



# NUEVAS TERAPIAS PARA LA NEUROPATÍA ÓPTICA HEREDITARIA DE LEBER

FACULTAD DE FARMACIA

Paula Carla Lora Domínguez





# NUEVAS TERAPIAS PARA LA NEUROPATÍA ÓPTICA HEREDITARIA DE LEBER

Revisión bibliográfica

ALUMNA: PAULA CARLA LORA DOMÍNGUEZ

TUTORA: MONTSERRAT ARGANDOÑA BERTRÁN.

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

Sevilla, a 5 de Julio de 2016

# 1.- ÍNDICE

<b>2.- RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>3.- OBJETIVOS DE LA REVISIÓN .....</b>	<b>4</b>
<b>4.- METODOLOGÍA PARA REALIZAR LA BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
<b>5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>4</b>
<b>5.1.- ¿QUÉ SON LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES? .....</b>	<b>4</b>
<b>5.2.- LA MITOCONDRIA .....</b>	<b>5</b>
<b>5.3.- NEUROPATÍA ÓPTICA HEREDITARIA DE LEBER .....</b>	<b>7</b>
<b>5.3.1.- Etiología .....</b>	<b>7</b>
<b>5.3.2.- Prevalencia .....</b>	<b>10</b>
<b>5.3.3.- Características clínicas (cuadro clínico) .....</b>	<b>11</b>
<b>5.3.3.1.- Fase aguda .....</b>	<b>11</b>
<b>5.3.3.2.- Fase crónica .....</b>	<b>11</b>
<b>5.3.3.3.- LHON plus .....</b>	<b>11</b>
<b>5.3.5.- Pronóstico.....</b>	<b>12</b>
<b>5.4.- OPCIONES TERAPÉUTICAS.....</b>	<b>12</b>
<b>5.4.1.- TERAPIA CLÁSICA – métodos físicos .....</b>	<b>13</b>
5.4.1.1.- Oxígeno hiperbárico .....	13
5.4.1.2.- Infrarrojo cercano.....	14
<b>5.4.2.- TERAPIA CLÁSICA – métodos farmacológicos .....</b>	<b>14</b>
5.4.2.1.- Activadores farmacológicos de la biogénesis mitocondrial .....	14
5.4.2.2.- Corticoesteroides .....	15
5.4.2.3.- Ciclosporina A.....	15
5.4.2.4.- Brimonidina.....	15
5.4.2.5.- Análogos de ubiquinona. Idebenona. EPI-743.....	16
<b>5.4.3.- TERAPIA CLÁSICA – otros métodos .....</b>	<b>17</b>
5.4.3.1.- Cóctel mitocondrial: suplemento dietético.....	17
<b>5.4.4.- TERAPIA GÉNICA.....</b>	<b>17</b>

5.4.4.1.- Plásmidos y cromosomas artificiales .....	18
5.4.4.2- Sistemas de transferencia genética .....	19
5.4.4.3.- Sistemas de transferencia no virales .....	19
5.4.4.4.- Vectores virales .....	20
5.4.4.4.1.- Vectores retrovirales (RV).....	20
5.4.4.4.2.- Vectores lentivirales (LV) .....	21
5.4.4.4.3.- Vectores adenovirales (AV).....	21
5.4.4.4.4.- Vectores virales adenoasociados (AAV).....	21
<b>5.4.4.1.- Terapia génica y LHON .....</b>	<b>22</b>
<b>5.4.5.- TERAPIA AVANZADA- terapia celular: células madre .....</b>	<b>23</b>
<b>5.4.6.- TERAPIA PREVENTIVA - Prevención de la transmisión de la línea germinal .....</b>	<b>24</b>
<b>6.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>25</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>25</b>

## 2.- RESUMEN

La neuropatía óptica hereditaria de Leber es una enfermedad rara ligada al ADN mitocondrial, de manera que es transmitida verticalmente de madres a hijos. Usualmente, son las mujeres quienes portan la enfermedad, siendo los hombres quienes la padecen, normalmente estableciéndose en la segunda o tercera década de vida.

Se trata de una mutación a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial. Dependiendo de la mutación que se produzca, se verá afectada una u otra subunidad del complejo I. Independientemente del tipo de mutación, el resultado es el mismo: se ve afectado el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria, ya que los electrones no pueden fluir desde el complejo I hasta los complejos sucesivos, de manera que se disminuye la síntesis de ATP y aumenta la concentración de radicales libres, lo cual provoca una peroxidación lipídica a nivel de las células ganglionares de la retina. El resultado, una pérdida de la visión central bilateral, inicialmente a nivel de un solo ojo, pero que puede evolucionar hasta afectar a ambos ojos.

Se han estudiado distintas estrategias terapéuticas a lo largo de los años: desde fármacos análogos de la CoQ10 que corrijan ese defecto en la cadena respiratoria, hasta tratamientos sintomáticos mediante modificación de la dieta, pero ninguno de ellos ha resultado eficaz. En la última década se han venido estudiando distintas estrategias terapéuticas basándose en la terapia génica, terapia celular y modificación de la línea germinal: conociendo exactamente el

gen que se muta en esta enfermedad, se pueden diseñar vectores virales o no virales, o trasplantar células madre, que porten un gen silvestre que corrija dicha mutación e impedir que la enfermedad llegue a término o ralentizar su evolución.

Palabras clave: neuropatía óptica hereditaria de Leber, brimonidina, análogos de ubiquinona, terapia génica, células madre.

### **3.- OBJETIVOS DE LA REVISIÓN**

En este trabajo se pretende recoger la situación actual de la neuropatía óptica hereditaria de Leber, recopilando toda la información que exista sobre las distintas estrategias terapéuticas, ya sean fallidas o acertadas, que se han venido utilizando hasta la fecha, y describir el papel que juega la terapia génica en el tratamiento y/o prevención de esta enfermedad, ya que está resultando ser una estrategia prometedora que podría resultar esperanzadora para los pacientes de LHON.

### **4.- METODOLOGÍA PARA REALIZAR LA BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA**

Para la redacción de este trabajo, se han buscado distintos artículos científicos en las bases de datos Pubmed, Scopus y Mendeley. No se han filtrado resultados ni por año ni por autores, sino que la selección se ha hecho bajo criterio del alumno. Una vez obtenidos los textos más interesantes en dichas bases de datos, se han utilizado otros textos citados en la bibliografía de esos artículos para completar información u obtener otros datos relevantes para este trabajo. También se ha recurrido a libros físicos y textos electrónicos, así como a varias monografías de medicamentos. Para ello ha sido de gran utilidad la bibliografía de algunas asignaturas impartidas en el Grado, en especial de Fisiología Humana y Biotecnología Farmacéutica.

Con toda la información recopilada, se ha procedido a escoger la información que más se ajustaba a la temática del trabajo y a sintetizar dicha información.

### **5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **5.1.- ¿QUÉ SON LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES?**

Las enfermedades mitocondriales son un grupo heterogéneo de patologías cuyo rasgo común es una disfunción de la cadena respiratoria, y que puede ser debido a una mutación del ADN mitocondrial o del ADN nuclear. Mientras que algunos de estos desórdenes solamente afectan a un órgano, hay otros que afectan a varios de ellos, incluso pueden producir algunos trastornos neurológicos y miopáticos.

El diagnóstico es sencillo: con una simple extracción de sangre se puede realizar un test de genética molecular e identificar las variaciones patológicas en el ADN mitocondrial del paciente.

## 5.2.- LA MITOCONDRIA

La mitocondria es el orgánulo encargado de proporcionar energía a la célula. Consta de una membrana externa lisa y semipermeable a moléculas de pequeño tamaño, y de una membrana interna aún menos permeable que la anterior en forma de pliegues, separadas ambas membranas por el espacio intermembrana (figura 1). En la matriz se realizan muchas rutas metabólicas esenciales para un funcionamiento celular correcto, como son el ciclo de Krebs, la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, esteroides y aminoácidos y la síntesis de pirimidinas (Yu-Wai-Man y col., 2011).

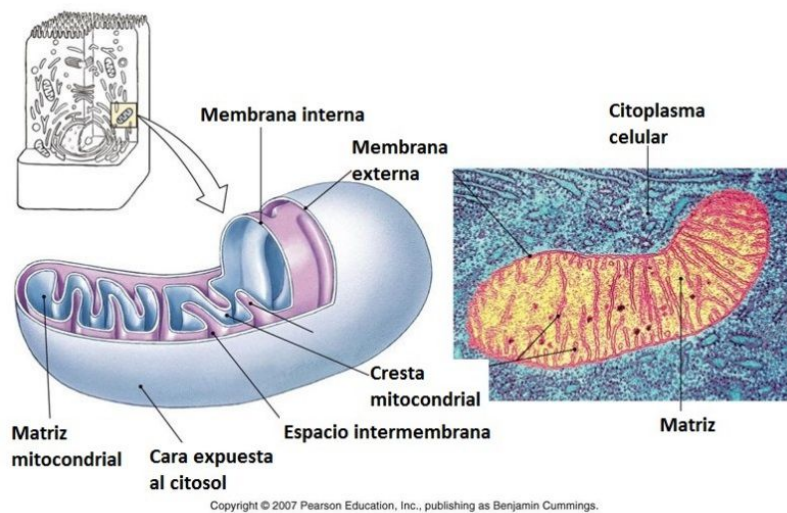


Figura 1 Estructura de la mitocondria (Silverthorn, 4ª ed.)

