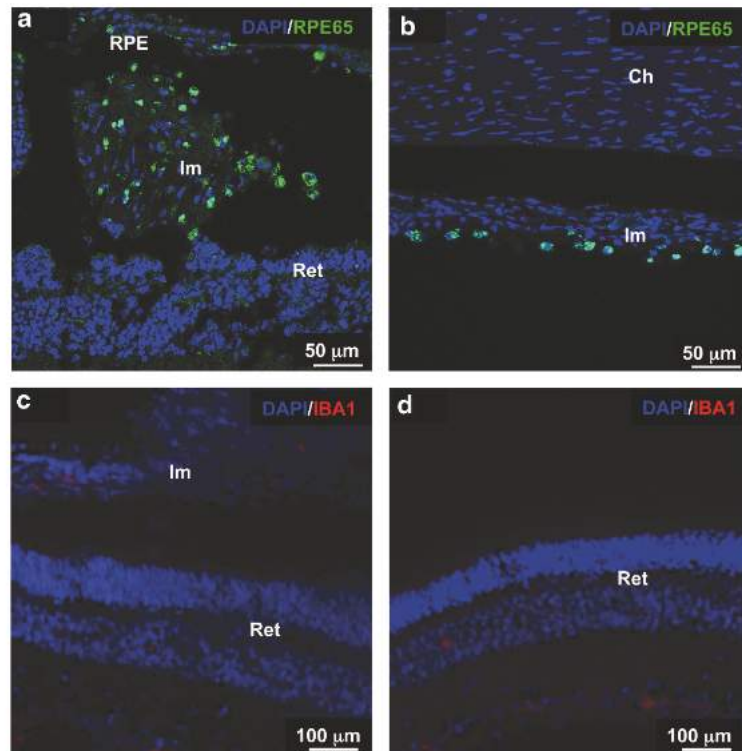
of reproducibility for different cell lines derived of different patients is an additional challenge to fulfill the requirements of the regulatory agencies, making the approval a huge investment in terms of time and money.

Another aspect to take into account is the immunogenicity. Although the use of ESC-derived material could rely in the immune privilege of the eye, this is compromised in AMD patients due to loss of integrity of the RPE layer.<sup>28</sup> In fact, a higher rejection susceptibility to allografts has been reported in wet AMD cases compared to dry AMD, which may be related to the greater distortion of the RPE-Bruch's membrane barrier in wet AMD.<sup>29</sup> Therefore, to sustain the viability of ESC-RPE grafted cells, a long-term immunosuppression is needed, which can pose a risk on the health of the treated individuals, particularly in the case of age-

related degeneration. In fact, in the clinical trial by da Cruz *et al.*, two of the three reported clinical adverse events were immunosuppression-related.<sup>9</sup> In our study, one of the pigs developed a respiratory infection, which is a very common event in immunosuppressed animals.

A balanced approach will be needed to make these therapies accessible to the public. Patients should be carefully stratified according to the better therapeutical approach for each case. Regulated reference standards are needed for products generated from ESC or iPSC for certification on safety and efficacy. Considering that the final cellular product to be taken to the clinic is RPE, a consistent RPE characterization panel needs to be defined to standardize the product to be transplanted; including not only morphological features but also functional validation of the cells.<sup>7,11</sup> Regarding safety,

**FIG. 5.** Study of pig-implanted eyes. Immunofluorescence staining of RPE65, in green, showed the localization of the implant (Im) between the host RPE and the retina (Ret), although not in a flat configuration due to surgical difficulties in the first treated animal (a). A correct placement of the implant was shown in the second treated animal (b). Assessment of inflammation by staining of IBA1, in red, in sections of a transplanted eye (c) and a control eye (d). Ch is for choroid.



RPE transplant is a very specific case, in which the final biological material has a high purity degree and a very small number of cells are used for the therapy, staying in the safe side regarding the threshold of pure pluripotent cells needed to initiate a teratoma.<sup>30</sup> Future possibilities to improve immunogenicity include the newest technological advances in genome editing, which may facilitate the production of a cell line with reduced immunogenicity.<sup>11</sup>

Minimization of the surgical trauma and the use of a scaffold that does not activate inflammation are also important to avoid autoimmune response that can be elicited even in autologous transplant.<sup>31</sup> Both synthetic and natural polymer scaffolds have been used to generate RPE implants (reviewed in Jha and Bharti<sup>7</sup>). The necessary features of a scaffold for RPE cells are the ability to sustain the growth of a polarized, functional RPE monolayer; physical properties that enable the implant to be handled and positioned during the surgery and a behavior in the subretinal space that is both helping the engraftment and inert to the host tissue.<sup>7</sup>

The FAH NS matrix elected for our implant has all the required features. FAH hydrogel was selected as scaffold because of its known biocompatibility and our previous experience in clinical use (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01765244). The physical properties of the iPSC-RPE-FAH were adjusted using a previously tested compression treatment that preserves cell viability, providing a thinner material with the elasticity and mechanical strength necessary to be handled in surgical implantation. In general, FAHs have poor mechanical stability, but NS has shown to

provide an improved material regarding tensile, compressive, and shear biomechanical properties due to the partial draining of the material.<sup>17</sup> The quality of the cells in the scaffold was confirmed by the expression of typical RPE features and viability test.

Ongoing work involves the use of larger experimental groups to consolidate the safety data. The analysis of the implant will be performed not only by end-point histology but also will include fundus imaging, tomography and ERG at several time points. We plan to include efficacy measurements by inducing specific damage to the RPE in one experimental group before the transplantation. We expect to collect the necessary safety and efficacy data to obtain authorization for a phase-I clinical assay in dry AMD patients.

### Conclusions

We have generated a biocompatible tissue-engineered retinal implant formed of iPSC-RPE grown onto FAH, in which the mature RPE cell layer preserves its typical features. After NS, the implant has controlled physical properties compatible with surgical handling and the viability of the cells is preserved. We have also shown the safety of the transplantation procedure and graft survival after 1 month, both in mouse and in pig. The implant could be successfully placed in the subretinal space of the treated animals without adverse events related to the scaffold material or the cells. We consider that this bioengineered product could potentially be used for autologous cell therapy applications in



patients with AMD or Stargardt disease, once further pre-clinical studies are completed to fulfill the regulatory requirements for clinical approval.

#### Acknowledgments

Authors are grateful to the patients association Macula Retina for the constant support along this project and to the Andalusian Government for funding. We thank IAVANTE for surgical help and excellent animal care and Prof. Miguel Alaminos, Prof. Antonio Campos, Fernando Campos, and Blanca Arribas for technical advice and Baush+Lomb for lending the surgical equipment for pigs. Funding: Study supported by Consejería de Salud, Junta de Andalucía and by ISCIII (Miguel Servet-I, 2015) cofinanced by European Regional Development Fund (ERDF) (CP/00071).

#### Authors' Contributions

Conception and design: B.C., F.J.D.C., R.S.P., and S.S.B. Collection and acquisition of data: B.C., A.B.G.D., J.A.A., M.L.V.S., A.D.L., S.M.C., F.J.D.C., I.R.L., and E.R.R. Analysis and interpretation of data: B.C., F.J.D.C., and B.F.M. Drafting of the article: B.C., A.B.G.D., I.R.L., and J.A.A. All authors approved final version.

#### Disclosure Statement

No competing financial interests exist

#### Supplementary Material

Supplementary Data  
Supplementary Figure S1  
Supplementary Figure S2  
Supplementary Table S1  
Supplementary Table S2

#### References

- Bhutto, I., and Luty, G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol Aspects Med* **33**, 295, 2012.
- Luo, M., and Chen, Y. Application of stem cell-derived retinal pigmented epithelium in retinal degenerative diseases: present and future. *Int J Ophthalmol* **11**, 150, 2018.
- Strauss, O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* **85**, 845, 2005.
- Nazari, H., Zhang, L., Zhu, D., *et al.* Stem cell based therapies for age-related macular degeneration: the promises and the challenges. *Prog Retin Eye Res* **48**, 1, 2015.
- Schwartz, S.D., Regillo, C.D., Lam, B.L., *et al.* Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet* **385**, 509, 2015.
- Liu, Y., Xu, H.W., Wang, L., *et al.* Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium transplants as a potential treatment for wet age-related macular degeneration. *Cell Discov* **4**, 50, 2018.
- Jha, B.S., and Bharti, K. Regenerating Retinal Pigment Epithelial Cells to Cure Blindness: a Road Towards Personalized Artificial Tissue. *Curr Stem Cell Rep* **1**, 79, 2015.
- Tezel, T.H., Del Priore, L.V., and Kaplan, H.J. Re-engineering of aged Bruch's membrane to enhance retinal pigment epithelium repopulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 3337, 2004.
- da Cruz, L., Fynes, K., Georgiadis, O., *et al.* Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nat Biotechnol* **36**, 328, 2018.
- Mandai, M., Kurimoto, Y., and Takahashi, M. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N Engl J Med* **377**, 792, 2017.
- Chichagova, V., Hallam, D., Collin, J., *et al.* Cellular regeneration strategies for macular degeneration: past, present and future. *Eye* **32**, 946, 2018.
- Campos-Cuerva, R., Fernández-Muñoz, B., Farfán López, F., *et al.* Nanostructured fibrin agarose hydrogel as a novel hemostatic agent. *J Tissue Eng Regen Med* **13**, 664, 2019.
- Alaminos, M., Sañchez-Quevedo, M.D.C., Muñoz-Avila, J.I., *et al.* Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 3311, 2006.
- Carriel, V., Garzón I, Jiménez, J.-M., *et al.* Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. *Cells Tissues Organs* **196**, 2012.
- Rodríguez, I.A., López-López, M.T., Oliveira, A.C.X., *et al.* Rheological characterization of human fibrin and fibrin-agarose oral mucosa substitutes generated by tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* **6**, 636, 2012.
- Carriel, V., Garzón I, Campos, A., Cornelissen, M., and Alaminos, M. Differential expression of GAP-43 and neurofilament during peripheral nerve regeneration through bio-artificial conduits: GAP-43 and neurofilament during nerve regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* **11**, 553, 2017.
- Garzón, I., Carriel, V., Marín-Fernández, A.B., *et al.* A combined approach for the assessment of cell viability and cell functionality of human fibrochondrocytes for use in tissue engineering. *PLoS One* **7**, e51961, 2012.
- Martin-Piedra, M.A., Garzón, I., Gómez-Sotelo, A., *et al.* Generation and evaluation of novel stromal cell-containing tissue engineered artificial stromas for the surgical repair of abdominal defects. *Biotechnol J* **12**, 2017.
- Chato-Astrain, J., Campos, F., Roda, O., *et al.* In vivo evaluation of nanostructured fibrin-agarose hydrogels with mesenchymal stem cells for peripheral nerve repair. *Front Cell Neurosci* **12**, 501, 2018.
- González-Andrades, M., Mata, R., González-Gallardo, M.D.C., *et al.* A study protocol for a multicentre randomised clinical trial evaluating the safety and feasibility of a bioengineered human allogeneic nanostructured anterior cornea in patients with advanced corneal trophic ulcers refractory to conventional treatment. *BMJ Open* **7**, e016487, 2017.
- Calado, S.M., Garcia-Delgado, A.B., De la Cerda, B., Ponte-Zuñiga, B., Bhattacharya, S.S., and Díaz-Corrales, F.J. Generation of a human iPS cell line from a patient with retinitis pigmentosa due to EYS mutation. *Stem Cell Res* **33**, 251, 2018.
- Lukovic, D., Artero Castro, A., Delgado, A.B.G., *et al.* Human iPSC derived disease model of MERTK-associated retinitis pigmentosa. *Sci Rep* **5**, 12910, 2015.
- Valdés-Sánchez, L., De la Cerda, B., Díaz-Corrales, F.J., *et al.* ATR localizes to the photoreceptor connecting cilium and deficiency leads to severe photoreceptor degeneration in mice. *Hum Mol Genet* **22**, 1507, 2013.



24. Scionti, G., Moral, M., Toledano, M., *et al.* Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model: hydration Effects on the Biomechanical Properties in a Fa Hydrogel. *J Biomed Mater Res A* **102**, 2573, 2014.
25. Carriel, V., Scionti, G., Campos, F., *et al.* In vitro characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute: nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute. *J Tissue Eng Regen Med* **11**, 1412, 2017.
26. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861, 2007.
27. Vaajasaari, H., Ilmarinen, T., Juuti-Uusitalo, K., *et al.* Toward the defined and xeno-free differentiation of functional human pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis* **17**, 558, 2011.
28. Zarbin MA. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* **122**, 598, 2004.
29. Algvere, P.V., Gouras, P., and Dafgård Kopp, E. Long-term outcome of RPE allografts in non-immunosuppressed patients with AMD. *Eur J Ophthalmol* **9**, 217, 1999.
30. Hong, S.G., Winkler, T., Wu, C., *et al.* Path to the Clinic: assessment of iPSC-based cell therapies in vivo in a non-human primate model. *Cell Rep* **7**, 1298, 2014.
31. Zhao, T., Zhang, Z.-N., Rong, Z., and Xu, Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* **474**, 212, 2011.

Address correspondence to:  
Berta de la Cerda, PhD  
Regeneration and Cell Therapy Department  
Andalusian Center for Molecular Biology  
and Regenerative Medicine (CABIMER)  
Seville 41092  
Spain

E-mail: berta.delacerda@cabimer.es

Francisco J. Díaz Corrales, PhD  
Regeneration and Cell Therapy Department  
Andalusian Center for Molecular Biology  
and Regenerative Medicine (CABIMER)  
Seville 41092  
Spain

E-mail: francisco.diaz@cabimer.es

Received: January 15, 2019

Accepted: March 25, 2019

Online Publication Date: May 7, 2019

### 3.2.1. información adicional artículo 3.

#### Supplementary Data

##### Supplementary Methods

###### *Culture and reprogramming of peripheral blood mononuclear cell*

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using the Vacutainer<sup>®</sup> CPT™ tubes (BD Biosciences). PBMCs were cultured ( $1.0 \times 10^6$  cells) in Expansion Medium (EM; QBSF-60 medium; 50  $\mu$ g/mL ascorbic acid, 1% Penicillin/Streptomycin, 50 ng/mL stem cell factor, 10 ng/mL IL-3, 2 U/mL erythropoietin, 40 ng/mL insulin-like growth factor, and 1  $\mu$ M dexamethasone) for 1 week before transduction with CytoTune<sup>®</sup>-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Thermo Fisher Scientific). In brief,  $0.25 \times 10^5$  cells were transduced using multiplicity of infection of 5-5-3 for *hKOS*, *hc-MYC*, and *hKLF4*, respectively. After 24 h of incubation, cells were collected and seeded in a 24-well plate containing EM. Two days later,  $0.1 \times 10^6$  cells were transferred onto a 6-well plate covered with  $0.25 \times 10^6$  irradiated human fetal fibroblasts (feeders) in QBSF-60 medium, supplemented with 50  $\mu$ g/mL ascorbic acid and 1% Penicillin/Streptomycin. Seven days post-transduction, culture medium was replaced by induced pluripotent stem cell (iPSC) medium ([knockout (KO) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 20% KO serum, 1% GlutaMAX; 1% minimal essential medium (MEM) non-essential amino acids (NEAA), 0.23 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1% Penicillin/Streptomycin] supplemented with 10 ng/mL basic fibroblast growth factor. Individual colonies with stem-like morphology were manually isolated 14 to 27 days post-transduction. iPSCs were expanded and maintained on feeders in iPSC medium in standard cell incubator at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, and manually passed every week.

###### *Three lineage differentiation*

To obtain the three germ layers *in vitro*, embryoid bodies (EBs) were generated. The iPSCs were manually separated

from the feeder cells and cultured in nonadherent conditions in iPSC medium for 7 days. The floating aggregates were seeded on glass coverslips pretreated with 0.1% gelatin and cultured for 1 week in EBs medium (DMEM/F12, 10% fetal bovine serum, 1% GlutaMAX, 1% MEM NEAA, and 1% Penicillin/Streptomycin).

###### *Differentiation to retinal pigment epithelium cells*

To obtain retinal pigment epithelium (RPE) cells, the iPSC colonies were manually separated from feeders and cultured in low attachment plates as floating aggregates in a modified iPSC medium with reduced serum (15% knockout serum replacement). Dark patches grew in the aggregates in 4 to 8 weeks and were dissected, dissociated with trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (0.05%), and seeded on Matrigel (No. 354277; BD) coated plates. Once a confluent culture with RPE characteristics (polygonal shape, pigmentation) was obtained, cells were dissociated with trypsin-EDTA (0.05%), passed through a 70  $\mu$ m strainer and seeded at 200,000 cells/cm<sup>2</sup> on a previously prepared fibrin-agarose hydrogel scaffold. The RPE cells were cultured for 4 weeks until they reached pigmentation.

###### *Alkaline phosphatase staining*

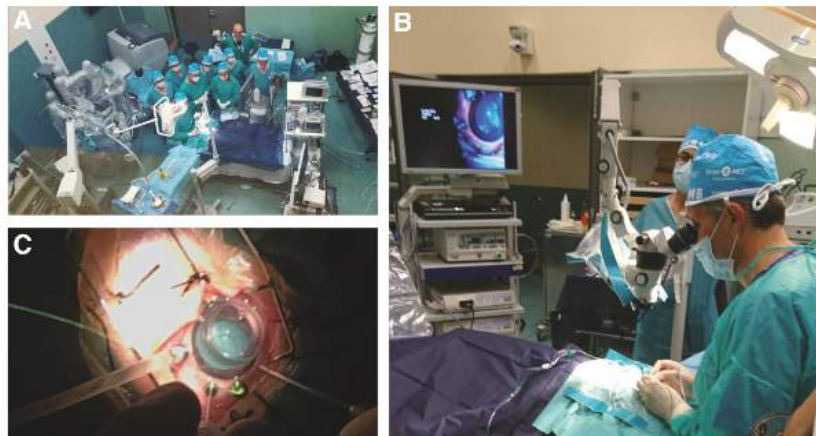
Alkaline Phosphatase Staining Kit II (Stemgent, MA) was used for the alkaline phosphatase test.

###### *Karyotype analysis*

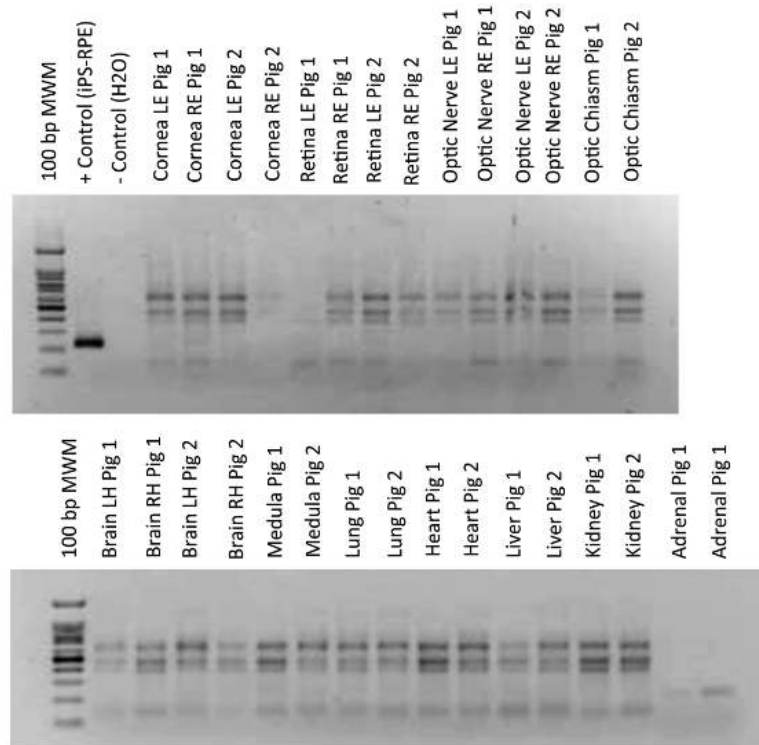
Genome integrity of the iPSCs was analyzed by G-banding at 400–550 band resolution in Biobanco de Sistema Sanitario Público, Granada, Spain.

###### *Immunofluorescence*

Cells or tissues were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min or overnight, respectively, washed twice in phosphate-



**SUPPLEMENTARY FIG. S1.** Images of the surgical intervention in pigs. (A) General view of the surgical room and team. (B, C) Details of the equipment used.



**SUPPLEMENTARY FIG. S2.** Amplification of human Alu in different tissues of both treated pigs was used as a marker of biodistribution of human cellular material. LE, left eye; RE, right eye; LH, left hemisphere; RH, right hemisphere.

buffered saline (PBS) and placed in blocking solution (1% bovine serum albumin in 0.2% Triton X-100/PBS) for 1 h at room temperature. Each primary antibody (Supplementary Table S1) was incubated overnight at 4°C and washed three times in 0.2% Triton X-100/PBS. Each secondary antibody (Supplementary Table S1) was incubated at room temperature for 1 h and washed three times. Samples were mounted with VECTASHIELD mounting medium (Vector H-1200) containing 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

#### RNA extraction and reverse transcriptase polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from cultured cells with RNeasy Mini Kit (Qiagen) and treated with DNaseI to remove genomic DNA contamination. One microgram of total RNA was used as template to obtain cDNA, using QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR) was performed using MyTaq DNA Polymerase (Bioline GmbH). See primers sequences in Supplementary Table S2. PCR products were analyzed on 2% agarose gels.

#### Human DNA detection

Genomic DNA was isolated from different tissues with QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen). Standard PCR was per-

formed using 50 ng of gDNA. See primers sequences in Supplementary Table S2.

#### Transmission electron microscopy

Cells were fixed overnight at 4°C in 2.5% of PFA and 2.5% of glutaraldehyde. Transmission electron microscopy was performed by Nanoimaging Service in BIONAND (Malaga, Spain), using a FEI Tecnai G2 29 TWIN Transmission Electron Microscope.

#### Mouse eye evaluation

**Funduscopy.** The mouse retinas were evaluated *in vivo* using an advanced retinal-imaging microscope (MICRON III; Phoenix Research Laboratories, Inc., CA). The animals were anaesthetized by subcutaneous injection of ketamine hydrochloride/xylazine solution (80/12 mg/kg body weight [BW]) and pupils were dilated with one drop of 10% phenylephrine and 1% tropicamide. In addition, the eyes were locally anaesthetized with 0.1% tetracaine and 0.4% oxybuprocaine and a generous amount of 1% methylcellulose was placed on the corneas to keep the eye moist. Correct alignment of the eye and dilatation of the pupils were checked before placing the camera lens in contact with the cornea to visualize the retina. Finally, images of the central and the peripheral regions of the retina were repeatedly captured with a three-separate charge-

SUPPLEMENTARY TABLE S1. ANTIBODIES USED FOR IMMUNOFLUORESCENCE

<i>Antibody</i>	<i>Dilution</i>	<i>Company (Cat no.)</i>
<b>Pluripotency markers</b>		
Rabbit anti-OCT4	1:400	Cell Signaling Technology (2840)
Rabbit anti-NANOG	1:400	Cell Signaling Technology (4903)
Rabbit anti-SOX2	1:400	Cell Signaling Technology (3579)
Mouse anti-SSEA-4	1:100	BD Biosciences (560073)
Mouse anti-TRA-1-81	1:100	Stemgent (09-0069)
Rat anti-SSEA-3	1:100	Millipore (MAB4304)
<b>Three-lineage differentiation markers</b>		
Mouse anti-Tuj 20	1:500	Abcam (ab7751)
Mouse anti-ASM	1:300	Sigma-Aldrich (A5228)
Mouse anti-AFP	1:20	Sigma-Aldrich (A5228)
Rabbit anti-PAX6	1:500	Biolegend (901301)
Rabbit anti-Dcsmin	1:100	Thermo Scientific (RB9014)
Rabbit anti-FOXA2	1:200	Thermo Scientific (720061)
<b>Retinal pigment epithelium and others markers</b>		
Rabbit anti-BEST 1	1:100	Abcam (ab14928)
Mouse anti-CRALBP	1:250	Abcam (ab15051)
Mouse anti-ZO-1	1:100	Invitrogen (339100)
Mouse anti-RPE65	1:100	Abcam (ab78036)
Rabbit anti-RPE65	1:100	Bioss (bs-9575R)
Mouse anti-human nuclei	1:50	Millipore (MAB1281)
Mouse anti-Iba1	1:100	Abcam (15690)
<b>Secondary antibodies</b>		
Donkey anti-mouse 488	1:500	Molecular Probes (A-21202)
Donkey anti-rabbit 594	1:500	Molecular Probes (A-21207)
Donkey anti-rabbit 488	1:500	Molecular Probes (A-21206)
Donkey anti-mouse 594	1:500	Molecular Probes (A-21203)

coupled device camera. A long wavelength emission filter (transmission band Tavg N 93% 504.7–900 nm) and a short wavelength excitation filter (486.5 nm transmission band Tavg N 90% 451.5) were used to detect autofluorescence signal. Electroretinogram: In brief, to evaluate scotopic vi-

sion, mice were dark-adapted overnight and anaesthetized with ketamine/xylazine (80/12 mg/kg BW). The pupil was dilated and local anesthesia was applied to the cornea. Lubricant gel (1% methylcellulose) was used to bridge the gap between the electrodes and the cornea. The band-pass filter

SUPPLEMENTARY TABLE S2. PRIMERS USED IN REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION AND POLYMERASE CHAIN REACTION

<i>Primers</i>	<i>Target</i>	<i>Forward/reverse primer (5'-3')</i>	<i>Size (bp)</i>	<i>T (°C) annealing</i>
Episomal plasmids (RT-PCR)	SeV	GGATCACTAGGTGATATCGAGC/ ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTATC	181	55
	KOS	ATGCACCGCTACGACGTGAGCGC/ ACCTTGACAATCCTGATGTGG	510	55
	KLF4	TTCCTGCATGCCAGAGGAGCCC/ AATGTATCGAAGGTGCTCAA	410	55
	c-MYC	TAACTGACTAGCAGGCTTGTCG/ TCCACATACAGTCTGGATGATGATG	532	55
Retinal pigment epithelium markers (RT-PCR)	RPE65	TGGAGTCTTTGGGGAGCCAA/ CTCACCACCACACTCAGAAC	674	58
	CRALBP	GTGGACATGCTCCAGGATTC/ GTTGCTGAGCAGCTCTTTGG	251	58
	BEST 1	GAATTTGCAAGGTGCCCTGT/ ATCAGGAGGACGAGGAGGAT	214	58
House-keeping	GAPDH	TGCACCACCACTGCTTAGC/ GGCATGGACTGTGGTCATGAG	87	53
Human marker	hAlu	CGAGGCGGGTGGATCATGAGGT/ TCTGTGCGCCAGGCCGGACT	230	60

RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction.

cutoff frequencies were 0.312–300 Hz. A single white-flash pulse (6500 K) was used for stimulation with stimulus strength divided into six steps of 0.01, 0.05, 0.2, 1, 3, and 10 candela (cd)·s/m<sup>2</sup>. Fifteen responses were averaged in each step with an interstimulus interval of 15 s. To evaluate photopic vision, mice were light adapted for 10 min with a background illumination of 30 cd/m<sup>2</sup>. Stimulus strength of 3,

5, 10, 15, and 20 cd·s/m<sup>2</sup> was used to obtain the photopic responses. The data were recorded in a ColorDome Ganzfeld (Diagnosys LCC, MA). Wave amplitudes were measured for the treated and nontreated eye of 12 animals. *t*-Test analysis was performed, and data were represented graphically as microvolt means of *a*- or *b*-waves ± standard error of the mean.



### **3.3 Artículo 4.**

Generation of a human iPS cell line from a patient with retinitis pigmentosa due to *EYS* mutation.

**Ana B Garcia-Delgado\***, Sofia M Calado\*, Berta de la Cerda, Beatriz Ponte-Zuñiga, Shom S Bhattacharya, Francisco J Diaz-Corrales.

\* equal contribution author

Stem Cell Research 2018 Dec;33:251-254.doi:10.1016/j.scr.2018.11.002. Epub 2018 Nov 16.





Contents lists available at ScienceDirect

## Stem Cell Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scr](http://www.elsevier.com/locate/scr)

Lab resource: Stem Cell Line

## Generation of a human iPSC cell line from a patient with retinitis pigmentosa due to EYS mutation



Sofia M. Calado<sup>a,1</sup>, Ana B. Garcia-Delgado<sup>a,1</sup>, Berta De la Cerda<sup>a</sup>, Beatriz Ponte-Zuñiga<sup>b</sup>, Shom S. Bhattacharya<sup>a</sup>, Francisco J. Díaz-Corrales<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Regeneration and Cell Therapy, Andalusian Molecular Biology and Regenerative Medicine Centre-CABIMER (Junta de Andalucía, CSIC, Universidad de Sevilla, Universidad Pablo de Olavide), Seville, Spain

<sup>b</sup> Macarena University Hospital, Department of Ophthalmology, Seville, Spain

### ABSTRACT

Retinitis pigmentosa (RP) is an inherited retinal degenerative disease. Mutations in *EYS* have been associated with autosomal recessive RP. The human iPSC cell line, CABI002-A, derived from peripheral blood mononuclear cells from a patient carrying a heterozygous double mutation in *EYS* gene was generated by non-integrative reprogramming technology, using hOCT3/4, hSOX2, hc-MYC and hKLF4 reprogramming factors. Pluripotency and differentiation capacity were assessed by immunocytochemistry and RT-PCR. This iPSC line can be further differentiated towards the affected cells to understand the pathophysiology of the disease and test new therapeutic strategies.

### Resource table

Unique stem cell line identifier	CABI002-A
Alternative name(s) of stem cell line	OF0176-EYS02-C7
Institution	Andalusian Molecular Biology and Regenerative Medicine Centre (CABIMER)
Contact information of distributor	Francisco Diaz-Corrales, <a href="mailto:francisco.diaz@cabimer.es">francisco.diaz@cabimer.es</a>
Type of cell line	iPSC
Origin	Human
Additional origin info	Age:38 Sex: Male Ethnicity if known: Caucasian
Cell source	Peripheral blood mononucleated cells
Clonality	Clonal
Method of reprogramming	Sendai viral reprogramming
Genetic modification	No
Type of modification	N/A
Associated disease	Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa
Gene/locus	EYS/6q12 c.3567delA c.4829-4832delCATT
Method of modification	N/A
Name of transgene or resistance	N/A

Inducible/constitutive system

N/A

Date archived/stock date

N/A

Cell line repository/bank

N/A

Ethical approval

Patient informed consent obtained/Ethics Review Board-competent authority approval obtained (Ethical Approval number: PR-01-2015)

### Resource utility

The generation of this cellular model will allow us to better understand the pathophysiology of the disease and to test new therapeutic strategies for RP due to *EYS* mutations.

### Resource details

Mononucleated cells were collected from 4 ml of peripheral blood sample from 38 year-old patient diagnosed with inherited con-rod dystrophy, due to an heterozygous double mutation in *EYS* gene caused by a deletion of an A in the position 3567 of the exon 23 of the paternal allele (c.3567delA p.Gly1190Aspfs\*39), originating a frame reading change and premature STOP codon and a deletion of a CATT in the position 4829–4832 of the exon 26 of the maternal allele (c.4829-

\* Corresponding author at: Andalusian Molecular Biology and Regenerative Medicine Centre, Avda. Americo Vespucio n°24 Edif. CABIMER, Parque Científico y Tecnológico Cartuja, 41092 Sevilla, Spain.

E-mail address: [francisco.diaz@cabimer.es](mailto:francisco.diaz@cabimer.es) (F.J. Díaz-Corrales).

<sup>1</sup> Equally contributing authors.

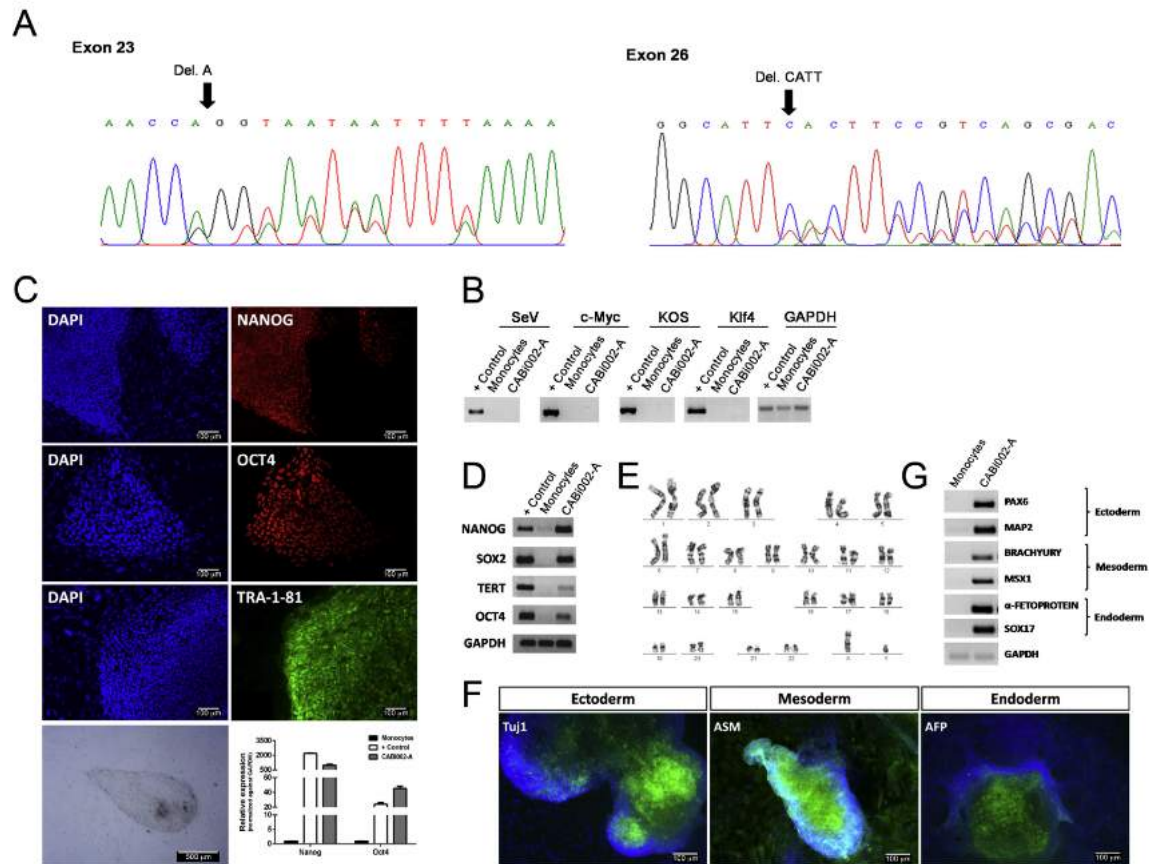
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.11.002>

Received 17 September 2018; Received in revised form 29 October 2018; Accepted 9 November 2018

Available online 16 November 2018

1873-5061/ © 2018 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).





**Fig. 1.** Characterization of CABI002-A line. A. DNA electropherograms showing the heterozygous double mutation c.3567delA and c.4829-4832delCATT of *EYS* gene in CABI002-A hiPS cell line of a RP patient. B. RT-PCR analysis of SeV genome and transgenes in hiPSCs, PBMCs (monocytes) and positive control (+ Control). C. Immunocytochemistry for pluripotency markers NANOG, OCT4 and TRA-1-81. Nuclei were counterstained with DAPI. Lower panel (left) is a brightfield image of a CABI002-A hiPS colony, showing its normal morphology and (right) quantification by qPCR of pluripotency markers *NANOG* and *OCT3/4* of CABI002-A hiPS cells compared, compared to PBMCs (monocytes). D. RT-PCR analysis of pluripotency markers. E. Representative metaphase of normal human karyotype (46, XY). F. Immunocytochemistry for ectodermal (Tuj1), mesodermal (ASM) and endodermal (AFP) germ layer markers with nuclei counterstained with DAPI. G. RT-PCR analysis of the three germ layer markers.

4832delCATT p.Ser1610Phefs\*7) (McGuigan et al., 2017). DNA sequencing of CABI002-A confirmed the presence of the aforementioned mutations (Fig. 1A). The human induced pluripotent stem (hiPS) cell line was generated by using Sendai virus, encoding the reprogramming factors hOCT3/4, hc-MYC, hKLF4, and hSOX2 (Takahashi et al., 2007), according to manufacturer's instructions.

The obtained colonies presented stem-like morphology and pluripotency markers Nanog, Oct4, and TRA-1-81 staining (Fig. 1C). The clearance of viral and endogenous reprogramming markers (Fig. 1B), as well as the presence of pluripotency genes (Fig. 1D), was confirmed by RT-PCR after eight cell culture passages. Our results on the karyotype analysis showed that CABI002-A cell line exhibited a normal, diploid (46, XY) chromosomal content (Fig. 1E) and the genetic fingerprinting proved the genetic identity to parental mononucleated blood cells (archived with journal). Pluripotency was tested by the ability of CABI002-A to generate the three germ layers *in vitro*: endoderm, mesoderm and ectoderm, as confirmed by immunofluorescent staining of  $\alpha$ -fetoprotein (AFP), vimentin and III beta-tubulin (Tuj1), respectively (Fig. 1F) and RT-PCR (Fig. 1G).

**Materials and methods**

*Mutation sequencing*

Genomic DNA from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and hiPSCs was isolated using the QIAamp DNA Blood mini kit (Qiagen). Primers used for amplification and directed sequencing of *EYS* flanking the mutation sites are described in Table 1.

*Reprogramming of PBMCs*

PBMCs were isolated using the Vacutainer® CPT™ tubes (BD Biosciences). PBMCs were cultured ( $1.0 \times 10^6$  cells) in Expansion Medium (EM; QBSF-60 medium; 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid, 1% Pen/Strep, 50 ng/ml SCF, 10 ng/ml IL-3, 2 U/ml EPO, 40 ng/ml IGF-1 and 1  $\mu$ M Dexamethasone), for one week before transduction with CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Thermo Fisher Scientific). Briefly,  $0.25 \times 10^5$  cells were transduced using MOI of 5–5.3 (hKOS, hc-MYC, hKLF4, respectively). After 24 h of incubation cells were collected, centrifuged and seeded in a 24 well plate containing EM. Two days later

**Table 1**  
Reagents details.

Antibodies used for immunocytochemistry/flow-citometry			
	Antibody	Dilution	Company Cat # and RRID
Pluripotency markers	Rabbit anti-OCT4	1:400	Cell Signaling Technology Cat# 2840, RRID:AB_2167691
	Rabbit anti-NANOG	1:400	Cell Signaling Technology Cat# 4903, RRID:AB_10559205
	Rabbit anti-SOX2	1:400	Cell Signaling Technology Cat# 3579, RRID:AB_2195767
	Mouse anti-SSEA-4	1:100	BD Biosciences Cat# 560073, RRID:AB_1645601
	Mouse anti-TRA-1-81	1:100	Stemgent Cat# 09-0069, RRID:AB_2119069
Differentiation markers	Rabbit anti- Tuj1	1:2000	Covance Research Products Inc. Cat# MRB-435P-100, RRID:AB_663339
	Mouse anti-ASM	1:300	Sigma-Aldrich Cat# A5228, RRID:AB_262054
	Mouse anti-AFP	1:20	Sigma-Aldrich Cat# A5228, RRID:AB_262054
Secondary antibodies	Donkey anti-Mouse 488	1:500	Molecular Probes Cat# A-21202, RRID:AB_141607
	Donkey anti-Rabbit 594	1:500	Molecular Probes Cat# A-21207, RRID:AB_141637
Primers			
	Target	Forward/Reverse primer (5'-3')	
Plasmids (RT-PCR)	SeV plasmid	GGTCACTAGGTGATATCGAGC/ACCAGACAAGAGTTAAGAGATATGTATC	
	KOS plasmid	ATGCACCGCTACGACGTGAGCGC/ACCTTGACAATCCTGATGTGG	
	KLF4 plasmid	TTCTGTCATGCCAGAGGAGGCC/AATGTATCGAAGGTGCTCAA	
	c-MYC plasmid	TAACTGACTAGCAGGCTTGTCC/TCCACATACAGCTCCTGGATGATGATG	
Pluripotency markers (RT-PCR)	NANOG	CCAAATTCTCCTGCCAGTGAC/CACGTGGTTTCCAAACAAGAAA	
	OCT4	AAGCCCTGATTTACCAGG/CTTGAAGCTTAGCCAGGTC	
	SOX2	TCACATGTCCAGCACTACC/CCCATTTCCCTCGTTTTTCT	
	TERT	GGCTTTGGTGGATGATTTCT/GGCATAGCTGGAGTAGTCCG	
Differentiation Potential (RT-PCR)	PAX6	GTCCATCTTTGCTGGGAAA/TAGCCAGGTTGCGAAGAAGCT	
	MAP2	GCACGCTGCGAGCTTGATC/TCTCCACCACCCCGTACGCA	
	BRACHYURY	TCAGCAAAGTCAAGCTCACCA/CCCCAACTCTCACTATGTGGATT	
	MSX1	CGAGAGGACCCCGTGGATGCAGAG/GGCGGCCATCTTCAGCTTCCAG	
	α-FETOPROTEIN	CTTTGGGCTGCTCGCTATGA/ATGGCTTGGAAAAGTTCCGGTC	
	SOX17	CGCTTTCATGGTGTGGGTAAGGACG/TAGTTGGGGTGGTCTGCAITGGCTG	
House-Keeping genes (RT-PCR) Genotyping	GAPDH	TGACCACCAACTGCTTAGC/GGCATGGACACTGGTGCATGAG	
	EYS exon 23	TCCAGCTACATGTTGTTC/CATTAAGATTTCTGATGAAAGC	
	EYS exon 26	CAAGCAACCAGAGACTCA/TGTGAAGGGACAATGGATAAAC	

0.1 × 10<sup>6</sup> cells were transferred onto a 6 well plate covered with 0.25 × 10<sup>6</sup> irradiated human foetal fibroblasts (irHFF) in QBSF-60 medium, supplemented with 50 µg/ml ascorbic acid and 1% Pen/Strep. Seven days post-transduction, culture medium was replaced by iPS medium (KO DMEM, 20% KO serum, 1% GlutaMAX; 1% MEM NEAA, 0.23 mM β-mercaptoethanol, 1% Pen/Strep, 10 ng/ml bFGF). Individual colonies with stem-like morphology were manually isolated and expanded 21 to 27 days post-transduction. hiPS cell cultures were cultured on 6 well plate coated 0.25 × 10<sup>6</sup> irHFF, maintained at 37 °C in humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, and passed every week.