La mitocondria es el único orgánulo que contiene genoma. Consiste en una molécula circular de doble cadena, de 16569 pares de bases, dispersa en la matriz mitocondrial, sin una membrana nucleica que la recoja. Este ADN mitocondrial se replica continuamente de manera independiente al genoma nuclear. En este ADN mitocondrial se encuentran codificados ARN ribosómico, ARN transferente y 13 subunidades proteicas de los complejos que forman parte de la cadena respiratoria (figura 2) (Yu-Wai-Man y col., 2011).

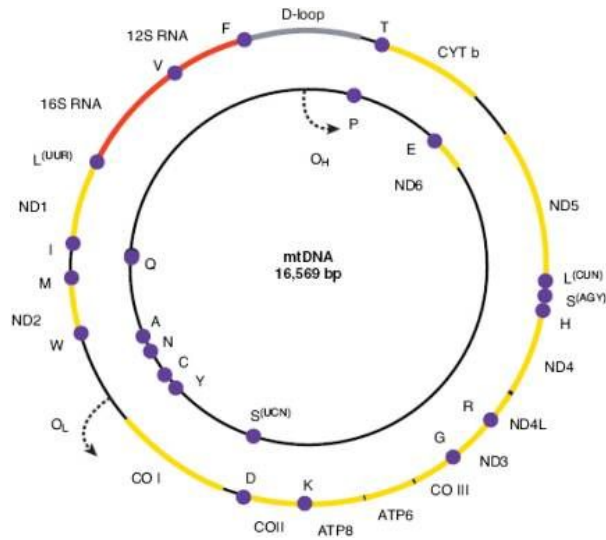


Figura 2 Genoma mitocondrial. En amarillo se observan los fragmentos del ADNmit que codifican las subunidades de los distintos complejos de la cadena respiratoria (Yu-Wai-Man y col., 2011).

La cadena respiratoria se localiza en la membrana interna de la mitocondria, y consta de cuatro complejos proteicos y dos transportadores móviles adicionales, la ubiquinona (CoQ) y el citocromo c (cit c), encargados de realizar la fosforilación oxidativa. Este proceso consiste en tomar electrones de dos donadores, el NADH y el FADH<sub>2</sub>, y transportarlos a lo largo de los cuatro complejos de la cadena respiratoria con el fin de bombear protones desde la matriz hasta el espacio intermembrana. Ese gradiente electroquímico que se genera es utilizado por el complejo V para catalizar la conversión de ADP y fosfato inorgánico (Pi) en ATP (figura 3) (Yu-Wai-Man y col., 2011).

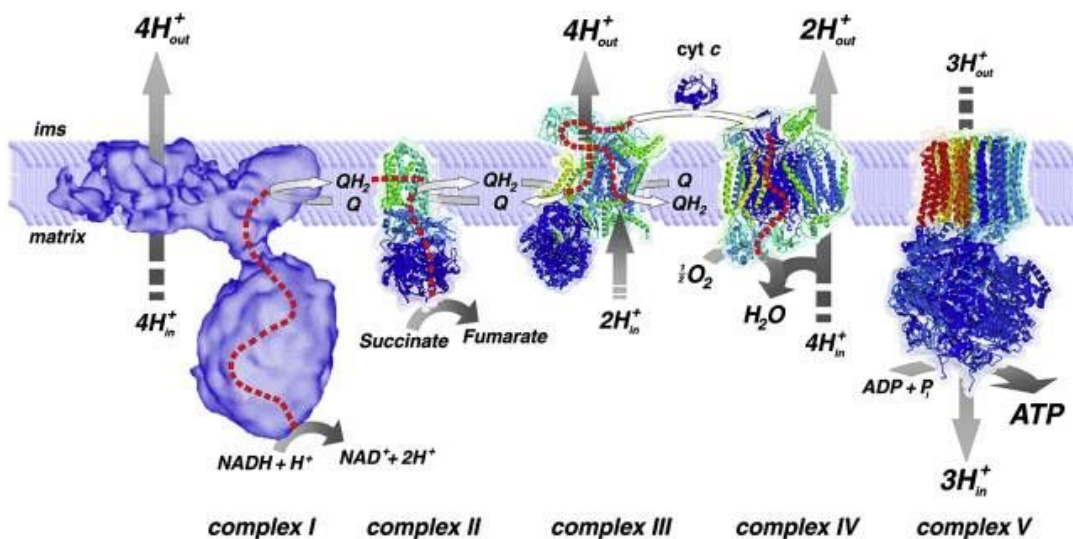


Figura 3 Cadena respiratoria mitocondrial. (Yu-Wai-Man y col., 2011)

Cuando se estudia en profundidad la cadena respiratoria, puede observarse que los complejos II y III producen radicales superóxido en importantes cantidades, y no sólo estos complejos



producen radicales libres, sino que se siguen produciendo distintas especies reactivas durante el metabolismo mitocondrial (Maresca y col, 2013). Los radicales libres juegan un papel muy importante en la regulación celular; en pequeñas cantidades funcionan como señalizadores celulares, pero a altas concentraciones dañan el ADN, proteínas y lípidos, y producen un fallo en el funcionamiento de la célula (Maresca y col, 2013).

Volviendo al genoma mitocondrial, éste contiene un mayor número de mutaciones que el genoma nuclear, y esto es debido a varios factores que aumentan la tasa de mutación, como por ejemplo la ausencia de histonas protectoras y de mecanismos reparadores, la alta tasa de replicación que tiene el ADN mitocondrial y la proximidad del genoma a la cadena respiratoria, donde se producen una alta cantidad de especies reactivas de oxígeno (Howell y col, 1996; Jazin y col, 1998; Raha y Robinson, 2000).

Cierto es que la mitocondria no tiene una completa independencia del núcleo, sino que éste también codifica en grandes cantidades las subunidades de la cadena respiratoria, por lo que las enfermedades mitocondriales pueden ser primarias, debido a una mutación en el ADN mitocondrial, o secundarias a una mutación producida en el ADN nuclear, conocidas también como mutaciones mendelianas (Yu-Wai-Man y col., 2011). En este trabajo se describe concretamente una enfermedad producida por una mutación primaria, conocida como Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber, y se pretende realizar un compendio de toda la información hasta la fecha descrita sobre las posibles terapias para el tratamiento de esta enfermedad.

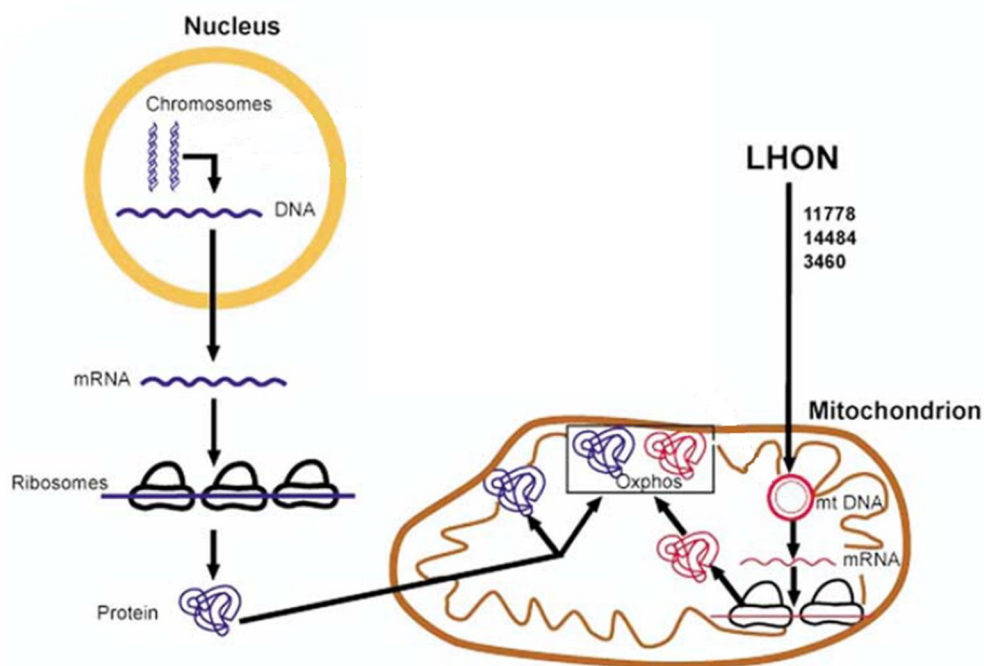
### **5.3.- NEUROPATÍA ÓPTICA HEREDITARIA DE LEBER**

La neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON, clasificada en Orphanet como ORPHA104) es la enfermedad mitocondrial primaria más común. Consiste en una pérdida aguda y permanente bilateral de la visión central, que se instaura usualmente en la segunda/tercera década de vida (Man y col., 2002). Desde los años 80, LHON se ha tratado como una enfermedad mitocondrial hereditaria vinculada a una mutación del ADN mitocondrial (Yu-Wai-Man y Chinnery, 2013).