*RT-PCR for detection of viral clearance and pluripotency markers*

Total RNA was isolated from cultured hiPS cells with RNeasy Mini Kit (Qiagen) and treated with DNase1 to remove genomic DNA contamination. 1 µg of total RNA was used as template to obtain cDNA, using QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Viral clearance and pluripotency markers detection were analyzed using the primers described in Table 1. RT-PCR reaction was performed using MyTaq DNA Polymerase (Bioline GmbH). PCR products were analyzed on 2% agarose gels.

*Three lineage differentiation*

*In vitro* differentiation was performed by embryoid body (EB) formation to generate the three germ layers (endoderm, mesoderm and ectoderm). The hiPS cells were separated manually from the feeder cells and cultured in non-adherent conditions in iPS medium without bFGF (KO DMEM, 20% KO serum, 1% GlutaMAX; 1% MEM NEAA, 0.23 mM β-mercaptoethanol, 1% Pen/Strep) for the following 7 days. Then, the EBs were seeded on glass coverslips treated with 0,1% gelatin for 2 h/

RT and cultured during one week in EBs medium (DMEM/F12, 10% FBS, 1% GlutaMAX, 1% MEM NEAA, 1% Pen/Strep). The coverslips were fixed in 4% PFA for 15 min and analyzed by immunofluorescence.

*Immunocytochemistry*

Cells were allowed to grow in glass coverslips coated with irHFF and washed in ice-cold PBS before fixation in 4% PFA, for 15 min. Fixed cells were washed twice in PBS and placed in blocking solution (2% donkey serum in 0.2% Triton-X100/PBS) for 1 h at room temperature. Cells were incubated for 1 h at room temperature with the primary antibody (Table 1). After incubation, samples were washed 3 times in 0.2% Triton X100/PBS, and incubated with the secondary antibodies at room temperature for 1 h (Table 1). After 3 washes, coverslips were mounted with Vectashield mounting medium (Vector H-1200) containing 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

*Karyotype analyses*

Genome integrity of the hiPS cells was analyzed by G-banding at 400–550 band resolution (Biobanco de Sistema Sanitario Público, Granada, Spain).

*Fingerprinting*

gDNA from PBMC's and hiPS cells was extracted using QIAamp DNA Blood mini kit (Qiagen) in the presence of RNase (Roche). Fingerprinting analyses was performed by Biobanco de Sistema Sanitario Público, Granada, Spain.

*Mycoplasma detection*

The presence of mycoplasma was tested regularly by luminescence using the MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit (Lonza).

**Funding**

This work was supported by Cellex Foundation (Barcelona, Spain) and Fundación Progreso y Salud (Seville, Spain).

**References**

- McGuigan, D.B., Heon, E., Cideciyan, A.V., Ratnapriya, R., Lu, M., Sumaroka, A., Roman, A.J., Batmanahane, V., Garafalo, A.V., Stone, E.M., Swaroop, A., Jacobson, S.G., 2017. EYS mutations causing autosomal recessive retinitis pigmentosa: changes of retinal structure and function with disease progression. *Genes (Basel)* 8, 1–19. <https://doi.org/10.3390/genes8070178>.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>.

**3.3.1. Anexo artículo 4 (datos no publicados).**

## **4. Discusión**



Con el desarrollo actual de nuevas tecnologías, como la terapia génica y celular, muchos casos de ceguera podrían ser potencialmente tratables. Según las estadísticas publicadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), a nivel mundial, se estima que al menos 2.200 millones de personas tienen una discapacidad visual o ceguera, de las cuales al menos 1.000 millones podrían haberse prevenido o incluso tratado (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/blindness-and-visual-impairment>). Las enfermedades degenerativas de la retina son un grupo heterogéneo de patologías, algunas hereditarias y otras de origen complejo, que producen una pérdida progresiva de las células retinianas con la consiguiente pérdida de la agudeza visual que puede avanzar hasta una ceguera total. Actualmente, se están investigando varias estrategias terapéuticas para tratar enfermedades degenerativas de la retina como es la aplicación de la optogenética, los implantes protésicos y las terapias basadas en genes o células. Enfocándonos en el desarrollo de estas nuevas terapias, el objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido generar conocimiento para contribuir al desarrollo de terapias de reemplazo celular para el tratamiento de EDR.

iPSCs como herramienta para el estudio y tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad.

En el objetivo 1 de este trabajo, en primer lugar, se ha generado una línea de iPSCs a partir de un paciente con DMAE con la idea de generar un modelo celular *in vitro* que nos permita profundizar en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad. Como ya se ha mencionado anteriormente, la DMAE es la primera causa de ceguera no hereditaria en adultos en los países desarrollados. Por lo tanto, es urgente desarrollar terapias nuevas y efectivas para esta enfermedad tan prevalente e incapacitante, ya que sería muy beneficioso para mejorar la calidad de vida de los pacientes y también para disminuir la carga económica sobre los sistemas sanitarios que acarreará el tratamiento crónico y el manejo de la discapacidad por esta enfermedad (Vitillo et al., 2020).

La DMAE es una enfermedad multifactorial en la que influyen la edad, una combinación de factores de riesgo genéticos basados en la presencia de SNP en determinados genes y factores ambientales relacionados con el estilo de vida, como por ejemplo la dieta o el tabaquismo. En esta primera parte del objetivo 1, estudiamos la línea celular derivada de una muestra de sangre periférica de un paciente diagnosticado con DMAE seca que porta un SNP en el gen *CFH* causado por una sustitución de una timina por una citosina en la posición 1204 del exón 9 (c.1204 T>C p.Y402H), que es considerado como el SNP más común ligado al riesgo de padecer DMAE. Muchos estudios han demostrado que la proteína CFH se produce localmente en el ojo y parece ser

que tiene una función importante en el mantenimiento de la homeostasis local. Estudios *in vitro* demuestran que el EPR produce CFH a niveles cercanos a los del hígado y que la producción de CFH varía según los factores ambientales locales. CFH es sintetizado por el EPR y sobre todo por las células residentes de la coroides acumulándose en el EPR, en el espacio que se localiza debajo del EPR, en la coroides y en la matriz celular que se encuentra entre los fotorreceptores. También hay altos niveles en otras partes del ojo como el cristalino, el nervio óptico, la esclera y el cuerpo ciliar. Además, la expresión de CFH parece que comienza en fase temprana durante la embriogénesis y aumenta con la edad (Khandhadia et al., 2012).

Los modelos de ratón han servido para diseccionar los mecanismos moleculares que relacionan una activación exagerada del sistema del complemento con la patología de la DMAE. Aunque los estudios con modelos animales han proporcionado información importante, a día de hoy ninguno de los modelos disponibles recapitulan completamente la patogénesis de la enfermedad. Por ello que el uso de tecnologías de reprogramación celular a partir de muestras de pacientes abre vías de estudio para profundizar en los mecanismos moleculares así como para la búsqueda de nuevas terapias para el tratamiento de la enfermedad (Toomey et al., 2018).

#### *Proceso de reprogramación celular y caracterización de las líneas celulares generadas.*

A día de hoy, hay numerosos métodos descritos para generar iPSCs a partir de células somáticas y entre ellos decidimos llevar a cabo el proceso de reprogramación mediante la transducción de células mononucleares de sangre periférica de los pacientes con DMAE y el individuo sano con vectores modificados del SV que portaban los cuatro factores de transcripción (*Oct4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4*) necesarios para la reprogramación de células somáticas en iPSCs (Takahashi et al., 2007). El SV tiene ventajas que promueven su uso como vehículo de reprogramación como por ejemplo: i) se trata de un sistema de reprogramación que se transcribe en el citoplasma, lo que permite que el virus se elimine a medida que las células son subcultivadas (I. P. Chen et al., 2013; Schlaeger et al., 2015). Por el contrario, los vectores lentivirales o retrovirales se pueden integrar en el genoma del huésped y producir mutaciones por inserción y aberración cromosómica (Nakagawa et al., 2008; Rony et al., 2015; Takahashi & Yamanaka, 2006); ii) es un virus respiratorio no patógeno para humanos y iii) es capaz de transducir una amplia gama de tipos celulares ya que infecta a las células uniéndose al receptor siálico que está presente en la superficie de muchos tipos de células (Nakanishi & Otsu, 2012).

Una vez generadas las nuevas líneas de iPSCs, hay que realizar una exhaustiva caracterización de las mismas para describir las poblaciones

celulares, examinar su pluripotencia funcional y detectar si hay anomalías que puedan afectar a la seguridad de las células y a su comportamiento. En este estudio, se han llevado a cabo una serie de ensayos recomendados por las autoridades sanitarias españolas competentes (Comisión de Seguimiento y Control de la Donación de Células y Tejidos Humanos del Instituto de Salud Carlos III y el Banco Nacional de Líneas Celulares) (Adewumi et al., 2007; Crook et al., 2010; Martí et al., 2013). Los ensayos realizados han demostrado que las células reprogramadas presentan un cariotipo normal y tienen una capacidad pluripotente similar a las ESCs quedando demostrado tanto a nivel de expresión génica como a nivel de expresión proteica utilizando técnicas de inmunofluorescencia. También mediante expresión génica se ha demostrado la ausencia de los vectores virales que se han utilizado para la reprogramación, lo que indica que las células tras ser subcultivadas varias veces han eliminado todos los vectores virales utilizados. Esto implica que se han generado líneas de iPSCs de “huella cero” o “*foot-print free iPSC*”. A nivel funcional, se ha evaluado si las iPSCs tenían la capacidad de diferenciarse y generar células derivadas de las tres capas germinales embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo. Esta capacidad ha sido examinada utilizando un test de diferenciación *in vitro* mediante la formación de cuerpos embrionarios que crecen en suspensión y simulan el desarrollo embrionario *in vivo* (Shevde & Mael, 2012; ten Berge et al., 2008).

Una vez realizadas todas las pruebas anteriormente descritas, se pudo concluir que las líneas iPSC generadas eran pluripotentes y presentaban una calidad adecuada para utilizarse en los experimentos de diferenciación hacia EPR.

#### *Diferenciación hacia EPR y trasplante en animales de experimentación.*

Las iPSCs de los pacientes con la enfermedad y de un individuo sano fueron diferenciadas hacia EPR siguiendo una metodología estándar descrita por Vaajasaari y col. (Vaajasaari et al., 2011). Una vez diferenciadas, las suspensiones celulares de EPR de los diferentes pacientes y del individuo sano fueron trasplantadas mediante inyección subretiniana en animales modelo de DMAE, ratones *Nrf2*<sup>-/-</sup>. Dos meses después de la inyección, los animales fueron evaluados y se observó que, en general, no había una gran mejoría en la capacidad visual de los ratones inyectados, aunque sí se encontraron diferencias entre los ratones trasplantados con el EPR derivado de iPSCs de un individuo sano con respecto a los trasplantados con las células derivadas un paciente con la enfermedad. Los ratones trasplantados con las células de un individuo sano presentaron una leve mejoría en comparación con los trasplantados con el EPR del paciente con el polimorfismo en *CFH*, como se puede ver en el anexo del artículo 2.

En base a estos resultados se decidió utilizar células de EPR derivadas de iPSCs de un donante sano para la segunda parte del objetivo 1 de esta tesis



doctoral, donde se describe la fabricación y caracterización de un nuevo parche biocompatible nanoestructurado de EPR crecido sobre hidrogel de fibrina-agarosa (NFAH) con el objetivo de obtener un implante para realizar terapia celular en pacientes con DMAE. Las células cultivadas sobre la matriz se trasplantaron en el espacio subretiniano en dos modelos animales diferentes. En el campo de la terapia celular, siempre en constante evolución, esta es la primera vez que se ha utilizado la combinación de células iPS-EPR y una matriz de hidrogel de fibrina-agarosa como soporte biocompatible con el objetivo de producir un implante subretiniano funcional.

Los primeros pasos del proceso fueron la generación de la línea de iPSCs, su caracterización completa y la diferenciación hacia EPR utilizando una metodología estándar. En las últimas décadas, el enfoque de terapia celular para restaurar la visión se ha visto impulsado por el desarrollo de tecnologías basadas en células madre pluripotentes. Hoy en día, la terapia celular ha superado uno de los principales obstáculos de este tipo de terapia avanzada, como es tener una fuente ilimitada de células humanas que se puedan diferenciar en cualquier tipo celular. Las estrategias terapéuticas basadas en células para las enfermedades degenerativas de la retina se han centrado principalmente en tres tipos celulares como son las células ganglionares, los fotorreceptores y el EPR (Jin et al., 2019; O'Neill et al., 2019). El trasplante de EPR es mucho más sencillo que el de neuronas, por lo tanto, durante las últimas décadas, se han llevado a cabo varios estudios preclínicos y ensayos clínicos donde se ha evaluado la seguridad y la eficacia del trasplante de EPR en pacientes con DMAE ya que se sabe que la base fisiopatológica de la enfermedad es la pérdida de EPR, por lo que la sustitución del mismo es una diana terapéutica candidata para el tratamiento de la enfermedad.

Los primeros trasplantes de EPR utilizaron como fuente celular para el injerto cultivos primarios de EPR de origen fetal. En estudios posteriores se utilizaron líneas celulares modificadas genéticamente, incluso originadas a partir de tejidos no retinianos como la médula ósea. Estos primeros trasplantes no funcionaron correctamente, debido sobre todo al rechazo inmunológico del injerto, y ninguno de ellos mostró ser eficaz en humanos (Algvere et al., 1994; Durlu & Tamai, 1997). También fueron evaluados los autotrasplantes, obteniendo EPR de una zona no afectada de la retina del mismo paciente tratado. Las técnicas quirúrgicas para llevar a cabo los autotrasplantes eran extremadamente complejas y los efectos adversos de la cirugía, como el desprendimiento de retina, eran muy frecuentes. Por estas razones, a día de hoy no se realizan autotrasplantes de EPR (da Cruz et al., 2007). A pesar de que los trasplantes de EPR no tuvieron un buen comienzo, se ha logrado un gran progreso en el trasplante de EPR obtenido a partir de células madre pluripotentes humanas, ya que la diferenciación hacia EPR es una técnica fácil y altamente reproducible, permitiendo la producción a gran escala de EPR con

calidad de grado clínico (West et al., 2019).

El primer ensayo clínico de trasplante de EPR se realizó en 2011 por Schwartz y col. En este ensayo, pacientes con DMAE seca y enfermedad de Stargardt recibieron una suspensión de células de EPR obtenidas a partir de ESC. Los pacientes mostraron pequeñas mejoras en la agudeza visual y no hubo información de eventos adversos significativos (Schwartz et al., 2012, 2015). En 2018, se publicaron los resultados del primer ensayo clínico europeo que utilizó una suspensión de células de EPR derivadas de ESCs para tratar a pacientes con la enfermedad de Stargardt (Mehat et al., 2018). Por lo tanto, y tras los resultados obtenidos en estos ensayos clínicos, se confirmó que la inyección subretiniana de suspensión de células de EPR es segura, aunque con un efecto terapéutico mínimo. Una de las principales razones por las que estos estudios han demostrado una baja eficacia se ha atribuido al hecho de que el EPR inyectado como suspensión celular difícilmente va a formar una monocapa funcionalmente polarizada entre los fotorreceptores y la membrana de Bruch (West et al., 2019; M. Zarbin et al., 2019). Debido a esto, se buscó alguna estrategia alternativa al uso de suspensiones celulares como es el trasplante de láminas de EPR cultivadas en andamios artificiales o membranas biodegradables. Los estudios preclínicos han mostrado una mejor preservación de la supervivencia y la función de las células del EPR trasplantando dicho EPR en forma de lámina (Diniz et al., 2013; White & Olabisi, 2017).

Como ya se ha comentado en la introducción, están en marcha dos ensayos clínicos, uno en Reino Unido y otro en Estados Unidos, que utilizan membranas de diferentes materiales para llevar a cabo el trasplante de EPR (Carr et al., 2013; Da Cruz et al., 2018a; Bo Lu et al., 2012). Uno de ellos, ha publicado recientemente los resultados de un seguimiento de 12 meses de dos pacientes con DMAE húmeda demostrando mejoras sostenidas en la agudeza visual y ningún evento adverso grave (Da Cruz et al., 2018a).

Por otro lado, se ha informado que los hidrogeles de fibrina humana pueden proporcionar un soporte xeno-free a las células EPR derivadas de iPSCs para trasplantes y que estos hidrogeles son degradados rápidamente por las enzimas fibrinolíticas (Gandhi et al., 2018). Además, el uso de una matriz que minimice el trauma quirúrgico y que no active la inflamación es importante para evitar una respuesta autoinmune que puede ser incluso provocada en el trasplante autólogo (T. Zhao et al., 2011). Las características necesarias de un andamio sobre el que cultivar EPR-iPSCs son: capacidad para mantener el crecimiento de una monocapa de EPR funcional que esté polarizada, propiedades físicas que permitan manipular y colocar el implante durante la cirugía y un comportamiento en el espacio subretiniano que ayude al injerto y sea inerte para el tejido huésped (Jha & Bharti, 2015).

En base a todo lo comentado anteriormente se decidió utilizar un parche de

NFAH sobre el que se cultivaron las células del EPR derivadas de iPSC humanas para llevar a cabo la segunda parte del objetivo 1 de esta tesis doctoral. El material empleado consiste en una matriz biocompatible de NFAH que ha sido desarrollada por el Grupo de Investigación en Ingeniería de Tejidos de la Universidad de Granada (número de patente: ES2353990 (A1) 2011-03-09). Trabajos previos de este grupo de investigación han demostrado la utilidad de este producto tanto *in vitro* como en animales de experimentación (Alaminos et al., 2006; Víctor Carriel et al., 2012). Los estudios preclínicos con la nanomatriz de fibrina-agarosa han permitido iniciar un ensayo clínico en pacientes con úlceras corneales refractarias a los tratamientos convencionales (CAH/Ulc/2010, EudraCT: 2010-024290-40). La biomatriz se ha elaborado según las especificaciones contenidas en el expediente autorizado por la AEMPS (Medicamento de Investigación con nº 12-032) (González-Andrades et al., 2017; Rico-Sánchez et al., 2019).

Los excelentes resultados obtenidos hasta ahora permiten suponer que este biomaterial y estos métodos de fabricación podrían ser útiles para otro tipo de tejidos artificiales. De hecho, esta matriz ha demostrado una compatibilidad completa con diferentes tipos de células humanas como fibroblastos, queratinocitos, células de la mucosa oral y también células madre pluripotentes humanas (Víctor Carriel et al., 2013). En nuestro ensayo, las propiedades físicas de la matriz de NFAH fueron ajustadas mediante un tratamiento de compresión previamente probado que preserva la viabilidad celular, dando lugar a un material más fino con la elasticidad y resistencia mecánica necesarias para ser manipulado en la implantación quirúrgica. Aunque los hidrogeles de fibrina-agarosa tienen poca estabilidad mecánica, han demostrado que al ser nanoestructurados mejoran en cuanto a sus propiedades biomecánicas de tracción, compresión y cizallamiento debido al drenaje parcial del material. Como podemos observar en los resultados del artículo 3, no se produjo una respuesta inflamatoria marcada en la retina de los animales después del trasplante. Además, no se observó diseminación de células EPR a otros tejidos, lo cual fue comprobado por la ausencia de ADN humano. Tanto la falta de inflamación, la falta de diseminación, así como el mantenimiento de la polaridad de las células trasplantadas, nos confirman que el uso de este tipo de membranas de NFAH son seguras para ser utilizadas como andamios para el trasplante de EPR.

Además del uso de membranas o andamios que han demostrado ser más efectivos que el uso de una suspensión celular, otro tema relevante a tener en cuenta con respecto a la terapia celular con EPR derivada de iPSC es si se debe hacer uso de trasplantes alogénicos o autólogos. Como ya se ha mencionado anteriormente, en Japón se ha llevado a cabo un ensayo clínico para evaluar la seguridad y eficacia del trasplante autólogo de láminas de células de EPR derivadas de dos pacientes con DMAE húmeda. Solo un

paciente recibió un injerto autólogo ya que se encontraron aberraciones genéticas en la línea celular de iPSC generada en el segundo caso (Mandai et al., 2017). El paciente trasplantado fue controlado durante cuatro años y aunque no se observaron efectos adversos graves, no hubo ninguna mejoría en la agudeza visual (Mandai et al., 2017; Takagi et al., 2019). Finalmente, este ensayo clínico fue suspendido debido a un cambio en la ley de medicina regenerativa de Japón. El uso de células iPS autólogas para generar EPR no es factible actualmente debido a los elevados costes en tiempo y recursos necesarios para llevar a cabo un control completo de la seguridad y la calidad de cada línea celular individual. Estos controles son un requerimiento previo a su autorización para uso clínico, lo que hace que este enfoque no sea viable a gran escala. Además, se ha demostrado el EPR-iPSCs obtenido de pacientes con DMAE presenta un metabolismo reducido lo que podría afectar a la viabilidad de los injertos celulares. Por lo tanto, la tendencia actual para realizar el reemplazo celular en pacientes con DMAE se basa en el trasplante de injerto alogénico (Bracha et al., 2017; Gong et al., 2020; Jones et al., 2017).

Aunque el ojo es un órgano inmunoprivilegiado debido a la barrera hematorretiniana, otra preocupación importante es el rechazo de los injertos alogénicos de células de EPR que se ve más comprometido en pacientes con DMAE debido a la pérdida de la integridad del EPR (M. A. Zarbin, 2004). De hecho, se ha informado de una mayor susceptibilidad al rechazo de injertos alogénicos en pacientes con DMAE húmeda comparándolo con pacientes con DMAE seca, que puede estar relacionada con una alteración de la barrera formada por la membrana de Bruch y el EPR (Algvere et al., 1999). Esto supondría el tratamiento crónico de los pacientes trasplantados con fármacos inmunosupresores para mantener la viabilidad de las células trasplantadas, los pacientes deben ser tratados crónicamente con fármacos inmunosupresores. Desafortunadamente, la inmunosupresión a largo plazo se asocia a una gran cantidad de efectos adversos que pueden agravarse en pacientes ancianos. Para superar este obstáculo, se ha considerado el uso de iPSCs compatibles con el antígeno leucocitario humano (HLA) para realizar trasplantes alogénicos. En este diseño, los ensayos posteriores implicarán el uso de líneas de iPSCs con compatibilidad HLA, disponibles en bancos de iPSCs, donde además se debe de validar la estabilidad genómica de las mismas (Nakatsuji et al., 2008; West et al., 2019).

Es por ello que consideramos nuestro estudio como una prueba de concepto para llevar a cabo ensayos preclínicos que permitan evaluar la eficacia y seguridad del trasplante de EPR derivado de iPSC en cerdos, ya que se ha demostrado que este implante es adecuado para el trasplante subretiniano, permitiendo que las células del EPR humanas sobrevivan y mantengan su fenotipo y orientación sin ningún evento adverso local o sistémico. Concluimos que este producto de bioingeniería podría potencialmente usarse para

aplicaciones de terapia celular en DMAE o para la enfermedad de Stargardt.

iPSCs como modelo celular para el estudio de la retinosis pigmentaria.

La RP es la forma más común de distrofia retiniana y engloba un grupo heterogéneo de enfermedades oculares hereditarias que causa una degeneración progresiva de la retina. A pesar de ser una enfermedad rara, representa la forma más común de ceguera hereditaria en el adulto (Menghini et al., 2020; Verbakel et al., 2018). Se han identificado múltiples genes que pueden contribuir a la enfermedad, incluyendo las mutaciones en el gen *EYS* como causa más común de RPar no sindrómica, ya que su prevalencia oscila entre el 5-16% en la población europea y el 18-23% en la población japonesa (Isabelle Audo et al., 2010; Barragán et al., 2010; Daiger et al., 2017; Ferrari et al., 2011; Hosono et al., 2012). Actualmente, no hay una terapia que pueda detener la evolución de la enfermedad o que permita recuperar la visión por lo que su pronóstico es malo. La terapia se limita a retrasar el proceso degenerativo mediante la protección de la luz solar, vitaminoterapia, tratando las complicaciones como cataratas y edema macular, además de ayudar a los pacientes a hacer frente a las consecuencias sociales y psicológicas de la ceguera (Schachat, Andrew P., MD; Sadda, Srinivas R., MD; Hinton, David R., MD; Wilkinson, C.P., MD; Wiedemann, Peter, 2017; Shintani et al., 2009). Sin embargo, durante la última década se están desarrollando terapias innovadoras que pudieran ser utilizadas en un futuro para el tratamiento de la RP siempre y cuando demuestran experimentalmente su seguridad y eficacia (Isiegas et al., 2016; Izquierdo-Serra et al., 2016; Sengillo et al., 2016; Shintani et al., 2009; Stronks et al., 2016; Suzuki et al., 2016).

La terapia celular y la edición génica son estrategias en desarrollo que, quizás en un futuro, puedan ser utilizadas para el tratamiento de la RP siempre y cuando demuestren que son seguras y eficaces. Estas terapias se basan en el empleo de iPSC obtenidas del propio paciente a las que se les induce la reparación de la mutación genética y posteriormente se diferencian hacia células funcionales de la retina.

Teniendo en cuenta ambas consideraciones, en el objetivo 2 de esta tesis doctoral se pretendía realizar la corrección génica de una línea de iPSC de un paciente con RP causada por mutaciones en el gen *EYS* y posteriormente diferenciar hacia células de la retina (EPR y fotorreceptores) las líneas celulares iPS corregidas y no corregidas para ser evaluadas y comparadas.

El gen *EYS* debido a su gran tamaño, 2 Mb de ADN genómico, es considerado uno de los genes de mayor tamaño expresados en el ojo humano (Abd El-Aziz

et al., 2008; Collin et al., 2008). El análisis de la estructura del gen confirma que *EYS* presenta múltiples isoformas y que 4 de ellas están expresadas en la retina. La proteína *EYS* está formada por múltiples dominios, entre ellos 28 dominios tipo EGF (factor de crecimiento epidérmico) en su extremo N-terminal y 5 dominios LamG (G de laminina) C-terminales y su función, a día de hoy, no está clara (Alfano et al., 2016; El-Aziz et al., 2010b).

Hasta la fecha, carecemos de una base sólida para inferir la posible funcionalidad de *EYS* en la retina humana, ya la mayor parte del conocimiento sobre este gen proviene de su ortólogo en *Drosophila* (Spacemaker-Spam) (Gurudev et al., 2014b). Varios estudios afirman que probablemente la proteína *EYS* está presente en el cilio conector de los fotorreceptores desempeñando un rol importante en el mantenimiento de la estructura y la función del mismo (Alfano et al., 2016; M. Yu et al., 2016b). Otro estudio con pez cebra como modelo animal con mutación en *EYS* informó de una discapacidad visual de los animales, con afectación principalmente de los conos y deslocalización de proteínas del segmento externo de los fotorreceptores y distorsión de los filamentos de F-actina (Z. Lu et al., 2017b). Es por tanto posible que la RP asociada a *EYS* sea una ciliopatía, ya que se sabe que aproximadamente el 80% de los genes que producen RP están relacionados con el cilio primario de los fotorreceptores (Wright et al., 2010). Aun así, no se puede descartar que algunas de las isoformas de *EYS* tengan un rol extracelular en la conformación de la matriz extracelular retiniana, denominada *interphotoreceptor matrix* (IPM), que llena el espacio entre los fotorreceptores y entre estos y el EPR. *EYS* es uno de los varios genes que causa RP no sindrómica que codifican proteínas que unen ácido hialurónico y que se pudieran localizar en la IPM. La proteína *EYS* contiene varios sitios para la unión de cadenas de glicosaminoglicanos y su alta homología como Spam impide descartar una posible función extracelular (Bandah-Rozenfeld, Collin, et al., 2010).

Lamentablemente, no existe un modelo animal de esta enfermedad en mamíferos y se desconoce el mecanismo patológico a nivel molecular de RP25, es por ello que el uso de tecnologías de reprogramación celular de iPSC generadas a partir de muestras de los pacientes abre puertas para profundizar en los mecanismos moleculares de esta patología.

En este trabajo, se ha generado la línea de iPSCs a partir de un paciente con RP debida a una mutación en el gen *EYS*. La generación de este modelo celular *in vitro* nos permitirá comprender mejor la fisiopatología de la enfermedad. Las iPSCs fueron generadas a partir de una muestra de sangre periférica de un paciente de 38 años diagnosticado con distrofia hereditaria de conos y bastones causada por una doble mutación en heterocigosis en el gen *EYS*, por un lado, una deleción de una Adenina en la posición 3567 del exón 23 del alelo paterno (c.3567delA p.Gly1190Aspfs\*39) y, por otro lado, una deleción de cuatro nucleótidos, CATT, en la posición 4829-4832 del exón 26 del alelo materno (c.4829-4832delCATT p.Ser1610PhefsX7) que originan un

cambio del marco lectura o sin sentido, dando lugar a una proteína truncada.

Al igual que la línea de iPSCs obtenida en el objetivo 1 de esta tesis doctoral, el proceso de reprogramación se llevó a cabo con vectores modificados del SV que portaban los cuatro factores de transcripción (*Oct4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4*) (Takahashi et al., 2007), y una vez reprogramadas fueron caracterizadas exhaustivamente llevando a cabo los ensayos recomendados por las autoridades sanitarias españolas competentes (Comisión de Seguimiento y Control de la Donación de Células y Tejidos Humanos del Instituto de Salud Carlos III y el Banco Nacional de Líneas Celulares) (Adewumi et al., 2007; Crook et al., 2010; Martí et al., 2013), descritos anteriormente. Estos ensayos demostraron que las células iPSC obtenidas presentan un cariotipo normal, tienen una capacidad pluripotente similar a las ESCs, están libres de vectores virales y tienen la capacidad de diferenciarse hacia las tres capas germinales embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo. Una vez realizadas todas las pruebas, se concluyó que las iPSCs generadas eran óptimas para llevar a cabo los siguientes experimentos de edición génica y diferenciación hacia EPR.

Esta línea de iPSCs se generó con el objetivo de corregir mediante CRISPR/Cas9 una de las dos mutaciones, ya que así desaparecería el fenotipo de la enfermedad. Durante la realización de esta tesis doctoral, en primer lugar, se diseñó una guía específica para el alelo mutado en el exón 23 y se realizó la edición génica sin añadir una secuencia de recombinación homóloga específica. Este diseño está basado en los resultados descritos por Ma H et al. (Ma et al., 2017) en el que consiguieron una alta eficiencia de reparación utilizando el alelo silvestre como molde de recombinación homóloga en embriones humanos. A pesar de que el material biológico era diferente, dada la similitud entre ambos tipos celulares, nosotros decidimos utilizar esta metodología en nuestras células iPSCs.

Después del análisis de 48 clones, dos de ellos mostraron una edición en su secuencia que resultaba en una corrección en la fase de lectura pero sin obtener una secuencia idéntica al alelo silvestre. Basándonos en estos resultados, nuestra predicción fue que se generaría una proteína funcional, no truncada. Para verificar esto, procedimos a la diferenciación celular hacia EPR de la línea iPSCs editada y posteriormente, realizamos su estudio fenotípico.

Tal como habíamos anticipado, el EPR de las iPSCs editadas presentó un fenotipo similar al EPR de un control sano ya que se recuperó la longitud del cilio primario y la morfología de las microvellosidades del EPR. Además, el ensayo funcional de resistencia transepitelial demostró que esta línea corregida se comportaba de manera similar a una línea de un control sano.

Como nuestro objetivo inicial era conseguir una edición en la que se recuperase completamente la secuencia silvestre de alguno de los alelos, hemos seguido trabajando siguiendo distintas estrategias: i) se diseñó una secuencia con brazos de homología al alelo silvestre y en distintos

experimentos, probamos la adición de esta molécula junto con las guías de corte, utilizando diferentes vectores no virales que facilitan la entrada de las moléculas al interior celular; ii) se utilizaron algunas moléculas, bien para modificar el ciclo celular o bien para favorecer la recombinación homóloga con el objetivo aumentar la probabilidad de que se produzca este tipo de reparación; y iii) se diseñó la molécula de brazos de homología con unas modificaciones químicas que la hacen más estable, incrementando así su vida media en el interior de las células. Todas estas pruebas se han realizado basándonos en las innovaciones en edición génica que se han venido publicando en estos últimos años (Liang et al., 2017; Riesenber et al., 2019; Torres-Ruiz et al., 2017).

A pesar de todas estas pruebas, aún no se ha conseguido el resultado esperado y este proyecto continúa en marcha en el laboratorio.



## **5. Conclusiones**

## Conclusiones del Objetivo 1.

Se obtuvieron las iPSCs a partir de muestras de sangre periférica de individuos sanos y pacientes con DMAE. El uso de muestras sanguíneas es un proceso menos invasivo que las biopsias cutáneas lo que facilita la obtención de las muestras.

En el proceso de caracterización de las líneas de iPSCs generadas no se observaron alteraciones cromosómicas y sus características morfológicas y moleculares demostraron que se habían generado células con características compatibles con las ESCs.

Las iPSCs obtenidas fueron diferenciadas con éxito hacia EPR y tras su caracterización, fueron trasplantadas en suspensión en el espacio subretiniano de un modelo murino de DMAE.

Los ratones *Nrf2*<sup>-/-</sup> trasplantados fueron evaluados concluyendo que el efecto protector del trasplante EPR fue mayor en los ratones trasplantados con el EPR derivado de iPSCs de individuos sanos. Sin embargo, las células en suspensión no fueron capaces de formar una monocapa.

El EPR derivado de iPSCs de un individuo sano fue cultivado sobre una membrana de fibrina agarosa conservando todas sus características morfológicas y funcionales. Tras el proceso de nanoestructuración, se observó que las células de EPR eran viables para ser trasplantadas en animales de experimentación.

Los modelos murinos y porcinos fueron trasplantados con la membrana de EPR-fibrina-agarosa. En el modelo murino se observó que no hubo rechazo del trasplante y que las células se mantenían viables después de un mes de ser trasplantadas. En el modelo porcino, después de dos meses, se comprobó la viabilidad e integración de las células EPR humanas sin producir una respuesta inflamatoria severa ni diseminación de las células trasplantadas a otros tejidos.

Por lo tanto, podemos concluir que EPR cultivado sobre una matriz de fibrina-agarosa mantiene su polaridad y morfología y que el trasplante EPR es seguro al utilizar este tipo de biomaterial.

## Conclusiones del Objetivo 2.

Se obtuvieron las iPSCs a partir de muestras de sangre periférica de individuos sanos y pacientes con RP. El uso de muestras sanguíneas es un proceso

menos invasivo que las biopsias cutáneas lo que facilita la obtención de las muestras.

En el proceso de caracterización de las líneas de iPSCs generadas no se observaron alteraciones cromosómicas y sus características morfológicas y moleculares demostraron que se habían generados células con características compatibles con las ESCs.

Se diferenciaron las iPSCs obtenidas hacia EPR y se evaluó su fenotipo mostrando que el EPR obtenido de las células del paciente con la mutación presentaba una atrofia de las microvellosidades, incremento del espacio intercelular debido a la pérdida de las uniones estrechas, ausencia de la proteína en la base del cilio primario y acortamiento de la longitud del cilio.

La corrección génica utilizando CRISPR-Cas9 para tratar las dos mutaciones no fue exitosa. En el caso del exón 26 no logramos el corte del ADN genómico con las guías diseñadas. Para el exón 23, logramos cortar el ADN genómico pero la inserción que se produjo no fue la del alelo silvestre. Sin embargo, esta nueva inserción permitió la corrección del marco de lectura y la producción de la proteína en las células de EPR.

Por lo tanto, podemos concluir que aunque la guía de corte diseñada para el exón 23 realizaba su función, no llegamos a corregir la mutación completamente porque no ocurrió una recombinación homóloga que resultara en el alelo silvestre.



## **6. Bibliografía**

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M. J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., Edel, M., Boué, S., & Belmonte, J. C. I. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.1503>
- Abd El-Aziz, M. M., Barragan, I., O'Driscoll, C. A., Goodstadt, L., Prigmore, E., Borrego, S., Mena, M., Pieras, J. I., El-Ashry, M. F., Safieh, L. A., Shah, A., Cheetham, M. E., Carter, N. P., Chakarova, C., Ponting, C. P., Bhattacharya, S. S., & Antinolo, G. (2008). EYS, encoding an ortholog of *Drosophila* spacemaker, is mutated in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng.241>
- Abd El-Aziz, M. M., O'Driscoll, C. A., Kaye, R. S., Barragan, I., El-Ashry, M. F., Borrego, S., Antiñolo, G., Pang, C. P., Webster, A. R., Bhattacharya, S. S., El-Aziz, M. M. A., O'Driscoll, C. A., Kaye, R. S., Barragan, I., El-Ashry, M. F., Borrego, S., Antiñolo, G., Pang, C. P., Webster, A. R., & Bhattacharya, S. S. (2010). Identification of novel mutations in the ortholog of *Drosophila* eyes shut gene (EYS) causing autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *51*(8), 4266–4272. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-5109>
- Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P. W., Beighton, G., Bello, P. A., Benvenisty, N., Berry, L. S., Bevan, S., Blum, B., Brooking, J., Chen, K. G., Choo, A. B. H., Churchill, G. A., Corbel, M., Damjanov, I., Draper, J. S., Dvorak, P., ... Zhang, W. (2007). Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt1318>
- Adijanto, J., & Naash, M. I. (2015). Nanoparticle-based technologies for retinal gene therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.12.028>
- Adler, R., & Canto-Soler, M. V. (2007). Molecular mechanisms of optic vesicle development: Complexities, ambiguities and controversies. In *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.01.045>
- Alaminos, M., Sánchez-Quevedo, M. D. C., Muñoz-Ávila, J. I., Serrano, D., Medialdea, S., Carreras, I., & Campos, A. (2006). Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1647>
- Alfano, G., Kruczek, P. M., Shah, A. Z., Kramarz, B., Jeffery, G., Zelhof, A. C., & Bhattacharya, S. S. (2016). EYS is a protein associated with the ciliary axoneme in rods and cones. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166397>
- Algvere, P. V., Berglin, L., Gouras, P., & Sheng, Y. (1994). Transplantation of fetal retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration with subfoveal neovascularization. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1007/BF00184273>
- Algvere, P. V., Gouras, P., & Kopp, E. D. (1999). Long-term outcome of RPE allografts in non-immunosuppressed patients with AMD. *European Journal of Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1177/112067219900900310>
- Ambati, J., & Fowler, B. J. (2012). Mechanisms of age-related macular degeneration. In *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.018>