#### **5.3.1.- Etiología**

Todos los casos clínicamente descritos como LHON tienen un patrón hereditario materno. Una mujer portadora de un determinado rasgo genético va a transmitirlo a toda su descendencia, pero sólo las mujeres podrán seguir transmitiendo ese mismo rasgo a las subsiguientes generaciones. Aunque un hombre y una mujer contribuyen por igual a la formación del núcleo de un cigoto, el citoplasma del cigoto proviene enteramente del óvulo. Puesto que las mitocondrias son los únicos orgánulos en los que se encuentra material genético extranuclear,

una enfermedad transmitida por herencia materna indica que la transmisión de dicha enfermedad se ha producido a través del ADN mitocondrial. Sí es cierto que las proteínas fundamentales para la función mitocondrial, como son los distintos complejos de la cadena respiratoria, están codificados tanto por el ADN mitocondrial como por el ADN nuclear (figura 4). Es por ello que una enfermedad mitocondrial puede ser debida tanto a un fallo en el genoma mitocondrial como en el nuclear. Las enfermedades mitocondriales hereditarias serán, por tanto, maternas si el defecto genético se encuentra en el genoma mitocondrial, mientras que se denominarán mendelianas cuando el defecto genético se encuentre en el genoma nuclear (Yu-Wai-Man y Chinnery, 2013).



*Figura 4. Proteínas mitocondriales codificadas tanto por el ADN mitocondrial como por el ADN nuclear. En la imagen se resumen las principales mutaciones producidas en el ADN mitocondrial que causan LHON, (Newman, 2005)*

En el caso concreto de LHON, se trata de una enfermedad debida a una mutación en el ADN mitocondrial, por lo que se hereda directamente de la madre. Estas mutaciones pueden localizarse en distintos genes siendo las más comunes G3460A, G11778A y T14484C (tabla 2), aunque todas estas mutaciones afectan a distintas subunidades del complejo I de la cadena respiratoria (Man y col., 2002; Yu-Wai-Man y Chinnery, 2013).

Tabla 2. Algunas mutaciones del ADN mitocondrial causantes de la neuropatía óptica hereditaria de Leber. LHON. (Man y col., 2002)

	<b>MUTACIÓN QUE SE PRODUCE</b>	<b>SUBUNIDAD AFECTADA</b>	<b>PREVALENCIA</b>
<b>COMUNES</b>			>95%
	G3460A	ND1	13%
	G11778A	ND4	69%
	T14484C	ND6	14%
<b>RARAS</b>			<5%
	G13730A	ND5	
	G14459A	ND6	
	C14482G	ND6	
	A14495G	ND6	
	C14498T	ND6	
	C14568T	ND6	
	T14596A	ND6	

Resulta curioso cómo diferentes mutaciones del ADN mitocondrial localizadas en diferentes genes que codifican diferentes proteínas resultan en fenotipos idénticos, que se manifiestan exclusivamente en el nervio óptico. Pero cuando conocemos el genoma mitocondrial vemos que cualquier mutación en dicho genoma, indiferentemente del gen que se vea afectado, se va a producir un desajuste en la síntesis de ATP y se va a producir el consecuente daño oxidativo, que resulta en la apoptosis de las células ganglionares de la retina (Yu-Wai-Man y Chinnery, 2013).

### **Vulnerabilidad del nervio óptico**

Existen varios factores que intervienen en la neurodegeneración del nervio óptico y las células ganglionares de la retina. Inicialmente sólo se consideraban el desajuste bioquímico del complejo I, el consecuente aumento de radicales libres de oxígeno y la activación de la apoptosis, pero recientemente se ha visto que también juegan un papel importante la dinámica de la red mitocondrial y la mitofagia (forma especializada de autofagia por la cual se degradan y reciclan selectivamente las mitocondrias), así como la regulación de la biogénesis mitocondrial (crecimiento y división de las mitocondrias existentes (Jornayvaz y Shulman, 2010) (figura 5) como estrategia compensatoria de la disfunción mitocondrial (Maresca y col., 2013).

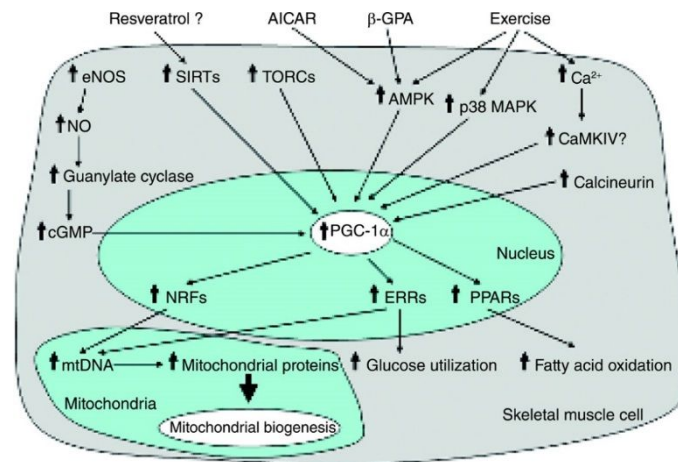


Figura 5 Esquema resumen de las rutas bioquímicas que regulan la biogénesis mitocondrial (Jornayvaz y Shulman, 2010).

Como se ha dicho anteriormente, la mitocondria es el principal proveedor de energía a la célula a través de la fosforilación oxidativa. Cuando existe un defecto en el metabolismo energético, lo más frecuente es que se deba a una disfunción del complejo I (Maresca y col, 2013). Concretamente en LHON, las tres principales mutaciones citadas anteriormente afectan precisamente a la síntesis de distintas subunidades del complejo I, lo cual conlleva un desajuste en la actividad de dicho complejo, más o menos severa dependiendo de la mutación de la que se trate.

Cuando se da una de las mutaciones citadas anteriormente causantes de LHON, el haz papilomacular de las células ganglionares de la retina (porción anatómica del nervio óptico encargada de la visión central) se ve altamente afectado debido al pequeño diámetro que tienen sus fibras y a su alta dependencia mitocondrial para su correcto funcionamiento.

Las células ganglionares de la retina requieren una alta cantidad de energía, ya que la porción inicial de sus axones, es decir, desde la cabeza del nervio óptico hasta la lámina cribosa, se encuentra desmielinizada. Es por ello que se necesita una alta cantidad de mitocondrias en esa zona, puesto que se requiere más energía para la transmisión de las señales visuales. A partir de la lámina cribosa los axones ya se encuentra mielinizados y la demanda energética se reduce, viéndose disminuido por tanto el número de mitocondrias en esa zona (Solano, 2012).

### 5.3.2.- Prevalencia

Es más frecuente que se vean afectados los hombres que las mujeres por la pérdida de visión, siendo el 80-90% de los casos pacientes varones. Como mínimo, el 25% de los hombres y el 5% de las mujeres en riesgo de padecer la enfermedad experimentan la pérdida de visión. La enfermedad normalmente se instaura entre los 15 y los 35 años, aunque siempre existen excepciones (Yu-Wai-Man y Chinnery, 2013).

### 5.3.3.- Características clínicas (cuadro clínico)

La pérdida de la visión normalmente comienza de forma indolora y afectando solo a uno de los ojos. El segundo ojo se suele ver afectado a las semanas o incluso a los meses después de que aparezcan los síntomas en el primer ojo, aunque también se han dado numerosos casos en los que se ha empezado a instaurar en ambos ojos simultáneamente. Más del 97% de los pacientes comienzan a ver afectado el otro ojo antes del año. Normalmente, la enfermedad cursa de forma aguda o subaguda, con un deterioro de la función visual estabilizado al cabo de los meses (Yu-Wai-Man y Chinnery, 2013).

#### 5.3.3.1.- Fase aguda

Los portadores de LHON permanecen asintomáticos hasta que comienzan a experimentar visión borrosa y/o nublada en uno de los ojos. En la gran mayoría de los casos, la disfunción visual es bilateral, de manera que el otro ojo comienza a verse afectado simultánea (25%) o secuencialmente (75%), con una diferencia de ocho semanas entre la afectación de un ojo y otro (Man y col., 2002).

#### 5.3.3.2.- Fase crónica

La capa de fibras nerviosas de la retina va degenerándose gradualmente y, tras seis meses, se produce la atrofia óptica completa. El grado de recuperación visual depende de la mutación que sufra el paciente, siendo la 11778 la que tiene un peor pronóstico para el paciente (tabla 2). A grandes rasgos, la edad media de instauración de LHON es la misma en los tres genotipos y siempre hay una mayor prevalencia sobre el sexo masculino. La recuperación visual, en cambio, es mayor en los pacientes portadores de la mutación 14484 (Man y col., 2002).

*Tabla 2 Mutaciones más frecuentes que causan la LHON, incidencia en función del sexo y pronóstico (Man y col., 2002)*

	<b>EDAD INSTAURACIÓN</b>	<b>RATIO HOMBRE:MUJER</b>	<b>RECUPERACIÓN VISUAL</b>
<b>G3460A</b>	29	2.3:1	22%
<b>G11778A</b>	28	4.5:1	4%
<b>T14484C</b>	27	2.1:1	37%

#### 5.3.3.3.- LHON plus

En la mayoría de los pacientes de LHON la pérdida de la visión es la única manifestación clínica. Sin embargo, algunos pacientes pueden presentar asociadas algunas otras patologías como insuficiencias cardíacas o algunas anomalías neurológicas menores. En algunos casos se han

descrito miembros de una familia por parte materna que han presentado características clínicas de LHON junto con otras patologías neurológicas severas, como trastornos del movimiento, distonías, episodios de encefalopatías y síndromes del tronco cerebral (Yu-Wai-Man y Chinnery, 2013).

#### **5.3.4.- Pronóstico**

En muchos pacientes con LHON, se recupera la visión de forma parcial o permanente, ya sea de forma bilateral o unilateral. No obstante, esa recuperación de la visión puede darse incluso años después de la pérdida visual. La recuperación de la visión puede ser en el campo central completo o solamente en un ángulo de visión, de manera que se produciría una pequeña isla de visión dentro de un gran escotoma (zona de ceguera parcial) central. Aquellos pacientes que experimentan una mejora de la visión suelen empezar a experimentar los síntomas a una edad más temprana, aunque es más fácil de predecir su genotipo.

Existe una diferencia entre las distintas mutaciones a la hora de hablar de la recuperación espontánea de la visión; los pacientes que sufren la mutación 14484 tienen muchas más probabilidades de recuperar la agudeza visual que aquellos pacientes que sufren la mutación 11778 o la 3460 (Man y col., 2002; Yu-Wai-Man y Chinnery, 2013).

#### **5.4.- OPCIONES TERAPÉUTICAS**

A medida que ha ido evolucionando la medicina y en base a lo que se conoce sobre la neuropatía óptica hereditaria de Leber, se han ido desarrollando distintas estrategias terapéuticas para tratar esta enfermedad. Existen ciertas terapias que emplean distintos métodos físicos que pretenden corregir el problema de forma mecánica, es decir, se mejora la sintomatología del paciente pero sin darle solución a la raíz de la enfermedad.

Por otro lado, y más eficazmente, se han sintetizado distintas moléculas que si pretenden corregir los mecanismos responsables de la pérdida de visión. Como veremos, existen ciertas moléculas que han fracasado a la hora de prevenir la evolución de la enfermedad, pero otras en cambio resultan bastante prometedoras en el tratamiento de LHON, en cuanto a ralentizar el perfil evolutivo de la enfermedad se refiere.

A pesar de haber hallado cierta esperanza en el campo de la terapia clásica, en la última década se han venido desarrollando otro tipo de estrategias terapéuticas en el campo de la ingeniería genética. Puesto que se trata de una enfermedad genética hereditaria, estas estrategias pretenden corregir las mutaciones que causan LHON, o incluso prevenir que ese ADN mitocondrial portador de LHON se transmita a las nuevas generaciones.

En la tabla 3 se resumen las distintas estrategias terapéuticas que se han venido utilizando para tratar la enfermedad a lo largo de los años, las cuales se irán detallando posteriormente.

*Tabla 3 Estrategias terapéuticas en LHON*

<b>Terapia clásica</b>	Métodos físicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oxígeno hiperbárico</li> <li>• Infrarrojo cercano</li> </ul>
	Métodos farmacológicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activadores farmacológicos de la biogénesis mitocondrial</li> <li>• Corticoesteroides</li> <li>• Ciclosporina A</li> <li>• Brimonidina</li> <li>• Análogos de ubiquinona</li> </ul>
	Otros métodos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cóctel mitocondrial</li> </ul>
<b>Terapia avanzada</b>	Terapia génica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilización de vectores virales y no virales</li> </ul>
	Terapia celular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células madre</li> </ul>
	Terapia preventiva	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transmisión de la línea germinal</li> </ul>

#### **5.4.1.- TERAPIA CLÁSICA - métodos físicos**

##### *5.4.1.1.- Oxígeno hiperbárico*

El tratamiento con oxígeno hiperbárico se ha venido utilizando en diversas enfermedades, entre ellas la que nos ocupa. Para realizar este tratamiento, se necesita una cámara hiperbárica donde la saturación de oxígeno es mucho mayor que la atmosférica. El paciente respira una atmósfera a una presión determinada con un 100% de oxígeno durante un tiempo determinado, dependiendo de la enfermedad que padezca, y durante un número de sesiones prescritas por un médico.

Concretamente en LHON, lo que se pretende con este tratamiento es aportar una mayor cantidad de oxígeno a las células ganglionares de la retina durante la fase aguda de LHON con el fin de mejorar la biogénesis mitocondrial. Éste ha sido un tratamiento que se ha utilizado en otras neuropatías ópticas (Malik y Golnik, 2012), pero que no ha tenido un gran éxito terapéutico en éstas, por lo que antes de probar este tratamiento en pacientes de LHON deben considerarse los efectos tóxicos de los niveles supra fisiológicos de oxígeno en el tratamiento de LHON, ya que hay una disfunción en la cadena respiratoria mitocondrial que ya está produciendo radicales

libres (Yu-Wai-Man y col., 2014). Teniendo en cuenta que ha sido un tratamiento que ha fracasado en otras neuropatías, podría darse el caso de que, en los pacientes de LHON, los daños sean más importantes que los beneficios.

#### *5.4.1.2.- Infrarrojo cercano*

La fotobiomodulación o laserterapia consiste en utilizar fuentes de luz a determinadas longitudes de onda para lograr un determinado efecto terapéutico. Durante este proceso, la luz láser infrarroja interactúa con los tejidos a nivel celular permitiendo la regeneración de los tejidos dañados.

La terapia con IR-cercano ha demostrado mejorar el funcionamiento de la mitocondria y la supervivencia celular. Tras hacer incidir luz infrarroja sobre el tejido, el complejo IV de la cadena respiratoria se estimula, con lo cual aumenta su actividad y resulta en un incremento de la síntesis de ATP. Es por ello que se ha planteado su uso como una posible terapia de rescate en LHON (Desmet y col., 2006; Karu, 2010; Geneva, 2016).

### **5.4.2.- TERAPIA CLÁSICA – métodos farmacológicos**

#### *5.4.2.1.- Activadores farmacológicos de la biogénesis mitocondrial*

El incremento de la biogénesis mitocondrial puede tener un efecto protector en los pacientes de LHON (Giordano y col., 2013). Como se ha mostrado en la figura 5, la biogénesis mitocondrial está regulada, en parte, por el activador de la transcripción PGC-1 $\alpha$ , que está controlado por los receptores activados proliferadores de peroxisoma (PPARs) y por la proteínquinasa de AMP activado (AMPK) (Wenz y col., 2010). Los activadores farmacológicos de estas proteínas incluyen los fibratos, tiazolidinadionas (pioglitazona y rosiglitazona), metformina y AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamid ribonucleosido) (Jornayvaz y Shulman, 2010; La Morgia y col., 2014).

Bezafibrato es un fármaco perteneciente al grupo de los fibratos que se utiliza para el tratamiento de hiperlipemias, pero en los últimos años se vienen realizando varios ensayos en distintos pacientes con enfermedades mitocondriales, para describir su perfil de eficacia y seguridad en este tipo de patologías (Tischner y Wenz, 2015). La utilización de bezafibrato en estos pacientes se basa en un estudio que realizó Wenz y col. (2008), donde describieron un ensayo en un modelo murino con miopatía mitocondrial tratado con bezafibrato, en el que se observó un incremento de la biogénesis mitocondrial, un retraso en la instauración de la miopatía y un aumento de la esperanza de vida.



#### 5.4.2.2.- Corticoesteroides

Los pacientes de LHON se han venido tratando con altas dosis de corticoides, como la prednisona o la metilprednisolona, incluso antes de que se realizase un diagnóstico molecular que excluyera una neuritis óptica (neuropatía óptica inflamatoria). Sin embargo, se ha visto posteriormente que los corticoesteroides no previenen una posible afectación del otro ojo y tampoco se han notificado beneficios en la progresión de la enfermedad y del resultado visual final (Yu-Wai-Man y col., 2014).