- Anderson, D. H., Mullins, R. F., Hageman, G. S., & Johnson, L. V. (2002). A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *American Journal of Ophthalmology*. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(02\)01624-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(02)01624-0)
- Ao, J., Wood, J. P. M., Chidlow, G., Gillies, M. C., & Casson, R. J. (2018). Retinal pigment epithelium in the pathogenesis of age-related macular degeneration and photobiomodulation as a potential therapy? In *Clinical and Experimental Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1111/ceo.13121>
- Appella, E., Weber, I. T., & Blasi, F. (1988). Structure and function of epidermal growth factor-like regions in proteins. *FEBS Letters*, 231(1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80690-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80690-2)
- Aramburu del Boz, A., De la Cerda, B., & Valdés Sánchez, L. (2015). *Terapias Avanzadas en Patologías de la Retina* (F. Espejo Arjona & E. Rodríguez de la Rúa (eds.); 1st ed.).
- Artavanis-Tsakonas, S., & Muskavitch, M. A. T. (2010). Notch: The past, the present, and the future. *Current Topics in Developmental Biology*, 92(C), 1–29. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)92001-2](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)92001-2)
- Arteaga Martínez, G. P. (2018). Embriología Humana y Biología del desarrollo. *Journal of Chemical Information and Modeling*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Audo, I., Sahel, J., Mohand-Said, S., Lancelot, M., Antonio, A., Moskova-Doumanova, V., Nandrot, E., Doumanov, J., Barragan, I., & Antinolo, G. (2010). EYS is a major gene for rod-cone dystrophies in France. *Hum Mutat*, 31, E1406–E1435.
- Audo, Isabelle, Sahel, J. A., Mohand-Saïd, S., Lancelot, M. E., Antonio, A., Moskova-Doumanova, V., Nandrot, E. F., Doumanov, J., Barragan, I., Antinolo, G., Bhattacharya, S. S., & Zeitz, C. (2010). EYS is a major gene for rod-cone dystrophies in France. *Human Mutation*. <https://doi.org/10.1002/humu.21249>
- Augood, C. A., Vingerling, J. R., De Jong, P. T. V. M., Chakravarthy, U., Seland, J., Soubrane, G., Tomazzoli, L., Topouzis, F., Bentham, G., Rahu, M., Vioque, J., Young, I. S., & Fletcher, A. E. (2006). Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: The European Eye Study (EUREYE). *Archives of Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1001/archophth.124.4.529>
- Bainbridge, J. W. B., Smith, A. J., Barker, S. S., Robbie, S., Henderson, R., Balaggan, K., Viswanathan, A., Holder, G. E., Stockman, A., Tyler, N., Petersen-Jones, S., Bhattacharya, S. S., Thrasher, A. J., Fitzke, F. W., Carter, B. J., Rubin, G. S., Moore, A. T., & Ali, R. R. (2008a). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802268>
- Bainbridge, J. W. B., Smith, A. J., Barker, S. S., Robbie, S., Henderson, R., Balaggan, K., Viswanathan, A., Holder, G. E., Stockman, A., Tyler, N., Petersen-Jones, S., Bhattacharya, S. S., Thrasher, A. J., Fitzke, F. W., Carter, B. J., Rubin, G. S., Moore, A. T., & Ali, R. R. (2008b). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *New England Journal of Medicine*, 358(21), 2231–2239. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802268>
- Bakondi, B., Lv, W., Lu, B., Jones, M. K., Tsai, Y., Kim, K. J., Levy, R., Akhtar, A. A., Breunig, J. J., Svendsen, C. N., & Wang, S. (2016). In vivo CRISPR/Cas9 gene editing corrects retinal dystrophy in the S334ter-3 rat

- model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Molecular Therapy*, 24(3), 556–563. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.220>
- Bandah-Rozenfeld, D., Collin, R. W. J., Banin, E., Ingeborgh Van Den Born, L., Coene, K. L. M., Siemiatkowska, A. M., Zelinger, L., Khan, M. I., Lefeber, D. J., Erdinest, I., Testa, F., Simonelli, F., Voeselek, K., Blokland, E. A. W., Strom, T. M., Klaver, C. C. W., Qamar, R., Banfi, S., Cremers, F. P. M., ... Den Hollander, A. I. (2010). Mutations in IMPG2, Encoding interphotoreceptor matrix proteoglycan 2, cause autosomal-recessive retinitis pigmentosa. *American Journal of Human Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.07.004>
- Bandah-Rozenfeld, D., Littink, K. W., Ben-Yosef, T., Strom, T. M., Chowers, I., Collin, R. W. J., den Hollander, A. I., van den Born, L. I., Zonneveld, M. N., Merin, S., Banin, E., Cremers, F. P. M., & Sharon, D. (2010). Novel null mutations in the EYS gene are a frequent cause of autosomal recessive retinitis pigmentosa in the Israeli population. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4732>
- Barbosa-Morais, N. L., Irimia, M., Pan, Q., Xiong, H. Y., Gueroussov, S., Lee, L. J., Slobodeniuc, V., Kutter, C., Watt, S., Çolak, R., Kim, T. H., Misquitta-Ali, C. M., Wilson, M. D., Kim, P. M., Odom, D. T., Frey, B. J., & Blencowe, B. J. (2012). The evolutionary landscape of alternative splicing in vertebrate species. *Science*, 338(6114), 1587–1593. <https://doi.org/10.1126/science.1230612>
- Barragán, I., Borrego, S., Pieras, J. I., Pozo, M. G. del, Santoyo, J., Ayuso, C., Baiget, M., Millan, J. M., Mena, M., El-Aziz, M. M. A., Audo, I., Zeitz, C., Littink, K. W., Dopazo, J., Bhattacharya, S. S., & Antiñolo, G. (2010). Mutation spectrum of EYS in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. In *Human Mutation*. <https://doi.org/10.1002/humu.21334>
- Bassuk, A. G., Zheng, A., Li, Y., Tsang, S. H., & Mahajan, V. B. (2016). Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep19969>
- Beers, J., Gulbranson, D. R., George, N., Siniscalchi, L. I., Jones, J., Thomson, J. A., & Chen, G. (2012). Passaging and colony expansion of human pluripotent stem cells by enzyme-free dissociation in chemically defined culture conditions. *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.130>
- Benfenati, F., & Lanzani, G. (2018). New technologies for developing second generation retinal prostheses. In *Lab Animal*. <https://doi.org/10.1038/s41684-018-0003-1>
- Berger, W., Kloeckener-Gruissem, B., & Neidhardt, J. (2010). The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. In *Progress in Retinal and Eye Research*. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2010.03.004>
- Bessant, D. A. R., Ali, R. R., & Bhattacharya, S. S. (2001). Molecular genetics and prospects for therapy of the inherited retinal dystrophies. In *Current Opinion in Genetics and Development*. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(00\)00195-7](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00195-7)
- Bhaya, D., Davison, M., & Barrangou, R. (2011). CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. *Annual Review of Genetics*. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132430>
- Bhutto, I., & Luty, G. (2012). Understanding age-related macular degeneration



- (AMD): Relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Molecular Aspects of Medicine*, 33(4), 295–317.
- Black, J. R. M., & Clark, S. J. (2016). Age-related macular degeneration: Genome-wide association studies to translation. In *Genetics in Medicine*. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.70>
- Bonilha, V. L., Rayborn, M. E., Bell, B. A., Marino, M. J., Pauer, G. J., Beight, C. D., Chiang, J., Traboulsi, E. I., Hollyfield, J. G., & Hagstrom, S. A. (2015). Histopathological comparison of eyes from patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa caused by novel EYS mutations. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, 253(2), 295–305. <https://doi.org/10.1007/s00417-014-2868-z>
- Boulanger-Scemama, E., El Shamieh, S., Démontant, V., Condroyer, C., Antonio, A., Michiels, C., Boyard, F., Saraiva, J. P., Letexier, M., Souied, E., Mohand-Saïd, S., Sahel, J. A., Zeitz, C., & Audo, I. (2015). Next-generation sequencing applied to a large French cone and cone-rod dystrophy cohort: Mutation spectrum and new genotype-phenotype correlation. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0300-3>
- Boulton, M., Dontsov, A., Jarvis-Evans, J., Ostrovsky, M., & Svistunenko, D. (1993). Lipofuscin is a photoinducible free radical generator. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(93\)87085-2](https://doi.org/10.1016/1011-1344(93)87085-2)
- Bowes Rickman, C., Farsiu, S., Toth, C. A., & Klingeborn, M. (2013). Dry age-related macular degeneration: Mechanisms, therapeutic targets, and imaging. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12757>
- Bracha, P., Moore, N. A., & Ciulla, T. A. (2017). Induced pluripotent stem cell-based therapy for age-related macular degeneration. In *Expert Opinion on Biological Therapy*. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1346079>
- Bujakowska, K. M., Fernandez-Godino, R., Place, E., Consugar, M., Navarro-Gomez, D., White, J., Bedoukian, E. C., Zhu, X., Xie, H. M., Gai, X., Leroy, B. P., & Pierce, E. A. (2017). Copy-number variation is an important contributor to the genetic causality of inherited retinal degenerations. *Genetics in Medicine*, 19(6), 643–651. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.158>
- Bujakowska, K. M., Liu, Q., & Pierce, E. A. (2017). Photoreceptor cilia and retinal ciliopathies. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (Vol. 9, Issue 10). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028274>
- Burnight, E. R., Giacalone, J. C., Cooke, J. A., Thompson, J. R., Bohrer, L. R., Chirco, K. R., Drack, A. V., Fingert, J. H., Worthington, K. S., Wiley, L. A., Mullins, R. F., Stone, E. M., & Tucker, B. A. (2018). CRISPR-Cas9 genome engineering: Treating inherited retinal degeneration. In *Progress in Retinal and Eye Research*. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.03.003>
- Burnight, E. R., Gupta, M., Wiley, L. A., Anfinson, K. R., Tran, A., Triboulet, R., Hoffmann, J. M., Klaahsen, D. L., Andorf, J. L., Jiao, C., Sohn, E. H., Adur, M. K., Ross, J. W., Mullins, R. F., Daley, G. Q., Schlaeger, T. M., Stone, E. M., & Tucker, B. A. (2017). Using CRISPR-Cas9 to Generate Gene-

- Corrected Autologous iPSCs for the Treatment of Inherited Retinal Degeneration. *Molecular Therapy*, 25(9), 1999–2013.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.05.015>
- Cabral, T., DiCarlo, J. E., Justus, S., Sengillo, J. D., Xu, Y., & Tsang, S. H. (2017). CRISPR applications in ophthalmologic genome surgery. In *Current Opinion in Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000359>
- Cajal, S. R. y. (1893). La rétine des vertébrés. *La Cellule*.
- Carlson, B. M. (2013). Human Embryology and Developmental Biology: Fifth Edition. In *Human Embryology and Developmental Biology: Fifth Edition*.
- Carr, A. J. F., Smart, M. J. K., Ramsden, C. M., Powner, M. B., da Cruz, L., & Coffey, P. J. (2013). Development of human embryonic stem cell therapies for age-related macular degeneration. In *Trends in Neurosciences*.  
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.03.006>
- Carriel, Víctor, Garzón, I., Jiménez, J. M., Oliveira, A. C. X., Arias-Santiago, S., Campos, A., Sánchez-Quevedo, M. C., & Alaminos, M. (2012). Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. *Cells Tissues Organs*.  
<https://doi.org/10.1159/000330682>
- Carriel, Víctor, Garrido-Gómez, J., Hernández-Cortés, P., Garzón, I., García-García, S., Sáez-Moreno, J. A., Del Carmen Sánchez-Quevedo, M., Campos, A., & Alaminos, M. (2013). Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *Journal of Neural Engineering*.  
<https://doi.org/10.1088/1741-2560/10/2/026022>
- Carroll, D., Morton, J. J., Beumer, K. J., & Segal, D. J. (2006). Design, construction and in vitro testing of zinc finger nucleases. *Nature Protocols*.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.231>
- Carss, K., Arno, G., Erwood, M., Stephens, J., Sanchis-Juan, A., Hull, S., Megy, K., Grozeva, D., Dewhurst, E., Malka, S., Plagnol, V., Penkett, C. J., Stirrups, K., Rizzo, R., Wright, G., Josifova, D., Bitner-Glindzicz, M., Scott, R., Clement, E., ... Yu, P. (2017). Comprehensive Rare Variant Analysis via Whole-Genome Sequencing to Determine the Molecular Pathology of Inherited Retinal Disease. *American Journal of Human Genetics*, 100(1), 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.12.003>
- Ceasar, S. A., Rajan, V., Prykhodzhiy, S. V., Berman, J. N., & Ignacimuthu, S. (2016). Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.06.009>
- Chen, I. P., Fukuda, K., Fusaki, N., Iida, A., Hasegawa, M., Lichtler, A., & Reichenberger, E. J. (2013). Induced pluripotent stem cell reprogramming by integration-free sendai virus vectors from peripheral blood of patients with craniometaphyseal dysplasia. *Cellular Reprogramming*.  
<https://doi.org/10.1089/cell.2013.0037>
- Chen, X., Liu, X., Sheng, X., Gao, X., Zhang, X., Li, Z., Li, H., Liu, Y., Rong, W., Zhao, K., & Zhao, C. (2015). Targeted next-generation sequencing reveals novel EYS mutations in Chinese families with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Scientific Reports*, 5, 8927. <https://doi.org/10.1038/srep08927>
- Cheng, D. L., Greenberg, P. B., & Borton, D. A. (2017). Advances in Retinal Prosthetic Research: A Systematic Review of Engineering and Clinical Characteristics of Current Prosthetic Initiatives. In *Current Eye Research*.

- <https://doi.org/10.1080/02713683.2016.1270326>
- Chichagova, V., Hallam, D., Collin, J., Zerti, D., Dorgau, B., Felemban, M., Lako, M., & Steel, D. H. (2018). Cellular regeneration strategies for macular degeneration: Past, present and future. In *Eye (Basingstoke)*.  
<https://doi.org/10.1038/s41433-018-0061-z>
- Cho, G. Y., Schaefer, K. A., Bassuk, A. G., Tsang, S. H., & Mahajan, V. B. (2018). CRISPR genome surgery in the retina in light of off-targeting. *Retina*. <https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000002197>
- Cideciyan, A. V., Aleman, T. S., Boye, S. L., Schwartz, S. B., Kaushal, S., Roman, A. J., Pang, J. J., Sumaroka, A., Windsor, E. A. M., Wilson, J. M., Flotte, T. R., Fishman, G. A., Heon, E., Stone, E. M., Byrne, B. J., Jacobson, S. G., & Hauswirth, W. W. (2008a). Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807027105>
- Cideciyan, A. V., Aleman, T. S., Boye, S. L., Schwartz, S. B., Kaushal, S., Roman, A. J., Pang, J. J., Sumaroka, A., Windsor, E. A. M., Wilson, J. M., Flotte, T. R., Fishman, G. A., Heon, E., Stone, E. M., Byrne, B. J., Jacobson, S. G., & Hauswirth, W. W. (2008b). Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(39), 15112–15117.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0807027105>
- Cohen, A. I. (1961). Electron microscopic observations of the internal limiting membrane and optic fiber layer of the retina of the rhesus monkey (*M. mulatta*). *American Journal of Anatomy*.  
<https://doi.org/10.1002/aja.1001080205>
- Colijn, J. M., Buitendijk, G. H. S., Prokofyeva, E., Alves, D., Cachulo, M. L., Khawaja, A. P., Cougnard-Gregoire, A., Merle, B. M. J., Korb, C., Erke, M. G., Bron, A., Anastasopoulos, E., Meester-Smoor, M. A., Segato, T., Piermarocchi, S., de Jong, P. T. V. M., Vingerling, J. R., Topouzis, F., Creuzot-Garcher, C., ... Zwiener, I. (2017). Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Europe: The Past and the Future. *Ophthalmology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.05.035>
- Collin, R. W. J., Littink, K. W., Klevering, B. J., van den Born, L. I., Koenekoop, R. K., Zonneveld, M. N., Blokland, E. A. W., Strom, T. M., Hoyng, C. B., den Hollander, A. I., & Cremers, F. P. M. (2008). Identification of a 2 Mb Human Ortholog of *Drosophila* eyes shut/spacemaker that Is Mutated in Patients with Retinitis Pigmentosa. *The American Journal of Human Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.10.014>
- Conboy, I. H., Conboy, M. J., Smythe, G. M., & Rando, T. A. (2003). Notch-Mediated Restoration of Regenerative Potential to Aged Muscle. *Science*, *302*(5650), 1575–1577. <https://doi.org/10.1126/science.1087573>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*.  
<https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Cook, B., & Zelhof, A. C. (2008). Photoreceptors in evolution and disease. *Nature Genetics*, *40*(11), 1275–1276. <https://doi.org/10.1038/ng1108-1275>
- Creighton, H., & Waddington, C. H. (1958). The Strategy of the Genes. *AIBS*

- Bulletin*. <https://doi.org/10.2307/1291959>
- Crook, J. M., Hei, D., & Stacey, G. (2010). The international stem cell banking initiative (ISCBI): Raising standards to bank on. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*. <https://doi.org/10.1007/s11626-010-9301-7>
- Cryan, S. A., Holohan, A., Donohue, R., Darcy, R., & O'Driscoll, C. M. (2004). Cell transfection with polycationic cyclodextrin vectors. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2004.01.001>
- da Cruz, L., Chen, F. K., Ahmado, A., Greenwood, J., & Coffey, P. (2007). RPE transplantation and its role in retinal disease. In *Progress in Retinal and Eye Research*. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2007.07.001>
- Da Cruz, L., Fynes, K., Georgiadis, O., Kerby, J., Luo, Y. H., Ahmado, A., Vernon, A., Daniels, J. T., Nommiste, B., Hasan, S. M., Gooljar, S. B., Carr, A. J. F., Vugler, A., Ramsden, C. M., Bictash, M., Fenster, M., Steer, J., Harbinson, T., Wilbrey, A., ... Coffey, P. J. (2018a). Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.4114>
- Da Cruz, L., Fynes, K., Georgiadis, O., Kerby, J., Luo, Y. H., Ahmado, A., Vernon, A., Daniels, J. T., Nommiste, B., Hasan, S. M., Gooljar, S. B., Carr, A. J. F., Vugler, A., Ramsden, C. M., Bictash, M., Fenster, M., Steer, J., Harbinson, T., Wilbrey, A., ... Coffey, P. J. (2018b). Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nature Biotechnology*, 36(4), 1–10. <https://doi.org/10.1038/nbt.4114>
- Dai, W. J., Zhu, L. Y., Yan, Z. Y., Xu, Y., Wang, Q. L., & Lu, X. J. (2016). CRISPR-Cas9 for in vivo Gene Therapy: Promise and Hurdles. In *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. <https://doi.org/10.1038/mtna.2016.58>
- Daiger, S. P., Sullivan, L. S., & Bowne, S. J. (2017). *RetNet*. Retinal Information Network.
- Dang, Y., Zhang, C., & Zhu, Y. (2015). Stem cell therapies for age-related macular degeneration: The past, Present, And future. In *Clinical Interventions in Aging*. <https://doi.org/10.2147/CIA.S73705>
- Davis, R. L., Weintraub, H., & Lassar, A. B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90585-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90585-X)
- de Córdoba, S. R., Harris, C. L., Morgan, B. P., & Llorca, O. (2011). Lessons from functional and structural analyses of disease-associated genetic variants in the complement alternative pathway. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.09.002>
- de Jong, E. K., J.Geerlings, M., & Hollander, A. I. de. (2020). Chapter 10 - Age-related macular degeneration. *Genetics and Genomics of Eye Disease Advancing to Precision Medicine*, 155–180.
- De Jong, P. T. V. M. (2006). Age-related macular degeneration. In *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMra062326>
- de la Fuente, M., Seijo, B., & Alonso, M. J. (2008). Bioadhesive hyaluronan-chitosan nanoparticles can transport genes across the ocular mucosa and transfect ocular tissue. *Gene Therapy*. <https://doi.org/10.1038/gt.2008.16>
- Deisseroth, K. (2011). Optogenetics. In *Nature Methods*.