#### 5.4.2.3.- Ciclosporina A

La ciclosporina A es un polipéptido cíclico formado por 11 aminoácidos. Se trata de un potente inmunosupresor, en tanto que inhibe la respuesta inmunitaria celular, inhibiendo la producción de anticuerpos T dependientes. También inhibe la producción y liberación de linfocitos, incluyendo la interleucina 2. En base a su mecanismo de acción, este fármaco es ampliamente utilizado en ciertas enfermedades autoinmunes, como son la psoriasis, la artritis reumatoide y la dermatitis atópica, así como en trasplantes de órganos y médula ósea, la uveítis endógena y el síndrome nefrótico (Vademécum, 2016).

Puesto que en LHON se produce muerte celular en las células ganglionares de la retina debido a una alta concentración de radicales libres, es decir, se desencadena una respuesta inmunológica que conduce a la apoptosis, se intentó demostrar la eficacia de ciclosporina en pacientes de LHON. Para ello, se realizó un ensayo *in vitro* en el que se añadió peróxido de hidrógeno al medio de cultivo de cíbridos (híbridos citoplasmáticos; se obtiene mediante la fusión de una célula completa con un citoplasto) portadores de las mutaciones 11778, 14482 y 14279 y mostraron una mayor sensibilidad al estrés oxidativo (Wong y Cortopassi, 1997; Porcelli y col., 2009), lo cual supone una mayor susceptibilidad a la apoptosis (Yu-Wai-Man y col., 2014). Por otro lado, estudios posteriores, demostraron que un pretratamiento con ciclosporina A producía un bloqueo del poro mitocondrial, es decir, producía un efecto antiapoptótico, por lo que ciclosporina A sería una posible línea terapéutica en LHON (Porcelli y col., 2009).

#### 5.4.2.4.- Brimonidina

La brimonidina pertenece a un grupo de fármacos denominados simpaticomiméticos y se utiliza comúnmente en el tratamiento del glaucoma debido a su capacidad de reducir la presión intraocular del ojo (AEMPS, 2016).

Se trata de un agonista  $\alpha_2$  altamente selectivo. Puesto que se han encontrado altas concentraciones de receptores  $\alpha_2$  en la retina y el disco óptico de distintos modelos murinos, y la activación de estos receptores implica un efecto neuroprotector, se pensó que podría

utilizarse la brimonidina en pacientes de LHON, ya que éstos presentan dañada la capa de células ganglionares de la retina. Aun habiéndose demostrado la alta presencia de receptores  $\alpha 2$  en retina y disco óptico de ratones y ratas, sin embargo, no se ha podido comprobar la presencia de dichos receptores en el disco óptico humano (Saylor y col., 2009).

Por otro lado, también puede afirmarse que la brimonidina es un fármaco antiapoptótico, pudiendo proteger a las células ganglionares de la retina del daño oxidativo (Saylor y col., 2009; Yu-Wai-Man y col., 2014).

La brimonidina tópica (instilada directamente en el ojo) alcanza concentraciones intraoculares adecuadas como para ejercer su efecto neuroprotector (Saylor y col., 2009). Cuando se quiso comprobar si podía utilizarse como fármaco preventivo, se realizó un estudio con nueve pacientes de LHON que sólo tenían afectado uno de los ojos. La brimonidina no resulto eficaz a la hora de prevenir que se viera afectado el otro ojo, ni tampoco se observó beneficio con respecto al pronóstico visual tras la instauración de la patología. Puesto que se ha demostrado que una elevada presión intraocular puede ser un factor agravante con respecto a la pérdida visual en LHON, la brimonidina sigue siendo un fármaco de elección en aquellos pacientes de LHON a los que se les diagnostica glaucoma o hipertensión ocular (Newman y col., 2005; Limb y Martin, 2011; Thouin y col., 2013; Yu-Wai-Man y col., 2014).

#### *5.4.2.5.- Análogos de ubiquinona. Idebenona. EPI-743.*

Como se ha visto anteriormente cuando se habló de la cadena respiratoria, la CoQ es un transportador móvil de electrones que asegura el flujo de los mismos desde el complejo I y II hasta el complejo III (figura 3) (Yu-Wai-Man y col., 2014). Puesto que los pacientes de LHON sufren una mutación en el ADN mitocondrial que resulta en una disfunción del complejo I, el complejo III no recibe la cantidad de electrones necesaria para la síntesis de ATP. Para compensar esa carencia en estos pacientes, se pensó en activar un flujo de electrones directo al complejo III, evitándose por tanto la obstrucción a nivel del complejo I. Conociendo el mecanismo de la ubiquinona, cabría esperar un comportamiento parecido en los análogos de la ubiquinona, como es la CoQ, facilitando el paso de electrones al complejo III y por ello se podría utilizar esta molécula en las enfermedades mitocondriales. Sin embargo, se ha observado que la CoQ administrada por vía oral, no es capaz de llegar hasta las mitocondrias debido a su alto carácter lipofílico (Newman, 2012; Pfeffer y col., 2013; Yu-Wai-Man y col., 2014).

La idebenona es un análogo de cadena corta de la ubiquinona que, a diferencia de la CoQ, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y llegar a la mitocondria. Debido a sus propiedades redox, la idebenona puede ceder electrones directamente al complejo III,

permitiendo la correcta síntesis de ATP y evitando la peroxidación lipídica producida por el daño oxidativo (Mordente y col., 1998; Giorgio y col., 2012; Yu-Wai-Man y col., 2014). En 1992 se probaron por primera vez los efectos de la idebenona en un niño de 10 años que padecía LHON, portador de la mutación 11778, que recuperó parte de la visión. Sin embargo, posteriormente se cuestionó la capacidad de la idebenona para revertir la pérdida de visión, ya que el LHON instaurado en la infancia presenta un mejor pronóstico y una mayor probabilidad de recuperación de la visión de manera espontánea (Mashima y col., 1992; Barboni y col., 2006; Yu-Wai-Man y col., 2014).

La  $\alpha$ -tocotrienol quinona o EPI-743 es un fármaco experimental que se desarrolló para tratar específicamente enfermedades mitocondriales. En el año 2012, Sadun y col. publicaron un estudio sobre 5 pacientes de LHON a los que se les administraba EPI-743 vía oral 3 veces al día, y se observó que en un 80% de los casos se frenaba la evolución de la enfermedad e incluso se lograba cierta recuperación visual. Es por ello que EPI-743 podría ser el primer tratamiento farmacológico efectivo para LHON. El mismo equipo ha desarrollado un estudio multicéntrico randomizado para confirmar la eficacia terapéutica de EPI-743, del cual aún no se han publicado datos (Wenz y col., 2010; Sadun y col., 2012; Yu-Wai-Man y col., 2014).

### **5.4.3.- TERAPIA CLÁSICA – otros métodos**

#### *5.4.3.1.- Cóctel mitocondrial: suplemento dietético*

A lo largo de los años se han realizado formulaciones utilizando varias combinaciones de vitaminas (B2, B3, B12, C, E y ácido fólico) junto con otros componentes con actividad antioxidante y bioenergética mitocondrial, como son el ácido  $\alpha$ -lipoico, la carnitina, la creatina la L-arginina y el dicloroacetato, para tratar a pacientes con enfermedades mitocondriales, incluida LHON, pero ninguna de ellas demostraba una eficacia convincente (Newman, 2012; Pfeffer y col., 2012; Pfeffer y col., 2013). La singularidad de las enfermedades mitocondriales supone un reto a la hora de encontrar un tratamiento eficaz, sobre todo si se pretende conseguir con suplementos nutricionales (Pfeffer y col., 2013; Meyerson y col., 2015).

### **5.4.4.- TERAPIA GÉNICA**

En los últimos 20 años se han desarrollado nuevas técnicas moleculares que permiten una terapia de trasplante, conocida como terapia génica (Chacón-Camacho y col., 2015). La terapia génica puede definirse como la expresión de un gen, denominado gen terapéutico, previamente introducido en una célula o tejido diana con el fin de reparar o bloquear una función dada o generar una nueva función, paliando los síntomas de una determinada enfermedad en un paciente (Kayser y Müller, 2004; Walsh, 2007; Chacón-Camacho y col., 2015).

Con esta finalidad, se han venido utilizando diversos vectores capaces de transferir el gen terapéutico a distintos órganos, aunque algunos de ellos tienen ciertas limitaciones. En general, el uso de este tipo de terapia puede producir ciertos efectos secundarios que no siempre son tolerados por el paciente y, en el caso concreto de los vectores virales, aunque en teoría estos están diseñados para que el vector introduzca el gen terapéutico en la célula o tejido deseados sin producir oncogénesis, ésta es una de las preocupaciones que siempre está presente (Martin y Quigley, 2004; Walsh, 2007; Yu-Wai-Man y col., 2014).

A grandes rasgos, la terapia génica puede clasificarse en terapia génica *in vivo* o terapia génica *ex vivo*. Los métodos *in vivo* consisten en introducir el material genético directamente en la célula diana sin extraerla previamente del paciente. En cambio los métodos *ex vivo* consisten en extraer la célula diana del paciente, cultivarla y hacer que crezcan en un medio de cultivo adecuado para posteriormente poder introducir en ella el material genético deseado. Una vez modificada la célula, ésta se introduce nuevamente en el paciente.

#### 5.4.4.1.- Plásmidos y cromosomas artificiales

Los plásmidos son fragmentos circulares autorreplicantes de ADN. Estos se encuentran de forma natural en bacterias y en algunas células eucariotas, y en ellos se encuentran genes que no son esenciales para la célula. En base a esa propiedad de los plásmidos, se puede construir un plásmido en el que se inserte un gen terapéutico y vehiculizarlo a través de un vector hasta un determinado tejido o célula diana en el que se desee la replicación de ese gen (Tortora, 9ª ed.). Este plásmido podrá incorporarse al ADN cromosómico de la célula diana o bien quedarse en el citoplasma (forma episomal).

El uso de cromosomas artificiales es la técnica más novedosa en los últimos años. Como su propio nombre indica, consiste en sintetizar un cromosoma portador de carga genética, en este caso del gen terapéutico, capaz de replicarse como un cromosoma natural. Estos cromosomas artificiales se diseñan con un centrómero funcional en su estructura, de manera que es capaz de replicarse durante la mitosis celular al igual que los cromosomas naturales de la célula. Esto proporciona una ventaja con respecto a los plásmidos, puesto que en cuanto a que los plásmidos se pierden tras la división celular, el cromosoma artificial se dividiría junto con la célula, de manera que se obtiene una respuesta sostenida en el tiempo ya que el gen terapéutico puede seguir traduciéndose en las futuras células hijas. Por otro lado, mientras que los plásmidos sólo pueden incorporar genes de cierto tamaño, en los cromosomas artificiales no existe esa limitación en cuanto al número de kilobases del gen terapéutico (Kouprina y col., 2013).

Entendiéndose el término vector como cualquier sistema (ya sea fisicoquímico o biológico) capaz de actuar como vehículo para la transferencia de secuencias de ADN, algunos autores definen los plásmidos como vectores *per se*, en cuanto a que son moléculas portadoras de un determinado gen. Puesto que un plásmido, o un cromosoma artificial, no es capaz de llegar hasta un tejido o célula diana de forma libre, en este trabajo se van considerar los plásmidos y cromosomas artificiales que contienen el gen terapéutico, como “la molécula de ADN deseada” que se quiere vehiculizar hasta un determinado tejido.

#### 5.4.4.2- Sistemas de transferencia genética

Los métodos existentes para transferir un gen o plásmido en el interior de una célula pueden clasificarse en tres grandes grupos: químicos, físicos y biológicos. En la tabla 4 se recogen los sistemas más utilizados, de los cuales sólo se trataran en adelante los que tienen más relevancia en la terapia de LHON (Kayser y Kiderlen, 2004).

Tabla 4 Tabla resumen de los sistemas de transferencia genética más utilizados en terapia génica (adaptada de Kayser y Müller, 2004).

<b>Sistemas de transferencia no virales</b>	<b>Vectores químicos</b>	Precipitación mediante fosfato cálcico Liposomas catiónicos
	<b>Vectores físicos</b>	Electroporación Biobalística Microinyección
<b>Sistemas de transferencia virales</b>	Vectores retrovirus Vectores lentivirus Vectores adenovirus Vectores virales adenoasociados (AAV)	

Tanto los vectores físicos como los químicos tienen el inconveniente de presentar una baja eficiencia y un efecto a corto plazo. Es por ello que el método de elección sean los vectores virales, los cuales han sido modificados para no ser patogénicos ni replicativos, mientras preservan sitios para transportar productos transgénicos que son insertados dentro de ellos. (Yu-Wai-Man y col., 2014).

#### 5.4.4.3.- Sistemas de transferencia no virales

Los sistemas no virales que se pueden utilizar para la incorporación de un plásmido dentro de una célula son muchos, pero tan sólo algunos de ellos son utilizados en la terapia génica.

Dentro de los métodos químicos, es de estacar el precipitado con fosfato cálcico. Este consiste en introducir el plásmido en un tampón fosfato con sales de cloruro cálcico, de manera que las

sales de fosfato cálcico formadas precipitan arrastrando al plásmido consigo. Los iones de calcio alrededor del plásmido facilitan la entrada del plásmido posteriormente en la célula y su incorporación en el ADN cromosómico. Otro sistema cada vez más utilizado son los liposomas. Los liposomas son unas estructuras lipídicas esféricas en cuyo interior puede ir vehiculado el material genético. Estos liposomas pueden modificarse para dirigirlos a la célula diana (Schweizer y col., 2004).

Otros sistemas de vectorización no viral son los clasificados como vectores físicos. En esa clasificación se incluye la electroporación, que consiste en exponer a las células a impulsos eléctricos, de manera que se crean unos poros en la membrana celular a través de los cuales se puede introducir el plásmido. Otro método de inserción del plásmido podría ser mediante microinyección, que consiste en introducir el plásmido directamente en el citoplasma de la célula bajo el microscopio y con una micro aguja. La microinyección resulta ser el método físico más simple y aun así el más efectivo. Un último método físico de interés en terapia génica sería la biobalística. Ésta consiste en bombardear literalmente la célula con partículas de oro o tungsteno recubiertas con moléculas del plásmido. Las moléculas de plásmido se desprenden de las partículas metálicas una vez en la célula y el plásmido puede incorporarse al ADN cromosómico o quedarse en el citoplasma en forma episomal. A pesar de haberse demostrado la seguridad de este método para el paciente, la célula que ha sido bombardeada podría resultar seriamente dañada, y es por ello que no es un método tan utilizado como la microinyección (Croyle, 2008; Schweizer y col., 2004).

#### *5.4.4.4.- Vectores virales*

Cuando un virus infecta una célula, ésta es capaz de transcribir el genoma virásico y transcribir sus proteínas de una manera muy eficiente, permitiendo así la replicación del virus dentro de dicha célula. La ingeniería genética se ha aprovechado de esta cualidad para modificar los virus y obtener los llamados vectores virales. Estos no son capaces de transferir su material genético a la célula, pero sí pueden incorporar el gen terapéutico al ADN de la célula huésped. Puesto que no se transfiere el material virásico, el virus no puede replicarse en el interior de esa célula (Kayser y Kiderlen, 2004).

##### *5.4.4.4.1.- Vectores retrovirales (RV)*

Los vectores retrovirales se han obtenido a partir del virus de la leucemia murina. Su genoma consiste en dos copias de cadena simple de ARN, y cuando infecta a la célula se traduce cada una en una cadena doble de ADN y se integran en el genoma de la célula huésped. Puesto que

ha sido un virus modificado por ingeniería genética, el material genético transferido es el gen terapéutico de interés (Kayser y Kiderlen, 2004).

Los RV presentan una alta eficiencia a la hora de transferir el vector de expresión, y éste se inserta de una manera tan estable en el genoma celular que produce cambios en la célula a largo plazo. Sin embargo, solo pueden incluir un vector de expresión de 9 pares de bases o menos (Kayser y Kiderlen, 2004).

#### 5.4.4.4.2.- Vectores lentivirales (LV)

Los vectores lentivirales derivan del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), del lentivirus felino (FL) o del virus de la anemia infecciosa equina (EIAIV). Los LV pueden vectorizar genes de hasta 9 pares de kilobases.

Resultan ser vectores muy eficientes en la transferencia del gen terapéutico dentro de células no proliferativas y producen un efecto a largo plazo debido a su capacidad de modificar de forma persistente el genoma de la célula huésped. Esto puede resultar útil a la hora de modificar células madre *ex vivo* y modificar células neuronales *in vivo*, como pueden ser el endotelio corneal, la red trabecular y los distintos tejidos de la retina (Kayser y Kiderlen, 2004; Yu-Wai-Man y col., 2014).

#### 5.4.4.4.3.- Vectores adenovirales (AV)

El genoma de los vectores adenovirales consiste en una cadena doble de ADN que se introduce dentro del núcleo de la célula huésped, pero que no se integra dentro del genoma celular. Por lo tanto, la modificación genética se perderá cuando se produzca la proliferación celular (Kayser y Kiderlen, 2004).

Estos vectores, permiten la inserción de genes terapéuticos de hasta 10 pares de kilobases, pero sin el riesgo de oncogénesis y se prefieren para tratar células somáticas y/o no proliferativas, como son los tejidos perioculares, las estructuras anteriores del ojo y la retina (Kayser y Kiderlen, 2004; Yu-Wai-Man y col., 2014).

#### 5.4.4.4.4.- Vectores virales adenoasociados (AAV)

Los virus AAV pertenecen a la familia de los parvovirus y presentan una cadena simple de ADN. A pesar de que sólo pueden transportar 4 pares de kilobases, los vectores AAV pueden ser utilizados para la transfección de una gran variedad de células oculares, incluyendo fotorreceptores, células epiteliales de la retina, células de Müller, y células ganglionares de la retina. La inflamación inducida por el tratamiento es muy pequeña, y la expresión en células ganglionares de la retina puede persistir durante mínimo un año, de manera que podría

considerare el tratamiento de neuropatías ópticas con AAV (Kayser y Kiderlen, 2004; Yu-Wai-Man y col., 2014).