- <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.324>
- Den Hollander, A. I., Black, A., Bennett, J., & Cremers, F. P. M. (2010). Lighting a candle in the dark: Advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies. In *Journal of Clinical Investigation*.  
<https://doi.org/10.1172/JCI42258>
- Den Hollander, A. I., Ten Brink, J. B., De Kok, Y. J. M., Van Soest, S., Van Den Born, L. I., Van Driel, M. A., Van De Pol, D. J. R., Payne, A. M., Bhattacharya, S. S., Kellner, U., Hoyng, C. B., Westerveld, A., Brunner, H. G., Bleeker-Wagemakers, E. M., Deutman, A. F., Heckenlively, J. R., Cremers, F. P. M., & Bergen, A. A. B. (1999). Mutations in a human homologue of *Drosophila crumbs* cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/13848>
- Deng, Q., Chen, Z., Shi, L., & Lin, H. (2018). Developmental progress of CRISPR/Cas9 and its therapeutic applications for HIV-1 infection. In *Reviews in Medical Virology* (Vol. 28, Issue 5). John Wiley and Sons Ltd.  
<https://doi.org/10.1002/rmv.1998>
- Deng, W. L., Gao, M. L., Lei, X. L., Lv, J. N., Zhao, H., He, K. W., Xia, X. X., Li, L. Y., Chen, Y. C., Li, Y. P., Pan, D., Xue, T., & Jin, Z. B. (2018). Gene Correction Reverses Ciliopathy and Photoreceptor Loss in iPSC-Derived Retinal Organoids from Retinitis Pigmentosa Patients. *Stem Cell Reports*.  
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.02.003>
- Di, Y., Huang, L., Sundaresan, P., Li, S., Kim, R., Ballav Saikia, B., Qu, C., Zhu, X. X., Zhou, Y., Jiang, Z., Zhang, L., Lin, Y., Zhang, D., Li, Y., Zhang, H., Yin, Y., Lu, F., Zhu, X. X., & Yang, Z. (2016). Whole-exome Sequencing Analysis Identifies Mutations in the EYS Gene in Retinitis Pigmentosa in the Indian Population. *Scientific Reports*, 6, 19432.  
<https://doi.org/10.1038/srep19432>
- Diaz-Corrales, F. J., Morales-Sánchez, J. C., Valdés-Sánchez, L., Lucas-Rodríguez, R., Rodríguez-Martínez, D., Peñalver, P., Díez-Lloret, A., Bhatia, V., De La Cerda, B., Rodríguez-Bocanegra, E., & Bhattacharya, S. S. (2016). Sirt1 activators induced neuroprotection of photoreceptors in rd10 mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.
- Diniz, B., Thomas, P., Thomas, B., Ribeiro, R., Hu, Y., Brant, R., Ahuja, A., Zhu, D., Liu, L., Koss, M., Maia, M., Chader, G., Hinton, D. R., & Humayun, M. S. (2013). Subretinal Implantation of Retinal Pigment Epithelial Cells Derived From Human Embryonic Stem Cells: Improved Survival When Implanted as a Monolayer. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-11239>
- Doss, M. X., & Sachinidis, A. (2019). Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. *Cells*.  
<https://doi.org/10.3390/cells8050403>
- Durlu, Y. K., & Tamai, M. (1997). Transplantation of retinal pigment epithelium using viable cryopreserved cells. *Cell Transplantation*.  
[https://doi.org/10.1016/S0963-6897\(96\)00142-X](https://doi.org/10.1016/S0963-6897(96)00142-X)
- Edwards, A. O., Ritter, R., Abel, K. J., Manning, A., Panhuysen, C., & Farrer, L. A. (2005). Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1110189>
- El-Aziz, M. M. A., O'Driscoll, C. A., Kaye, R. S., Barragan, I., El-Ashry, M. F., Borrego, S., Antiñolo, G., Pang, C. P., Webster, A. R., & Bhattacharya, S. S. (2010a). Identification of novel mutations in the ortholog of *drosophila*

- eyes shut gene (EYS) causing autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(8), 4266–4272. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-5109>
- El-Aziz, M. M. A., O'Driscoll, C. A., Kaye, R. S., Barragan, I., El-Ashry, M. F., Borrego, S., Antiñolo, G., Pang, C. P., Webster, A. R., & Bhattacharya, S. S. (2010b). Identification of novel mutations in the ortholog of drosophila eyes shut gene (EYS) causing autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-5109>
- Ervasti, J. M., & Campbell, K. P. (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *Journal of Cell Biology*, 122(4), 809–823. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.4.809>
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/292154a0>
- Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpoor, S., Danielsson, A., Edlund, K., Asplund, A., Sjostedt, E., Lundberg, E., Szigartyo, C. A. K., Skogs, M., Ottosson Takanen, J., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., ... Uhlen, M. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*, 13(2), 397–406. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600>
- Fagerness, J. A., Maller, J. B., Neale, B. M., Reynolds, R. C., Daly, M. J., & Seddon, J. M. (2009). Variation near complement factor I is associated with risk of advanced AMD. *European Journal of Human Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.140>
- Ferrari, S., Iorio, E. Di, Barbaro, V., Ponzin, D., Sorrentino, F. S., Parmeggiani, F., Di Iorio, E., Ferrari, S., Ponzin, D., Barbaro, V., & Sorrentino, F. (2011). Retinitis Pigmentosa: Genes and Disease Mechanisms. *Current Genomics*.
- Flotte, T. R. (2007). Gene therapy: The first two decades and the current state-of-the-art. In *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.21173>
- Fritsche, L. G., Fariss, R. N., Stambolian, D., Abecasis, G. R., Curcio, C. A., & Swaroop, A. (2014). Age-Related Macular Degeneration: Genetics and Biology Coming Together. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090413-025610>
- Fuhrmann, S., Zou, C. J., & Levine, E. M. (2014). Retinal pigment epithelium development, plasticity, and tissue homeostasis. In *Experimental Eye Research*. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.09.003>
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*. <https://doi.org/10.2183/pjab.85.348>
- Gallego-Pinazo, R., Dolz-Marco, R., & Díaz-Llopis, M. (2012). Hacia la nueva clasificación de la degeneración macular asociada a la edad basada en la tomografía de coherencia óptica de dominio espectral. *Archivos de La Sociedad Española de Oftalmología*. <https://doi.org/10.1016/j.oftal.2011.09.018>

- Gallego, A. (1986). Chapter 7 Comparative studies on horizontal cells and a note on microglial cells. In *Progress in Retinal Research*.  
[https://doi.org/10.1016/0278-4327\(86\)90010-6](https://doi.org/10.1016/0278-4327(86)90010-6)
- Gandhi, J. K., Manzar, Z., Bachman, L. A., Andrews-Pfannkoch, C., Knudsen, T., Hill, M., Schmidt, H., Iezzi, R., Pulido, J. S., & Marmorstein, A. D. (2018). Fibrin hydrogels as a xenofree and rapidly degradable support for transplantation of retinal pigment epithelium monolayers. *Acta Biomaterialia*. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.11.058>
- Garber, K. (2015). RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*.  
<https://doi.org/10.1038/nbt0915-890>
- García-Delgado, A. B., Valdés-Sánchez, L., Calado, S. M., Díaz-Corrales, F. J., & Bhattacharya, S. S. (2018). Rasagiline delays retinal degeneration in a mouse model of retinitis pigmentosa via modulation of Bax/Bcl-2 expression. *CNS Neuroscience and Therapeutics*.  
<https://doi.org/10.1111/cns.12805>
- García Delgado, A. B., De La Cerda, B., Alba Amador, J., Valdés Sánchez, M. L., Fernández-Muñoz, B., Relimpio López, I., Rodríguez De La Rúa, E., Díez Lloret, A., Calado, S. M., Sánchez Pernaut, R., Bhattacharya, S. S., & Díaz Corrales, F. J. (2019). Subretinal Transplant of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium on Nanostructured Fibrin-Agarose. *Tissue Engineering - Part A*.  
<https://doi.org/10.1089/ten.tea.2019.0007>
- Gee, S. H., Montanaro, F., Lindenbaum, M. H., & Carbonetto, S. (1994). Dystroglycan- $\alpha$ , a dystrophin-associated glycoprotein, is a functional agrin receptor. *Cell*, 77(5), 675–686. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90052-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90052-3)
- Ghazi, N. G., Abboud, E. B., Nowilaty, S. R., Alkuraya, H., Alhommadi, A., Cai, H., Hou, R., Deng, W. T., Boye, S. L., Almaghamsi, A., Al Saikhan, F., Al-Dhibi, H., Birch, D., Chung, C., Colak, D., LaVail, M. M., Vollrath, D., Erger, K., Wang, W., ... Alkuraya, F. S. (2016). Treatment of retinitis pigmentosa due to MERTK mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: results of a phase I trial. *Human Genetics*.  
<https://doi.org/10.1007/s00439-016-1637-y>
- Giorgetti, A., Montserrat, N., Aasen, T., Gonzalez, F., Rodríguez-Pizà, I., Vassena, R., Raya, A., Boué, S., Barrero, M. J., Corbella, B. A., Torradella, M., Veiga, A., & Belmonte, J. C. I. (2009). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Cord Blood Using OCT4 and SOX2. In *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.09.008>
- Gold, B., Merriam, J. E., Zernant, J., Hancox, L. S., Taiber, A. J., Gehrs, K., Cramer, K., Neel, J., Bergeron, J., Barile, G. R., Smith, R. T., Hageman, G. S., Dean, M., & Allikmets, R. (2006). Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng1750>
- Gong, J., Cai, H., Noggle, S., Paull, D., Rizzolo, L. J., Del Priore, L. V., & Fields, M. A. (2020). Stem cell-derived retinal pigment epithelium from patients with age-related macular degeneration exhibit reduced metabolism and matrix interactions. *Stem Cells Translational Medicine*.  
<https://doi.org/10.1002/sctm.19-0321>
- González-Andrades, M., Mata, R., Del Carmen González-Gallardo, M.,

- Medialdea, S., Arias-Santiago, S., Martínez-Atienza, J., Ruiz-García, A., Pérez-Fajardo, L., Lizana-Moreno, A., Garzón, I., Campos, A., Alaminos, M., Carmona, G., & Cuende, N. (2017). A study protocol for a multicentre randomised clinical trial evaluating the safety and feasibility of a bioengineered human allogeneic nanostructured anterior cornea in patients with advanced corneal trophic ulcers refractory to conventional treatment. *BMJ Open*. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-016487>
- Graw, J. (2010). Eye development. In *Current Topics in Developmental Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)90010-0](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)90010-0)
- GURDON, J. B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*.
- Gurudev, N., Yuan, M., & Knust, E. (2014a). chaoptin, prominin, eyes shut and crumbs form a genetic network controlling the apical compartment of *Drosophila* photoreceptor cells. *Biology Open*, 3(5), 332–341. <https://doi.org/10.1242/bio.20147310>
- Gurudev, N., Yuan, M., & Knust, E. (2014b). chaoptin, prominin, eyes shut and crumbs form a genetic network controlling the apical compartment of *Drosophila* photoreceptor cells. *Biology Open*. <https://doi.org/10.1242/bio.20147310>
- Hageman, G. S., Anderson, D. H., Johnson, L. V., Hancox, L. S., Taiber, A. J., Hardisty, L. I., Hageman, J. L., Stockman, H. A., Borchardt, J. D., Gehrs, K. M., Smith, R. J. H., Silvestri, G., Russell, S. R., Klaver, C. C. W., Barbazetto, I., Chang, S., Yannuzzi, L. A., Barile, G. R., Merriam, J. C., ... Allikmets, R. (2005). A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501536102>
- Hageman, G. S., Luthert, P. J., Victor Chong, N. H., Johnson, L. V., Anderson, D. H., & Mullins, R. F. (2001). An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. In *Progress in Retinal and Eye Research*. [https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(01\)00010-6](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(01)00010-6)
- Haines, J. L., Hauser, M. A., Schmidt, S., Scott, W. K., Olson, L. M., Gallins, P., Spencer, K. L., Shu, Y. K., Nouredine, M., Gilbert, J. R., Schnetz-Boutaud, N., Agarwal, A., Postel, E. A., & Pericak-Vance, M. A. (2005). Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1110359>
- Haltom, A. R., & Jafar-Nejad, H. (2015). The multiple roles of epidermal growth factor repeat O-glycans in animal development. *Glycobiology*, 25(10), 1027–1042. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv052>
- Haltom, A. R., Lee, T. V., Harvey, B. M., Leonardi, J., Chen, Y.-J., Hong, Y., Haltiwanger, R. S., & Jafar-Nejad, H. (2014). The protein O-glucosyltransferase Rumi modifies eyes shut to promote rhabdomere separation in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, 10(11), e1004795. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004795>
- Hargrave, P. A. (2001). Rhodopsin structure, function, and topography: The Friedenwald lecture. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.
- Hauswirth, W. W., Aleman, T. S., Kaushal, S., Cideciyan, A. V., Schwartz, S. B.,



- Wang, L., Conlon, T. J., Boye, S. L., Flotte, T. R., Byrne, B. J., & Jacobson, S. G. (2008). 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 Therapy*. <https://doi.org/10.1089/hum.2008.107>
- Heilbronn, R., & Weger, S. (2010). Viral vectors for gene transfer: Current status of gene therapeutics. In *Handbook of Experimental Pharmacology*. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3_5)
- Hirschi, K. K., Li, S., & Roy, K. (2014). Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. In *Annual Review of Biomedical Engineering*. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-105108>
- Hoffman, L. M., & Carpenter, M. K. (2005). Characterization and culture of human embryonic stem cells. In *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt1102>
- Holzfeind, P. J. (2002). Skeletal, cardiac and tongue muscle pathology, defective retinal transmission, and neuronal migration defects in the Largemyd mouse defines a natural model for glycosylation-deficient muscle - eye - brain disorders. *Human Molecular Genetics*, *11*(21), 2673–2687. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.21.2673>
- Hori, A., Nishide, K., Yasukuni, Y., Haga, K., Kakuta, W., Ishikawa, Y., Hayes, M. J., Ohnuma, S. ichi, Kiyonari, H., Kimura, K., Kondo, T., & Sasai, N. (2019). Prominin-1 Modulates Rho/ROCK-Mediated Membrane Morphology and Calcium-Dependent Intracellular Chloride Flux. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52040-9>
- Hosono, K., Ishigami, C., Takahashi, M., Park, D. H., Hiram, Y., Nakanishi, H., Ueno, S., Yokoi, T., Hikoya, A., Fujita, T., Zhao, Y., Nishina, S., Shin, J. P., Kim, I. T., Yamamoto, S., Azuma, N., Terasaki, H., Sato, M., Kondo, M., ... Hotta, Y. (2012). Two novel mutations in the EYS gene are possible major causes of autosomal recessive retinitis pigmentosa in the Japanese population. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031036>
- Hough, S. H., Kancleris, K., Brody, L., Humphries-Kirilov, N., Wolanski, J., Dunaway, K., Ajetunmobi, A., & Dillard, V. (2017). Guide Picker is a comprehensive design tool for visualizing and selecting guides for CRISPR experiments. *BMC Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1581-4>
- Huang, Y., Zhang, J., Li, C., Yang, G., Liu, M., Wang, Q. K., & Tang, Z. (2010). Identification of a novel homozygous nonsense mutation in EYS in a Chinese family with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *BMC Medical Genetics*, *11*, 121. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-11-121>
- Husain, N., Pellikka, M., Hong, H., Klimentova, T., Choe, K. M., Clandinin, T. R., & Tepass, U. (2006). The Agrin/Perlecan-Related Protein Eyes Shut Is Essential for Epithelial Lumen Formation in the Drosophila Retina. *Developmental Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.08.012>
- Hussain, R. M., Gregori, N. Z., Ciulla, T. A., & Lam, B. L. (2018). Pharmacotherapy of retinal disease with visual cycle modulators. In *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1448060>
- Ikelle, L., Al-Ubaidi, M. R., & Naash, M. I. (2020). Pluripotent Stem Cells for the Treatment of Retinal Degeneration: Current Strategies and Future Directions. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology*.

- <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00743>
- Iliakis, G., Wang, H., Perrault, A. R., Boecker, W., Rosidi, B., Windhofer, F., Wu, W., Guan, J., Terzoudi, G., & Pantelias, G. (2004). Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenetic and Genome Research*. <https://doi.org/10.1159/000077461>
- Inoue, M., Tokusumi, Y., Ban, H., Kanaya, T., Tokusumi, T., Nagai, Y., Iida, A., & Hasegawa, M. (2003). Nontransmissible Virus-Like Particle Formation by F-Deficient Sendai Virus Is Temperature Sensitive and Reduced by Mutations in M and HN Proteins. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.5.3238-3246.2003>
- Isackson, P. J., Ochs-Balcom, H. M., Ma, C., Harley, J. B., Peltier, W., Tarnopolsky, M., Sripathi, N., Wortmann, R. L., Simmons, Z., Wilson, J. D., Smith, S. A., Barboi, A., Fine, E., Baer, A., Baker, S., Kaufman, K., Cobb, B., Kilpatrick, J. R., & Vladutiu, G. D. (2011). Association of common variants in the human eyes shut ortholog (EYS) with statin-induced myopathy: evidence for additional functions of EYS. *Muscle & Nerve*, 44(4), 531–538. <https://doi.org/10.1002/mus.22115>
- Isiegas, C., Marinich-Madzarevich, J. A., Marchena, M., Ruiz, J. M., Cano, M. J., De La Villa, P., Hernández-Sánchez, C., De La Rosa, E. J., & De Pablo, F. (2016). Intravitreal injection of proinsulin-loaded microspheres delays photoreceptor cell death and vision loss in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19300>
- Iwanami, M., Oshikawa, M., Nishida, T., Nakadomari, S., & Kato, S. (2012). High prevalence of mutations in the EYS gene in Japanese patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(2), 1033–1040. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-9048>
- Izquierdo-Serra, M., Bautista-Barrufet, A., Trapero, A., Garrido-Charles, A., Diaz-Tahoces, A., Camarero, N., Pittolo, S., Valbuena, S., Perez-Jimenez, A., Gay, M., Garcia-Moll, A., Rodriguez-Esrich, C., Lerma, J., De La Villa, P., Fernandez, E., Pericas, M. A., Llebaria, A., & Gorostiza, P. (2016). Optical control of endogenous receptors and cellular excitability using targeted covalent photoswitches. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms12221>
- Jaenisch, R., & Young, R. (2008). Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. In *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.015>
- Jay, M. (1982). On the heredity of retinitis pigmentosa. *British Journal of Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1136/bjo.66.7.405>
- Jha, B. S., & Bharti, K. (2015). Regenerating Retinal Pigment Epithelial Cells to Cure Blindness: A Road Towards Personalized Artificial Tissue. In *Current Stem Cell Reports*. <https://doi.org/10.1007/s40778-015-0014-4>
- Ji, D., Xing, W., Li, F., Huang, Z., Zheng, W., Hu, B., Niu, F., Zhu, Y., & Yang, X. (2019). Correlation of EYS polymorphisms with lumbar disc herniation risk among Han Chinese population. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 7(9), e890. <https://doi.org/10.1002/mgg3.890>
- Jin, Z. B., Gao, M. L., Deng, W. L., Wu, K. C., Sugita, S., Mandai, M., & Takahashi, M. (2019). Stemming retinal regeneration with pluripotent stem cells. In *Progress in Retinal and Eye Research*. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.11.003>

- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Johnson, L. V., Leitner, W. P., Staples, M. K., & Anderson, D. H. (2001). Complement activation and inflammatory processes in drusen formation and age related macular degeneration. *Experimental Eye Research*. <https://doi.org/10.1006/exer.2001.1094>
- Jones, M. K., Lu, B., Girman, S., & Wang, S. (2017). Cell-based therapeutic strategies for replacement and preservation in retinal degenerative diseases. In *Progress in Retinal and Eye Research*. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.01.004>
- Kanagawa, M., Omori, Y., Sato, S., Kobayashi, K., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Endo, T., Furukawa, T., & Toda, T. (2010). Post-translational maturation of dystroglycan is necessary for pikachurin binding and ribbon synaptic localization. *Journal of Biological Chemistry*, 285(41), 31208–31216. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.116343>
- Kang, X., Yu, Q., Huang, Y., Song, B., Chen, Y., Gao, X., He, W., Sun, X., & Fan, Y. (2015). Effects of integrating and non-integrating reprogramming methods on copy number variation and genomic stability of human induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131128>
- Kashani, A. H., Lebkowski, J. S., Rahhal, F. M., Avery, R. L., Salehi-Had, H., Dang, W., Lin, C. M., Mitra, D., Zhu, D., Thomas, B. B., Hikita, S. T., Pennington, B. O., Johnson, L. V., Clegg, D. O., Hinton, D. R., & Humayun, M. S. (2018). A bioengineered retinal pigment epithelial monolayer for advanced, dry age-related macular degeneration. *Science Translational Medicine*. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aao4097>
- Katagiri, S., Akahori, M., Hayashi, T., Yoshitake, K., Gekka, T., Ikeo, K., Tsuneoka, H., & Iwata, T. (2014). Autosomal recessive cone-rod dystrophy associated with compound heterozygous mutations in the EYS gene. *Doc Ophthalmol*, 128, 211–217.
- Kauppinen, A., Paterno, J. J., Blasiak, J., Salminen, A., & Kaarniranta, K. (2016). Inflammation and its role in age-related macular degeneration. In *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2147-8>
- Kennan, A., Aherne, A., & Humphries, P. (2005). Light in retinitis pigmentosa. In *Trends in Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.12.001>
- Khan, M. I., Collin, R. W. J., Arimadyo, K., Micheal, S., Azam, M., Qureshi, N., Faradz, S. M. H., den Hollander, A. I., Qamar, R., & Cremers, F. P. M. (2010). Missense mutations at homologous positions in the fourth and fifth laminin A G-like domains of eyes shut homolog cause autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Molecular Vision*, 16, 2753–2759.
- Khandhadia, S., Cipriani, V., Yates, J. R. W., & Lotery, A. J. (2012). Age-related macular degeneration and the complement system. In *Immunobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.019>
- Kim, J. B., Greber, B., Arazo-Bravo, M. J., Meyer, J., Park, K. I., Zaehres, H., & Schöler, H. R. (2009). Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature08436>
- Kim, T. H., Park, I. K., Nah, J. W., Choi, Y. J., & Cho, C. S. (2004). Galactosylated chitosan/DNA nanoparticles prepared using water-soluble

- chitosan as a gene carrier. *Biomaterials*.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.063>
- Kinnunen, K., Petrovski, G., Moe, M. C., Berta, A., & Kaarniranta, K. (2012). Molecular mechanisms of retinal pigment epithelium damage and development of age-related macular degeneration. In *Acta Ophthalmologica*. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2011.02179.x>
- Klein, R. J., Zeiss, C., Chew, E. Y., Tsai, J. Y., Sackler, R. S., Haynes, C., Henning, A. K., SanGiovanni, J. P., Mane, S. M., Mayne, S. T., Bracken, M. B., Ferris, F. L., Ott, J., Barnstable, C., & Hoh, J. (2005). Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1109557>
- Klein, R., Peto, T., Bird, A., & Vannewkirk, M. R. (2004). The epidemiology of age-related macular degeneration. *American Journal of Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2003.11.069>
- Kopan, R., & Ilagan, M. X. G. (2010). *Cell Notch signaling pathway.pdf*. 137(2), 216–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.045>.The
- La Cour, M. (2008). ACTA-EVER lecture 2007: The retinal pigment epithelium: Friend or foe? In *Acta Ophthalmologica*. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2008.01373.x>
- la Cour, M., & Tezel, T. (2005). The Retinal Pigment Epithelium. In *Advances in Organ Biology*. [https://doi.org/10.1016/S1569-2590\(05\)10009-3](https://doi.org/10.1016/S1569-2590(05)10009-3)
- Laffafian, A., & Tepass, U. (2019). Identification of genes required for apical protein trafficking in Drosophila photoreceptor cells. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400635>
- Lee, Y., Kameya, S., Cox, G. A., Hsu, J., Hicks, W., Maddatu, T. P., Smith, R. S., Naggert, J. K., Peachey, N. S., & Nishina, P. M. (2005). Ocular abnormalities in Largemyd and Largevls mice, spontaneous models for muscle, eye, and brain diseases. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 30(2), 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.07.009>
- Li, H.-O., Zhu, Y.-F., Asakawa, M., Kuma, H., Hirata, T., Ueda, Y., Lee, Y.-S., Fukumura, M., Iida, A., Kato, A., Nagai, Y., & Hasegawa, M. (2000). A Cytoplasmic RNA Vector Derived from Nontransmissible Sendai Virus with Efficient Gene Transfer and Expression. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.14.6564-6569.2000>
- Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Ravinder, N., & Chesnut, J. D. (2017). Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA. *Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.011>
- Lim, L. S., Mitchell, P., Seddon, J. M., Holz, F. G., & Wong, T. Y. (2012). Age-related macular degeneration. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60282-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60282-7)
- Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P., & Timlin, J. A. (2018). Delivering crispr: A review of the challenges and approaches. In *Drug Delivery*. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>
- Littink, K. W., Koenekoop, R. K., van den Born, L. I., Collin, R. W. J., Moruz, L., Veltman, J. A., Roosing, S., Zonneveld, M. N., Omar, A., Darvish, M., Lopez, I., Kroes, H. Y., van Genderen, M. M., Hoyng, C. B., Rohrschneider, K., van Schooneveld, M. J., Cremers, F. P. M., & den Hollander, A. I. (2010). Homozygosity mapping in patients with cone-rod dystrophy: novel mutations and clinical characterizations. *Investigative Ophthalmology &*

- Visual Science*, 51(11), 5943–5951. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5797>
- Littink, K. W., Van Den Born, L. I., Koenekoop, R. K., Collin, R. W. J., Zonneveld, M. N., Blokland, E. A. W., Khan, H., Theelen, T., Hoyng, C. B., Cremers, F. P. M., Den Hollander, A. I., & Klevering, B. J. (2010). Mutations in the EYS gene account for approximately 5% of autosomal recessive retinitis pigmentosa and cause a fairly homogeneous phenotype. *Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2010.01.040>
- Liu, G., Molas, M., Grossmann, G. A., Pasumarthy, M., Perales, J. C., Cooper, M. J., & Hanson, R. W. (2001). Biological Properties of Poly-L-lysine-DNA Complexes Generated by Cooperative Binding of the Polycation. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105250200>
- Liu, Y., Yu, M., Shang, X., Nguyen, M. H. H., Balakrishnan, S., Sager, R., & Hu, H. (2020). Eyes shut homolog (EYS) interacts with matriglycan of O-mannosyl glycans whose deficiency results in EYS mislocalization and degeneration of photoreceptors. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64752-4>
- Loh, Y. H., Agarwal, S., Park, I. H., Urbach, A., Huo, H., Heffner, G. C., Kim, K., Miller, J. D., Ng, K., & Daley, G. Q. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-204800>
- Lu, Bin, Malcuit, C., Wang, S., Girman, S., Francis, P., Lemieux, L., Lanza, R., & Lund, R. (2009). Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells*. <https://doi.org/10.1002/stem.149>
- Lu, Bo, Zhu, D., Hinton, D., Humayun, M. S., & Tai, Y. C. (2012). Mesh-supported submicron parylene-C membranes for culturing retinal pigment epithelial cells. *Biomedical Microdevices*. <https://doi.org/10.1007/s10544-012-9645-8>
- Lu, Z., Hu, X., Liu, F., Soares, D. C., Liu, X., Yu, S., Gao, M., Han, S., Qin, Y., Li, C., Jiang, T., Luo, D., Guo, A.-Y. Y., Tang, Z., & Liu, M. (2017a). Ablation of EYS in zebrafish causes mislocalisation of outer segment proteins, F-actin disruption and cone-rod dystrophy. *Scientific Reports*, 7, 46098. <https://doi.org/10.1038/srep46098>
- Lu, Z., Hu, X., Liu, F., Soares, D. C., Liu, X., Yu, S., Gao, M., Han, S., Qin, Y., Li, C., Jiang, T., Luo, D., Guo, A. Y., Tang, Z., & Liu, M. (2017b). Ablation of EYS in zebrafish causes mislocalisation of outer segment proteins, F-actin disruption and cone-rod dystrophy. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep46098>
- Lukovic, D., Castro, A. A., Delgado, A. B. G., Bernal, M. D. L. A. M., Pelaez, N. L., Lloret, A. D., Espejo, R. P., Kamenarova, K., Sánchez, L. F., Cuenca, N., Cortón, M., Fernandez, A. A., Sorkio, A., Skottman, H., Ayuso, C., Erceg, S., & Bhattacharya, S. S. (2015). Human iPSC derived disease model of MERTK-associated retinitis pigmentosa. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep12910>
- Ma, H., Marti-Gutierrez, N., Park, S. W., Wu, J., Lee, Y., Suzuki, K., Koski, A., Ji, D., Hayama, T., Ahmed, R., Darby, H., Van Dyken, C., Li, Y., Kang, E., Park, A. R., Kim, D., Kim, S. T., Gong, J., Gu, Y., ... Mitalipov, S. (2017). Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature23305>
- MacLaren, R. E., Groppe, M., Barnard, A. R., Cottrill, C. L., Tolmachova, T.,

- Seymour, L., Reed Clark, K., During, M. J., Cremers, F. P. M., Black, G. C. M., Lotery, A. J., Downes, S. M., Webster, A. R., & Seabra, M. C. (2014). Retinal gene therapy in patients with choroideremia: Initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62117-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62117-0)
- Maeder, M. L., & Gersbach, C. A. (2016). Genome-editing technologies for gene and cell therapy. In *Molecular Therapy*. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.10>
- Maguire, A. M., Simonelli, F., Pierce, E. A., Pugh, E. N., Mingozzi, F., Bennicelli, J., Banfi, S., Marshall, K. A., Testa, F., Surace, E. M., Rossi, S., Lyubarsky, A., Arruda, V. R., Konkle, B., Stone, E., Sun, J., Jacobs, J., Dell'Osso, L., Hertle, R., ... Bennett, J. (2008a). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802315>
- Maguire, A. M., Simonelli, F., Pierce, E. A., Pugh, E. N., Mingozzi, F., Bennicelli, J., Banfi, S., Marshall, K. A., Testa, F., Surace, E. M., Rossi, S., Lyubarsky, A., Arruda, V. R., Konkle, B., Stone, E., Sun, J., Jacobs, J., Dell'Osso, L., Hertle, R., ... Bennett, J. (2008b). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *New England Journal of Medicine*, 358(21), 2240–2248. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802315>
- Malik, N., & Rao, M. S. (2013). A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods in Molecular Biology*. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-348-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-348-0_3)
- Maller, J. B., Fagerness, J. A., Reynolds, R. C., Neale, B. M., Daly, M. J., & Seddon, J. M. (2007). Variation in complement factor 3 is associated with risk of age-related macular degeneration. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng2131>
- Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hiram, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., Terada, M., Nomiya, Y., Tanishima, S., Nakamura, M., Kamao, H., Sugita, S., Onishi, A., Ito, T., Fujita, K., ... Takahashi, M. (2017). Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1608368>
- Manfredi, G., Colombo, E., Barsotti, J., Benfenati, F., & Lanzani, G. (2019). Photochemistry of Organic Retinal Prostheses. *Annual Review of Physical Chemistry*. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-042018-052445>
- Martí, M., Mulero, L., Pardo, C., Morera, C., Carrió, M., Laricchia-Robbio, L., Esteban, C. R., & Belmonte, J. C. I. (2013). Characterization of pluripotent stem cells. *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.154>
- Masland, R. H. (2001). The fundamental plan of the retina. In *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn0901-877>
- Massof, R. W., & Finkelstein, D. (1981). Two forms of autosomal dominant primary retinitis pigmentosa. *Documenta Ophthalmologica*. <https://doi.org/10.1007/BF00143336>
- Maw, M. A., Corbeil, D., Koch, J., Hellwig, A., Wilson-Wheeler, J. C., Bridges, R. J., Kumaramanickavel, G., John, S., Nancarrow, D., Röper, K., Weigmann, A., Huttner, W. B., & Denton, M. J. (2000). A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration. *Human Molecular Genetics*, 9(1), 27–34. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.1.27>

- Mayer, J. E., Iatridis, J. C., Chan, D., Qureshi, S. A., Gottesman, O., & Hecht, A. C. (2013). Genetic polymorphisms associated with intervertebral disc degeneration. *Spine Journal*, *13*(3), 299–317. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2013.01.041>
- McGuigan, D. B., Heon, E., Cideciyan, A. V., Ratnapriya, R., Lu, M., Sumaroka, A., Roman, A. J., Batmanabane, V., Garafalo, A. V., Stone, E. M., Swaroop, A., & Jacobson, S. G. (2017). EYS Mutations Causing Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa: Changes of Retinal Structure and Function with Disease Progression. *Genes*, *8*(7). <https://doi.org/10.3390/genes8070178>
- Mehat, M. S., Sundaram, V., Ripamonti, C., Robson, A. G., Smith, A. J., Borooah, S., Robinson, M., Rosenthal, A. N., Innes, W., Weleber, R. G., Lee, R. W. J., Crossland, M., Rubin, G. S., Dhillon, B., Steel, D. H. W., Anglade, E., Lanza, R. P., Ali, R. R., Michaelides, M., & Bainbridge, J. W. B. (2018). Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells in Macular Degeneration. *Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2018.04.037>
- Menghini, M., Cehajic-Kapetanovic, J., & MacLaren, R. E. (2020). Monitoring progression of retinitis pigmentosa: current recommendations and recent advances. In *Expert Opinion on Orphan Drugs*. <https://doi.org/10.1080/21678707.2020.1735352>
- Messchaert, M., Dona, M., Broekman, S., Peters, T. A., Corral-Serrano, J. C., Slijkerman, R. W. N., van Wijk, E., & Collin, R. W. J. (2018). Eyes shut homolog is important for the maintenance of photoreceptor morphology and visual function in zebrafish. *PloS One*, *13*(7), e0200789. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200789>
- Miesfeld, J. B., & Brown, N. L. (2019). Eye organogenesis: A hierarchical view of ocular development. In *Current Topics in Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.12.008>
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Muñoz-Ramón, P. V., Hernández Martínez, P., & Muñoz-Negrete, F. J. (2020). New therapeutic targets in the treatment of age-related macular degeneration. *Archivos de La Sociedad Española de Oftalmología (English Edition)*, *95*(2), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.oftale.2019.09.013>
- Mustafi, D., Engel, A. H., & Palczewski, K. (2009). Structure of cone photoreceptors. In *Progress in Retinal and Eye Research*. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2009.05.003>
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., & Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt1374>
- Nakanishi, M., & Otsu, M. (2012). Development of Sendai Virus Vectors and their Potential Applications in Gene Therapy and Regenerative Medicine. *Current Gene Therapy*. <https://doi.org/10.2174/156652312802762518>
- Nakatsuji, N., Nakajima, F., & Tokunaga, K. (2008). HLA-haplotype banking and iPS cells. In *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt0708-739>
- Nie, J., Mahato, S., Mustill, W., Tipping, C., Bhattacharya, S. S., & Zelhof, A. C.

- (2012). Cross species analysis of Prominin reveals a conserved cellular role in invertebrate and vertebrate photoreceptor cells. *Developmental Biology*, 371(2), 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.08.024>
- Nilsson, S. E. G., Sundelin, S. P., Wihlmark, U., & Brunk, U. T. (2003). Aging of cultured retinal pigment epithelial cells: Oxidative reactions, lipofuscin formation and blue light damage. *Documenta Ophthalmologica*. <https://doi.org/10.1023/A:1022419606629>
- Niwa, H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? In *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.02787>
- Novelli, G., & Gruenert, D. C. (2002). Genome Medicine: Gene Therapy for the Millennium. *Pharmacogenomics*, 3(1), 15–18. <https://doi.org/10.1517/14622416.3.1.15>
- O'Neill, H. C., Limnios, I. J., & Barnett, N. L. (2019). Advancing a Stem Cell Therapy for Age-Related Macular Degeneration. *Current Stem Cell Research & Therapy*. <https://doi.org/10.2174/1574888x15666191218094020>
- Ochakovski, G. A., Ulrich Bartz-Schmidt, K., & Fischer, M. D. (2017). Retinal gene therapy: Surgical vector delivery in the translation to clinical trials. In *Frontiers in Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00174>
- Ogino, K., Oishi, A., Oishi, M., Gotoh, N., Morooka, S., Sugahara, M., Hasegawa, T., Miyata, M., & Yoshimura, N. (2016). Efficacy of Column Scatter Plots for Presenting Retinitis Pigmentosa Phenotypes in a Japanese Cohort. *Translational Vision Science & Technology*, 5(2), 4. <https://doi.org/10.1167/tvst.5.2.4>
- Oishi, M., Oishi, A., Gotoh, N., Ogino, K., Higasa, K., Iida, K., Makiyama, Y., Morooka, S., Matsuda, F., & Yoshimura, N. (2014). Comprehensive molecular diagnosis of a large cohort of Japanese retinitis pigmentosa and Usher syndrome patients by next-generation sequencing. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(11), 7369–7375. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-15458>
- Omori, Y., Araki, F., Chaya, T., Kajimura, N., Irie, S., Terada, K., Muranishi, Y., Tsujii, T., Ueno, S., Koyasu, T., Tamaki, Y., Kondo, M., Amano, S., & Furukawa, T. (2012). Presynaptic dystroglycan-pikachurin complex regulates the proper synaptic connection between retinal photoreceptor and bipolar cells. *Journal of Neuroscience*, 32(18), 6126–6137. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0322-12.2012>
- Özmert, E., & Arslan, U. (2019). Retinal prostheses and artificial vision. *Turkish Journal of Ophthalmology*. <https://doi.org/10.4274/tjo.galenos.2019.44270>
- Peng, H., Ali, A., Daggett, D., Rauvala, H., Hassell, J., & Smalheiser, N. (1998). *The relationship between perlecan and dystroglycan and its implication in the formation of the neuromuscular junction*. 5(6), 475–489.
- Pensado, A., Diaz-Corrales, F. J., De la Cerda, B., Valdés-Sánchez, L., del Boz, A. A., Rodriguez-Martinez, D., García-Delgado, A. B., Seijo, B., Bhattacharya, S. S., & Sanchez, A. (2016). Span poly-L-arginine nanoparticles are efficient non-viral vectors for PRPF31 gene delivery: An approach of gene therapy to treat retinitis pigmentosa. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.06.007>
- Pera, M. F., & Tam, P. P. L. (2010). Extrinsic regulation of pluripotent stem cells. In *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature09228>



- Pieras, J. I., Barragán, I., Borrego, S., Audo, I., González-Del Pozo, M., Bernal, S., Baiget, M., Zeitz, C., Bhattacharya, S. S., & Antiñolo, G. (2011). Copy-number variations in EYS: a significant event in the appearance of arRP. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *52*(8), 5625–5631. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7292>
- Pierrache, L. H. M. M., Messchaert, M., Thiadens, A. A. H. J. H. J., Haer-Wigman, L., de Jong-Hesse, Y., van Zelst-Stams, W. A. G. G., Collin, R. W. J. J., Klaver, C. C. W. W., & van den Born, L. I. (2019). Extending the spectrum of EYS-associated retinal disease to macular dystrophy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *60*(6), 2049–2063. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-25531>
- Priya, R. R., Chew, E. Y., & Swaroop, A. (2012). Genetic studies of age-related macular degeneration: Lessons, challenges, and opportunities for disease management. *Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.06.042>
- Ramaswamy, C., Sakthivel, T., Wilderspin, A. F., & Florence, A. T. (2003). Dendriplexes and their characterisation. *International Journal of Pharmaceutics*. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00670-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00670-1)
- Rapaport, D. H., Fletcher, J. T., LaVail, M. M., & Rakic, P. (1992). Genesis of neurons in the retinal ganglion cell layer of the monkey. *Journal of Comparative Neurology*. <https://doi.org/10.1002/cne.903220411>
- Richardson, R., Tracey-White, D., Webster, A., & Moosajee, M. (2017). The zebrafish eye-a paradigm for investigating human ocular genetics. In *Eye (Basingstoke)*. <https://doi.org/10.1038/eye.2016.198>
- Rico-Sánchez, L., Garzón, I., González-Andrades, M., Ruíz-García, A., Punzano, M., Lizana-Moreno, A., Muñoz-Ávila, J. I., Sánchez-Quevedo, M. del C., Martínez-Atienza, J., Lopez-Navas, L., Sanchez-Pernaute, R., Oruezabal, R. I., Medialdea, S., Gonzalez-Gallardo, M. del C., Carmona, G., Sanbonmatsu-Gámez, S., Perez, M., Jimenez, P., Cuende, N., ... Alaminos, M. (2019). Successful development and clinical translation of a novel anterior lamellar artificial cornea. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. <https://doi.org/10.1002/term.2951>
- Riesenberg, S., Chintalapati, M., Macak, D., Kanis, P., Maricic, T., & Pääbo, S. (2019). Simultaneous precise editing of multiple genes in human cells. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz669>
- Robbins, P. D., & Ghivizzani, S. C. (1998). Viral vectors for gene therapy. In *Pharmacology and Therapeutics*. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(98\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(98)00020-5)
- Rony, I. K., Baten, A., Bloomfield, J. A., Islam, M. E., Billah, M. M., & Islam, K. D. (2015). Inducing pluripotency in vitro: Recent advances and highlights in induced pluripotent stem cells generation and pluripotency reprogramming. In *Cell Proliferation*. <https://doi.org/10.1111/cpr.12162>
- Roorda, A., Metha, A. B., Lennie, P., & Williams, D. R. (2001). Packing arrangement of the three cone classes in primate retina. *Vision Research*. [https://doi.org/10.1016/S0042-6989\(01\)00043-8](https://doi.org/10.1016/S0042-6989(01)00043-8)
- Ruiz Castellanos, M., & Sangro, B. (2005). Terapia génica: ¿Qué es y para qué sirve? *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, *28*(1), 17–27. <https://doi.org/10.4321/s1137-66272005000100002>
- Russell, S., Bennett, J., Wellman, J. A., Chung, D. C., Yu, Z. F., Tillman, A., Wittes, J., Pappas, J., Elci, O., McCague, S., Cross, D., Marshall, K. A., Walshire, J., Kehoe, T. L., Reichert, H., Davis, M., Raffini, L., George, L. A.,