Recientemente, se ha demostrado la seguridad y efectividad de la administración subretiniana en pacientes con amaurosis congénita de Leber (enfermedad rara que también produce ceguera), sugiriendo que la terapia génica retiniana mediada por AAV puede ser exitosamente extendida a otras condiciones que dañan severamente la visión, como es LHON. Asimismo, esto es apoyado por la gran versatilidad de AAV como plataforma de vectores. Debido a que hay un gran número de variantes de AAV y muchas de ellas con características únicas transduccionales, estos vectores pueden ser dirigidos a diferentes tipos celulares en la retina, incluyendo la glía, el epitelio y muchos tipos de neuronas (Yu-Wai-Man y col., 2014).

#### **5.4.4.1.- Terapia génica y LHON**

La terapia génica ha resultado ser muy prometedora en enfermedades mitocondriales. Particularmente en LHON, es una opción incluso más interesante debido a que la capa de células ganglionares en la retina son más fácilmente accesibles. Además, el ojo es un órgano que está relativamente aislado, minimizándose los riesgos de una transfección no deseada a otros tejidos cercanos. Por otro lado, las células marcadas para la terapia génica no van a someterse a división celular, por lo que el riesgo de oncogénesis se ve potencialmente reducido (Martin y Quigley, 2004).

Sin embargo, aún no se ha desarrollado correctamente la introducción de genes directamente dentro del genoma mitocondrial ya que la doble capa mitocondrial resulta un verdadero obstáculo. Es por ello que los investigadores optaron por introducir el gen deseado directamente en el genoma nuclear (DiMauro y Mancuso, 2007; Guy, 2000; Manfredi y col., 2002). Se han probado distintas estrategias para que ese genoma introducido directamente en el citoplasma pudiera atravesar la doble membrana mitocondrial y llegar al interior de la mitocondria, pero siempre se observaban problemas de eficacia y toxicidad mitocondrial en todas ellas (Osherovich, 2012). Posteriormente, se probaron los vectores AAV; se modificó la cápsida del AAV incorporándole un péptido corto que actúa como una señal de reconocimiento mitocondrial, de manera que podría liberare el gen terapéutico directamente en la mitocondria en incorporar el gen terapéutico en el ADN mitocondrial. (Osherovich, 2012).

Uno de los retos de la terapia en LHON es la heterogeneidad en la etiología de la enfermedad; existen tres mutaciones posibles en partes diferentes del genoma mitocondrial. Es por ello que para que la terapia génica resulte exitosa, se debe corregir la mutación concreta de cada paciente (Osherovich, 2012). Lo que se pretende es construir un vector universal que contenga los promotores para corregir las tres posibles mutaciones, en lugar de construir vectores por



separado. Así, con un único vector, podría tratarse a cualquier paciente de LHON, asegurando la correcta expresión de los tres genes (Osheroovich, 2012).

#### **5.4.5.- TERAPIA AVANZADA- terapia celular: células madre**

La terapia celular consiste en utilizar células madre como instrumento terapéutico. Hace unos años se utilizaban las células madre embrionarias, pero con el descubrimiento de células madre en otros tejidos, denominadas células madre adultas, se ha demostrado que su uso no queda restringido al tratamiento de enfermedades hematológicas, como se ha venido haciendo desde el descubrimiento de las células madre. Estas células madre adultas pueden modificarse por ingeniería genética con el fin de regenerar o reparar casi cualquier tejido en el que vayan a ser trasplantadas (SETGyC, 2016).

Concretamente en el ojo, las células madre han demostrado ser muy útiles en el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina mediante el reemplazo de células en el ojo y/o la liberación de factores de crecimiento dentro del tejido dañado. Sin embargo, tanto el mecanismo de acción como la eficacia de la terapia pueden variar en función del tipo de célula madre que se utilice. Mead y colaboradores (2016) han demostrado que las células madre derivadas de la pulpa dental resultan mucho más eficaces que las células madre derivadas de la médula ósea y tejido adiposo a la hora de proteger las células ganglionares de la retina y sus axones (Mead y col., 2015; Mead y col., 2016; SETGyC, 2016).

Ya que algunos pacientes de LHON experimentan recuperación visual, estos pacientes tienen células ganglionares de la retina que sobreviven a pesar de la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo. Para proteger estas células, se pueden utilizar células madre mesenquimales que secretan factores neurotróficos y citoquinas antiinflamatorias. La inyección intravitrea de estas células madre mesenquimales en un modelo de rata con glaucoma demostró un efecto neuroprotector con incremento de la supervivencia de las células ganglionares. Otro estudio usó infusiones intravenosas de células madres derivadas de la médula ósea en 10 pacientes con esclerosis múltiple progresiva secundaria, que experimentaron una mejoría de la agudeza visual y un incremento del nervio óptico sin efectos adversos significantes. La misma estrategia terapéutica podría probarse en el futuro en pacientes de LHON para así ralentizar la pérdida de células ganglionares de la retina (Dahlmann-Noor y col., 2010; Johnson y col., 2010; Connick y Chandran, 2013; Yu-Wai-Man y col., 2014).

#### 5.4.6.- TERAPIA PREVENTIVA - Prevención de la transmisión de la línea germinal

En los últimos años se están utilizando las técnicas de fertilización *in vitro* para prevenir la transmisión de enfermedades genéticas a las nuevas generaciones. Puesto que LHON es una enfermedad genética que se produce por una mutación en el ADN mitocondrial, la fertilización *in vitro* podría diseñar un cigoto triparental, es decir, insertar posfertilización los dos pronúcleos de las células germinales (núcleo del óvulo y núcleo del espermatozoide) en un citoplasto al que previamente se le ha eliminado el núcleo. Así, se conseguiría un cigoto con la carga genética de los progenitores pero sin el ADN mitocondrial mutado del que es portadora la madre (figura 6) (Craven y col., 2010; Yu-Wai-Man y col., 2014).

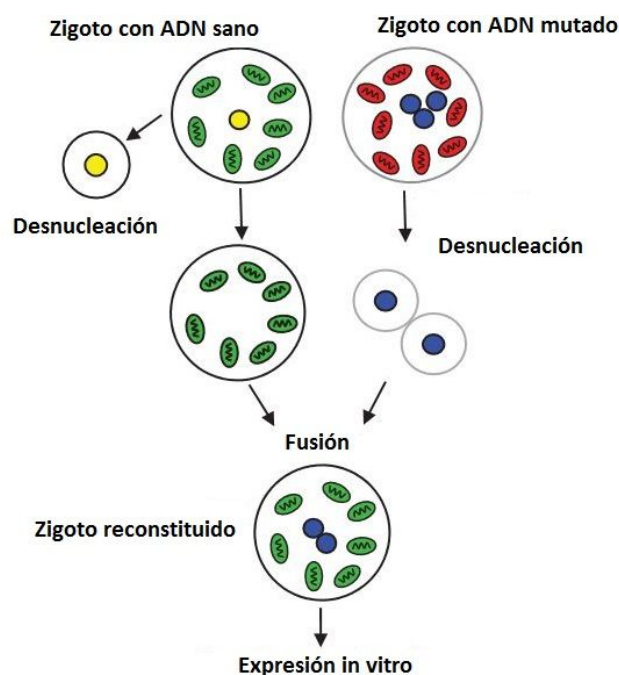


Figura 6 Esquema resumen de la transmisión de la línea germinal (Craven y col., 2010)

El desarrollo de la fertilización *in vitro* con el fin de evitar la transmisión de enfermedades mitocondriales ha resultado ser muy esperanzador para los portadores de LHON. Sin embargo, se deben realizar previamente unos tests de seguridad muy rigurosos, puesto que la técnica no está exenta de riesgos. Un porcentaje muy significativo de cigotos manipulados han demostrado un desarrollo anormal y se deben considerar otras consecuencias genéticas iatrogénicas, incluyendo un aumento del riesgo de aneuploidia (variación del número cromosómico) y anomalía epigenética.

Por otro lado, la manipulación de embriones humanos ha sido un tema que ha despertado mucha controversia desde el punto de vista ético, religioso y legal, por lo que esta técnica aún se ve cuestionada por ciertos sectores sociales (Yu-Wai-Man y col., 2014).

## 6.- CONCLUSIONES

La neuropatía óptica hereditaria de Leber es una enfermedad considerada rara, por lo que no se conoce tratamiento para ella. Ha sido una enfermedad muy estudiada para conocer sus bases moleculares y su etiología, y poder desarrollar, en función de ello, una terapia útil para los pacientes de LHON.