- Hudson, F. P., ... Maguire, A. M. (2017). Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31868-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31868-8)
- Sadler, T. . (2016). Embriología Médica de Lagman. In *Wolters Kluwer*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Sancho-Pelluz, J., Arango-Gonzalez, B., Kustermann, S., Romero, F. J., Van Veen, T., Zrenner, E., Ekström, P., & Paquet-Durand, F. (2008). Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. In *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-008-8045-9>
- Sandberg, M. A., Weigel-DiFranco, C., Rosner, B., & Berson, E. L. (1996). The relationship between visual field size and electroretinogram amplitude in retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.
- Sangermano, R., Scott, H., Wagner, N., Place, E., & Bujakowska, K. M. (2020). Genetic testing of various eye disorders. *Genetics and Genomics of Eye Disease*, 239–258. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816222-4.00014-9>
- Sanjana, N. E., Cong, L., Zhou, Y., Cunniff, M. M., Feng, G., & Zhang, F. (2012). A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.431>
- Sato, S., Omori, Y., Katoh, K., Kondo, M., Kanagawa, M., Miyata, K., Funabiki, K., Koyasu, T., Kajimura, N., Miyoshi, T., Sawai, H., Kobayashi, K., Tani, A., Toda, T., Usukura, J., Tano, Y., Fujikado, T., & Furukawa, T. (2008). Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nature Neuroscience*, 11(8), 923–931.
- Satz, J. S., Philp, A. R., Nguyen, H., Kusano, H., Lee, J., Turk, R., Riker, M. J., Hernández, J., Weiss, R. M., Anderson, M. G., Mullins, R. F., Moore, S. A., Stone, E. M., & Campbell, K. P. (2009). Visual impairment in the absence of dystroglycan. *Journal of Neuroscience*, 29(42), 13136–13146. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0474-09.2009>
- Schachat, Andrew P., MD; Sadda, SriniVas R., MD; Hinton, David R., MD; Wilkinson, C.P., MD; Wiedemann, Peter, M. (2017). Ryan's Retina. In *Ryans Retina*.
- Schietroma, C., Parain, K., Estivalet, A., Aghaie, A., de Monvel, J. B., Picaud, S., Sahel, J. A., Perron, M., El-Amraoui, A., & Petit, C. (2017). Usher syndrome type 1-associated cadherins shape the photoreceptor outer segment. *Journal of Cell Biology*, 216(6), 1849–1864. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612030>
- Schlaeger, T. M., Daheron, L., Brickler, T. R., Entwisle, S., Chan, K., Cianci, A., DeVine, A., Ettenger, A., Fitzgerald, K., Godfrey, M., Gupta, D., McPherson, J., Malwadkar, P., Gupta, M., Bell, B., Doi, A., Jung, N., Li, X., Lynes, M. S., ... Daley, G. Q. (2015). A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.3070>
- Scholl, H. P. N., Strauss, R. W., Singh, M. S., Dalkara, D., Roska, B., Picaud, S., & Sahel, J. A. (2016). Emerging therapies for inherited retinal degeneration. In *Science Translational Medicine*. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf2838>
- Schwartz, S. D., Hubschman, J. P., Heilwell, G., Franco-Cardenas, V., Pan, C. K., Ostrick, R. M., Mickunas, E., Gay, R., Klimanskaya, I., & Lanza, R. (2012). Embryonic stem cell trials for macular degeneration: A preliminary

- report. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60028-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60028-2)
- Schwartz, S. D., Regillo, C. D., Lam, B. L., Eliott, D., Rosenfeld, P. J., Gregori, N. Z., Hubschman, J. P., Davis, J. L., Heilwell, G., Spirn, M., Maguire, J., Gay, R., Bateman, J., Ostrick, R. M., Morris, D., Vincent, M., Anglade, E., Del Priore, L. V., & Lanza, R. (2015). Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: Follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61376-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61376-3)
- Schwartz, S. D., Tan, G., Hosseini, H., & Nagiel, A. (2016). Subretinal transplantation of embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium for the treatment of macular degeneration: An assessment at 4 years. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-18681>
- Scotton, P., Bleckmann, D., Stebler, M., Sciandra, F., Brancaccio, A., Meier, T., Stetefeld, J., & Ruegg, M. A. (2006). Activation of muscle-specific receptor tyrosine kinase and binding to dystroglycan are regulated by alternative mRNA splicing of agrin. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(48), 36835–36845. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607887200>
- Seki, T., Yuasa, S., Oda, M., Egashira, T., Yae, K., Kusumoto, D., Nakata, H., Tohyama, S., Hashimoto, H., Kodaira, M., Okada, Y., Seimiya, H., Fusaki, N., Hasegawa, M., & Fukuda, K. (2010). Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating t cells. In *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.003>
- Sengillo, J. D., Justus, S., Tsai, Y. T., Cabral, T., & Tsang, S. H. (2016). Gene and cell-based therapies for inherited retinal disorders: An update. *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics*. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31534>
- Sengillo, J. D., Lee, W., Nagasaki, T., Schuerch, K., Yannuzzi, L. A., Freund, K. B., Sparrow, J. R., Allikmets, R., & Tsang, S. H. (2018). A Distinct Phenotype of Eyes Shut Homolog (EYS)-Retinitis Pigmentosa Is Associated With Variants Near the C-Terminus. *American Journal of Ophthalmology*, *190*, 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2018.03.008>
- Sharma, U., Pal, D., & Prasad, R. (2014). Alkaline phosphatase: An overview. In *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0408-y>
- Shevde, N. K., & Mael, A. A. (2012). Techniques in Embryoid Body Formation from Human Pluripotent Stem Cells. In C. D. Helgason & C. L. Miller (Eds.), *Basic Cell Culture Protocols* (Vol. 946). Humana Press, Totowa, NJ. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-128-8\\_33](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-128-8_33)
- Shintani, K., Shechtman, D. L., & Gurwood, A. S. (2009). Review and update: Current treatment trends for patients with retinitis pigmentosa. *Optometry*. <https://doi.org/10.1016/j.optm.2008.01.026>
- Singh, R., Cuzzani, O., Binette, F., Sternberg, H., West, M. D., & Nasonkin, I. O. (2018). Pluripotent Stem Cells for Retinal Tissue Engineering: Current Status and Future Prospects. In *Stem Cell Reviews and Reports*. <https://doi.org/10.1007/s12015-018-9802-4>
- Skottman, H., & Hovatta, O. (2006). Culture conditions for human embryonic stem cells. In *Reproduction*. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01079>
- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. In

- Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2004>
- Stronks, H. C., Barry, M. P., & Dagnelie, G. (2016). Electrically evoked electroretinograms and pupil responses in Argus II retinal implant wearers. *Documenta Ophthalmologica*. <https://doi.org/10.1007/s10633-015-9522-x>
- Sugita, S., Mandai, M., Hiram, Y., Takagi, S., Maeda, T., Fujihara, M., Matsuzaki, M., Yamamoto, M., Iseki, K., Hayashi, N., Hono, A., Fujino, S., Koide, N., Sakai, N., Shibata, Y., Terada, M., Nishida, M., Dohi, H., Nomura, M., ... Takahashi, M. (2020). HLA-Matched Allogeneic iPS Cells-Derived RPE Transplantation for Macular Degeneration. *Journal of Clinical Medicine*, 9(7), 2217. <https://doi.org/10.3390/jcm9072217>
- Sun, N., Panetta, N. J., Gupta, D. M., Wilson, K. D., Lee, A., Jia, F., Hu, S., Cherry, A. M., Robbins, R. C., Longaker, M. T., & Wu, J. C. (2009). Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908450106>
- Sundaramurthi, H., Moran, A., Perpetuini, A. C., Reynolds, A., & Kennedy, B. (2019). Emerging Drug Therapies for Inherited Retinal Dystrophies. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-27378-1\\_43](https://doi.org/10.1007/978-3-030-27378-1_43)
- Sung, C. H., & Chuang, J. Z. (2010). The cell biology of vision. In *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006020>
- Suzuki, K., Tsunekawa, Y., Hernandez-Benitez, R., Wu, J., Zhu, J., Kim, E. J., Hatanaka, F., Yamamoto, M., Araoka, T., Li, Z., Kurita, M., Hishida, T., Li, M., Aizawa, E., Guo, S., Chen, S., Goebel, A., Soligalla, R. D., Qu, J., ... Belmonte, J. C. I. (2016). In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature20565>
- Takagi, S., Mandai, M., Gocho, K., Hiram, Y., Yamamoto, M., Fujihara, M., Sugita, S., Kurimoto, Y., & Takahashi, M. (2019). Evaluation of Transplanted Autologous Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium in Exudative Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology Retina*. <https://doi.org/10.1016/j.oret.2019.04.021>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takeuchi, H. (2015). Significance of O-glycosylation in Notch signaling. *Seikagaku*, 87(4), 459–462. <https://doi.org/10.14952/SEIKAGAKU.2015.870459>
- Takeuchi, H., Kantharia, J., Sethi, M. K., Bakker, H., & Haltiwanger, R. S. (2012). Site-specific O-glucosylation of the epidermal growth factor-like (EGF) repeats of notch: Efficiency of glycosylation is affected by proper folding and amino acid sequence of individual EGF repeats. *Journal of Biological Chemistry*, 287(41), 33934–33944. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401315>
- Takita, S., Miyamoto-Matsui, K., & Seko, Y. (2019). Intra- and interspecies comparison of EYS transcripts highlights its characteristics in the eye.

- FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(8), 9422–9433.  
<https://doi.org/10.1096/fj.201900056RR>
- Tang, Z.-H., Chen, J.-R., Zheng, J., Shi, H.-S., Ding, J., Qian, X.-D., Zhang, C., Chen, J.-L., Wang, C.-C., Li, L., Chen, J.-Z., Yin, S.-K., Huang, T.-S., Chen, P., Guan, M.-X., & Wang, J.-F. (2016). Genetic Correction of Induced Pluripotent Stem Cells From a Deaf Patient With MYO7A Mutation Results in Morphologic and Functional Recovery of the Derived Hair Cell-Like Cells. *STEM CELLS Translational Medicine*. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0252>
- ten Berge, D., Koole, W., Fuerer, C., Fish, M., Eroglu, E., & Nusse, R. (2008). Wnt Signaling Mediates Self-Organization and Axis Formation in Embryoid Bodies. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.09.013>
- Thiadens, A. A. H. J., & Klaver, C. C. W. (2010). Genetic testing and clinical characterization of patients with cone-rod dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(12), 6904–6905; author reply 6905. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6145>
- Thomson, J. A. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Tokarz, P., Kaarniranta, K., & Blasiak, J. (2013). Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). In *Biogerontology*. <https://doi.org/10.1007/s10522-013-9463-2>
- Toomey, C. B., Johnson, L. V., & Bowes Rickman, C. (2018). Complement factor H in AMD: Bridging genetic associations and pathobiology. In *Progress in Retinal and Eye Research*. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.09.001>
- Torres-Ruiz, R., Martínez-Lage, M., Martín, M. C., García, A., Bueno, C., Castaño, J., Ramírez, J. C., Menéndez, P., Cigudosa, J. C., & Rodríguez-Perales, S. (2017). Efficient Recreation of t(11;22) EWSR1-FLI1+ in Human Stem Cells Using CRISPR/Cas9. *Stem Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.04.014>
- Trapani, I., Puppo, A., & Auricchio, A. (2014). Vector platforms for gene therapy of inherited retinopathies. In *Progress in Retinal and Eye Research*. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.08.001>
- Tye, K. M., & Deisseroth, K. (2012). Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. In *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn3171>
- Udagawa, C., Nakamura, H., Ohnishi, H., Tamura, K., Shimoi, T., Yoshida, M., Yoshida, T., Totoki, Y., Shibata, T., & Zembutsu, H. (2018). Whole exome sequencing to identify genetic markers for trastuzumab-induced cardiotoxicity. *Cancer Science*, 109(2), 446–452. <https://doi.org/10.1111/cas.13471>
- Vaajasaari, H., Ilmarinen, T., Juuti-Uusitalo, K., Rajala, K., Onnela, N., Narkilahti, S., Suuronen, R., Hyttinen, J., Uusitalo, H., & Skottman, H. (2011). Toward the defined and xeno-free differentiation of functional human pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelial cells. *Molecular Vision*.
- Valdés-Sánchez, L., García-Delgado, A. B., Montero-Sánchez, A., de la Cerda, B., Lucas, R., Peñalver, P., Morales, J. C., Bhattacharya, S. S., & Díaz-

- Corrales, F. J. (2019). The Resveratrol Prodrug JC19 Delays Retinal Degeneration in rd10 Mice. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-27378-1\\_75](https://doi.org/10.1007/978-3-030-27378-1_75)
- Verbakel, S. K., van Huet, R. A. C., Boon, C. J. F., den Hollander, A. I., Collin, R. W. J., Klaver, C. C. W., Hoyng, C. B., Roepman, R., & Klevering, B. J. (2018). Non-syndromic retinitis pigmentosa. In *Progress in Retinal and Eye Research*. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.03.005>
- Vitillo, L., Tovell, V. E., & Coffey, P. (2020). Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium. *Current Eye Research*, 45(3: Ocular Regeneration). <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/02713683.2019.1691237>
- Wagner, K., & Welch, D. (2010). Feeder-free adaptation, culture and passaging of human IPS cells using complete knockout serum replacement feeder-free medium. *Journal of Visualized Experiments*. <https://doi.org/10.3791/2236>
- Wang, D. Y., Chan, W. M., Tam, P. O. S., Baum, L., Lam, D. S. C., Chong, K. K. L., Fan, B. J., & Pang, C. P. (2005). Gene mutations in retinitis pigmentosa and their clinical implications. In *Clinica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.08.004>
- Wang, H., Tian, Y., Wang, J., Phillips, K. L. E., Binch, A. L. A., Dunn, S., Cross, A., Chiverton, N., Zheng, Z., Shapiro, I. M., Le Maitre, C. L., & Risbud, M. V. (2013). Inflammatory cytokines induce NOTCH signaling in nucleus pulposus cells: Implications in intervertebral disc degeneration. *Journal of Biological Chemistry*, 288(23), 16761–16774. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.446633>
- Wang, N. H. H., Chen, S. J., Yang, C. F., Chen, H. W., Chuang, H. P., Lu, Y. H., Chen, C. H., Wu, J. Y., Niu, D. M., & Chen, Y. T. (2016). Homozygosity mapping and whole-genome sequencing links a missense mutation in POMGNT1 to autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57(8), 3601–3609. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19463>
- Wasungu, L., & Hoekstra, D. (2006). Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *Journal of Controlled Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.06.024>
- Weismann, A., Parker, W. N., & Ronnfeldt, H. (1894). The Germ-Plasm: A Theory of Heredity. *The Journal of the Anthropological Institute of Great Britain and Ireland*. <https://doi.org/10.2307/2842101>
- West, E. L., Ribeiro, J., & Robin, A. R. (2019). Development of Stem Cell Therapies for Retinal Degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.
- White, C. E., & Olabisi, R. M. (2017). Scaffolds for retinal pigment epithelial cell transplantation in age-related macular degeneration. In *Journal of Tissue Engineering*. <https://doi.org/10.1177/2041731417720841>
- Wiedemann, P. (2013). Stephen J. Ryan. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1007/s00417-013-2386-4>
- Witkovsky, P., Zhang, J., & Blam, O. (1994). Dopaminergic neurons in the retina of *Xenopus laevis*: amacrine vs. interplexiform subtypes and relation to bipolar cells. *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/BF00305777>
- Wong, R. O. L. (2006). Introduction – from eye field to eyesight. In *Retinal Development*. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511541629.003>

- Wong, W. L., Su, X., Li, X., Cheung, C. M. G., Klein, R., Cheng, C. Y., & Wong, T. Y. (2014). Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(13\)70145-1](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70145-1)
- Wood, E. H., Tang, P. H., De la Huerta, I., Korot, E., Muscat, S., Palanker, D. A., & Williams, G. A. (2019). STEM CELL THERAPIES, GENE-BASED THERAPIES, OPTOGENETICS, AND RETINAL PROSTHETICS: Current State and Implications for the Future. *Retina (Philadelphia, Pa.)*. <https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000002449>
- Wright, A. F., Chakarova, C. F., Abd El-Aziz, M. M., & Bhattacharya, S. S. (2010). Photoreceptor degeneration: Genetic and mechanistic dissection of a complex trait. In *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg2717>
- Wu, S. M., & Hochedlinger, K. (2011). Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. In *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb0511-497>
- Wu, W. H., Tsai, Y. T., Justus, S., Lee, T. T., Zhang, L., Lin, C. S., Bassuk, A. G., Mahajan, V. B., & Tsang, S. H. (2016). CRISPR Repair Reveals Causative Mutation in a Preclinical Model of Retinitis Pigmentosa. *Molecular Therapy*. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.107>
- Xu, M., Yamada, T., Sun, Z., Eblimit, A., Lopez, I., Wang, F., Manya, H., Xu, S., Zhao, L., Li, Y., Kimchi, A., Sharon, D., Sui, R., Endo, T., Koenekoop, R. K., & Chen, R. (2016). Mutations in POMGNT1 cause non-syndromic retinitis pigmentosa. *Human Molecular Genetics*, 25(8), 1479–1488. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw022>
- Yang, H., Wang, H., Shivalila, C. S., Cheng, A. W., Shi, L., & Jaenisch, R. (2013). XOne-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.022>
- Yang, Z., Chen, Y., Lillo, C., Chien, J., Yu, Z., Michaelides, M., Klein, M., Howes, K. A., Li, Y., Kaminoh, Y., Chen, H., Zhao, C., Chen, Y., Al-Sheikh, Y. T., Karan, G., Corbeil, D., Escher, P., Kamaya, S., Li, C., ... Zhang, K. (2008). Mutant prominin 1 found in patients with macular degeneration disrupts photoreceptor disk morphogenesis in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 118(8), 2908–2916. <https://doi.org/10.1172/JCI35891>
- Yates, J. R. W., Sepp, T., Matharu, B. K., Khan, J. C., Thurlby, D. A., Shahid, H., Clayton, D. G., Hayward, C., Morgan, J., Wright, A. F., Armbrecht, A. M., Dhillon, B., Deary, I. J., Redmond, E., Bird, A. C., & Moore, A. T. (2007). Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa072618>
- Ye, L., Chang, J. C., Lin, C., Sun, X., Yu, J., & Kan, Y. W. (2009). Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904689106>
- Yin, H., Xue, W., Chen, S., Bogorad, R. L., Benedetti, E., Grompe, M., Koteliansky, V., Sharp, P. A., Jacks, T., & Anderson, D. G. (2014). Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype.

- Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.2884>
- Yu, J., & Thomson, J. A. (2008). Pluripotent stem cell lines. In *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1689808>
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1151526>
- Yu, M., Liu, Y., Li, J., Natale, B. N., Cao, S., Wang, D., Amack, J. D., & Hu, H. (2016a). Eyes shut homolog is required for maintaining the ciliary pocket and survival of photoreceptors in zebrafish. *Biology Open*, 5(11), 1662–1673. <https://doi.org/10.1242/bio.021584>
- Yu, M., Liu, Y., Li, J., Natale, B. N., Cao, S., Wang, D., Amack, J. D., & Hu, H. (2016b). Eyes shut homolog is required for maintaining the ciliary pocket and survival of photoreceptors in zebrafish. *Biology Open*. <https://doi.org/10.1242/bio.021584>
- Yu, W., Mookherjee, S., Chaitankar, V., Hiriyanna, S., Kim, J. W., Brooks, M., Ataeijannati, Y., Sun, X., Dong, L., Li, T., Swaroop, A., & Wu, Z. (2017). Nrl knockdown by AAV-delivered CRISPR/Cas9 prevents retinal degeneration in mice. *Nature Communications*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/ncomms14716>
- Zarbin, M. (2016). Cell-based therapy for degenerative retinal disease. In *Trends in Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.12.007>
- Zarbin, M. A. (2004). Current Concepts in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration. In *Archives of Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1001/archophth.122.4.598>
- Zarbin, M., Sugino, I., & Townes-Anderson, E. (2019). Concise Review: Update on Retinal Pigment Epithelium Transplantation for Age-Related Macular Degeneration. *Stem Cells Translational Medicine*. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0282>
- Zelhof, A. C., Hardy, R. W., Becker, A., & Zuker, C. S. (2006). Transforming the architecture of compound eyes. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature05128>
- Zhang, C., Yadava, P., & Hughes, J. (2004). Polyethylenimine strategies for plasmid delivery to brain-derived cells. *Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2003.11.004>
- Zhang, M., Jiang, N., Chu, Y., Postnikova, O., Varghese, R., Horvath, A., Cheema, A. K., & Golestaneh, N. (2020). Dysregulated metabolic pathways in age-related macular degeneration. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59244-4>
- Zhang, Q., Zulfiqar, F., Xiao, X., Riazuddin, S. A., Ahmad, Z., Caruso, R., MacDonald, I., Sieving, P., Riazuddin, S. A., & Hejtmancik, J. F. (2007). Severe retinitis pigmentosa mapped to 4p15 and associated with a novel mutation in the PROM1 gene. *Human Genetics*, 122(3–4), 293–299. <https://doi.org/10.1007/s00439-007-0395-2>
- Zhao, J., Jiang, W. J., Sun, C., Hou, C. Z., Yang, X. M., & Gao, J. G. (2013). Induced pluripotent stem cells: Origins, applications, and future perspectives. In *Journal of Zhejiang University: Science B*. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1300215>
- Zhao, T., Zhang, Z. N., Rong, Z., & Xu, Y. (2011). Immunogenicity of induced



- pluripotent stem cells. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature10135>
- Zhou, P., & Li, X.-X. (2014). Role of genetic factors in the pathogenesis of exudative age-related macular degeneration. *Taiwan Journal of Ophthalmology*, 4(4), 152–155.
- Zuo, E., Cai, Y. J., Li, K., Wei, Y., Wang, B. A., Sun, Y., Liu, Z., Liu, J., Hu, X., Wei, W., Huo, X., Shi, L., Tang, C., Liang, D., Wang, Y., Nie, Y. H., Zhang, C. C., Yao, X., Wang, X., ... Yang, H. (2017). One-step generation of complete gene knockout mice and monkeys by CRISPR/Cas9-mediated gene editing with multiple sgRNAs. *Cell Research*. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.81>