Se podría afirmar que la terapia clásica, utilizando tratamientos farmacológicos a partir de moléculas de síntesis, no ha resultado efectiva en el tratamiento o prevención de la enfermedad, salvo algunas moléculas que han demostrado ralentizar la evolución de la patología. Es por ello que las perspectivas futuras se sitúan en la terapia génica. Al ser una enfermedad genética ligada a mutaciones, podrían corregirse dichas mutaciones y conseguir curar la enfermedad o incluso prevenir la transmisión vertical. Ciertamente es que estas técnicas, aun bien estudiadas y teóricamente plausibles, aún están siendo perfeccionadas, debido a las discrepancias éticas y religiosas y al delicado perfil de seguridad que presentan.

Aun así, se podría asegurar que el tratamiento, ya no de LHON si no de algunas otras enfermedades raras con el mismo perfil, está bien orientado en el campo de la terapia génica, un campo que hasta hace unos años resultaba utópico y que hoy en día se consigue llevar a la práctica.

## 7.- BIBLIOGRAFÍA

1. Agencia Española De Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha Técnica del Medicamento: Brimonidina [en línea]. [Consultado en Mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/fichasTecnicas.do?metodo=buscar>
2. Agencia Española De Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha Técnica del Medicamento: Ciclosporina [en línea]. [Consultado en Mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/fichasTecnicas.do?metodo=buscar>
3. Barboni P, Savini G, Valentino M, La Morgia C, Bellusci C, De Negri A et al. Leber's hereditary optic neuropathy with childhood onset. *Investigative Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(12):5303.
4. Chacon-Camacho OF, Astorga-Carballo A, Zenteno JC. Terapia génica para enfermedades hereditarias oftalmológicas: avances y perspectivas. *Gac Med Mex.* 2015;151:501-511

5. Connick P, Chandran S. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(11):e2-e2.
6. Craven L, Tuppen H, Greggains G, Harbottle S, Murphy J, Cree L et al. Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature*. 2010;465(7294):82-85.
7. Croyle, MA. Gene therapy. En: Crommelin DJA, Sindelar RD, Meibohm B. *Pharmaceutical biotechnology: fundamentals and applications*. 3ª edición. Nueva York: Informa Healthcare USA, Inc; 2008. p. 175-206.
8. Dahlmann-Noor A, Vijay S, Jayaram H, Limb A, Khaw P. Current approaches and future prospects for stem cell rescue and regeneration of the retina and optic nerve. *Can J Ophthalmol*. 2010;45(4):333-341.
9. Desmet K, Paz D, Corry J, Eells J, Wong-Riley M, Henry M et al. Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2006;24(2):121-128.
10. DiMauro S, Mancuso M. Mitochondrial diseases: therapeutic approaches. *Biosci Rep*. 2007;27(1-3):125-137.
11. Geneva, II. Photobiomodulation for the treatment of retinal diseases: a review. *Int J Ophthalmol*. 2016;9(1):145-152.
12. Giordano C, Iommarini L, Giordano L, Maresca A, Pisano A, Valentino M et al. Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2013;137(2):335-353.
13. Giorgio V, Petronilli V, Ghelli A, Carelli V, Rugolo M, Lenaz G et al. The effects of idebenone on mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1817(2):363-369.
14. Guy J, Qi X, Pallotti F, Schon E, Manfredi G, Carelli V et al. Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber hereditary optic neuropathy. *Ann Neurol*. 2002;52(5):534-542.
15. Jazin E, Soodyall H, Jalonen P, Lindholm E, Stoneking M, Gyllensten U. Mitochondrial mutation rate revisited: hot spots and polymorphism. *Nature Genet*. 1998;18:109-110.
16. Johnson T, Bull N, Hunt D, Marina N, Tomarev S, Martin K. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(4):2051.
17. Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem*. 2010; 47: 10.1042/bse0470069.
18. Karu, TI. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red

- and IR-A radiation. *Life*. 2010; 62(8): 607–610.
19. Kayser O, Kiderlen AF. Nonviral gene transfer systems in somatic gene therapy. En: Kayser O, Müller R. *Pharmaceutical biotechnology, Drug Discovery and Clinical Applications*. 1ª edición. Weinheim: Wiley-VCH; 2004. p.249-264.
  20. Kouprina N, Earnshaw W, Masumoto H, Larionov V. A new generation of human artificial chromosomes for functional genomics and gene therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70:1135-1148.
  21. La Morgia C, Carbonelli M, Barboni P, Sadun A, Carelli V. Medical management of hereditary optic neuropathies. *Frontiers in Neurology*. 2014;5.
  22. Limb G, Martin K. Current prospects in optic nerve protection and regeneration: Sixth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(8):5941.
  23. Malik A, Golnik K. Hyperbaric oxygen therapy in the treatment of radiation optic neuropathy. *Journal of Neuro-Ophthalmology*. 2012;32(2):128-131.
  24. Man PYW, Turnbull DM, Chinnery PF. Leber hereditary optic neuropathy. *J Med Genet*. 2002;39:162-169.
  25. Manfredi G, Fu J, Ojaimi J, Sadlock J, Kwong J, Guy J et al. Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus. *Nature Genet*. 2002;30(4):394-399.
  26. Maresca A, la Morgia C, Caporali L, Valentino M, Carelli V. The optic nerve: a “mito-window” on mitochondrial neurodegeneration. *Mol Cell Neurosci*. 2013;55:62-76.
  27. Martin KRG, Quigley HA. Gene therapy for optic nerve disease. *Eye*. 2004;18:1049-1055.
  28. Mashima Y, Hiida Y, Oguchi Y. Remission of Leber's hereditary optic neuropathy with idebenone. *The Lancet*. 1992;340(8815):368-369.
  29. Mashima Y, Kigasawa K, Wakakura M, Oguchi Y. Do idebenone and vitamin therapy shorten the time to achieve visual recovery in leber hereditary optic neuropathy?. *Journal of Neuro-Ophthalmology*. 2000;20(3):166-170.
  30. Mead B, Berry M, Logan A, Scott R, Leadbeater W, Scheven B. Stem cell treatment of degenerative eye disease. *Stem Cell Research*. 2015;14(3):243-257.
  31. Mead B, Hill L, Blanch R, Ward K, Logan A, Berry M et al. Mesenchymal stromal cell-mediated neuroprotection and functional preservation of retinal ganglion cells in a rodent model of glaucoma. *Cytotherapy*. 2016;18(4):487-496.
  32. Meyerson C, Van Stavern G, McClelland C. Leber hereditary optic neuropathy: current perspectives. *Clinical Ophthalmology*. 2015;9:1165-1176
  33. Mordente A, Martorana G, Minotti G, Giardina B. Antioxidant Properties of 2,3-

- Dimethoxy-5-methyl- 6-(10-hydroxydecyl)-1,4-benzoquinone (Idebenone). *Chem Res Toxicol.* 1998;11(1):54-63.
34. Newman N. Treatment of hereditary optic neuropathies. *Nature Rev Neurology.* 2012;8(10):545-556.
  35. Newman N, Biousse V, David R, Bhatti M, Hamilton S, Farris B et al. Prophylaxis for Second Eye Involvement in Leber Hereditary Optic Neuropathy: An Open-Labeled, Nonrandomized Multicenter Trial of Topical Brimonidine Purite. *Am J Ophthalmol.* 2005;140(3):407.e1-407.e11.
  36. Osherovich L. Mitochondrial gene therapy. *SciBX.* 2012;5(19)
  37. Pfeffer G, Horvath R, Klopstock T, Mootha V, Suomalainen A, Koene S et al. New treatments for mitochondrial disease - no time to drop our standards. *Nature Rev Neurology.* 2013;9(8):474-481.
  38. Pfeffer G, Majamaa K, Turnbull DM, Thorburn D, hennery PF. Treatment for mitochondrial disorders. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;4:CD004426
  39. Porcelli A, Angelin A, Ghelli A, Mariani E, Martinuzzi A, Carelli V et al. Respiratory Complex I Dysfunction Due to Mitochondrial DNA Mutations Shifts the Voltage Threshold for Opening of the Permeability Transition Pore toward Resting Levels. *J Biol Chem.* 2009;284(4):2045-2052.
  40. Sadun AA, Chicani CF, Ross-Cisneros FN, Barboni P, Thoolen M, Shrader WD et al. Effect of EPI-743 on the clinical course of the mitochondrial disease Leber hereditary optic neuropathy. *Arch Neurol.* 2012;69(3):331.
  41. Saylor M, McLoon LK, Harrison AR, Lee MS. Experimental and clinical evidence for brimonidine as an optic nerve and retinal neuroprotective agent. *Arch Ophthalmol.* 2009;127(4):402.
  42. Schweizer M, Flory E, Munk C, Cichutek K. Somatic gene therapy – advanced biotechnology products in clinical development. En: Kayser O, Müller R. *Pharmaceutical biotechnology, drug discovery and clinical applications.* 1ª edición. Weinheim: Wiley-VCH; 2004. p.231-247.
  43. Silverthorn. *Fisiología humana: un enfoque integrado.* 4ª edición. Buenos aires: Médica Panamericana;2010.
  44. Sociedad Española de Terapia Génica y Celular. *Introducción a la Terapia Génica y la Terapia Celular* [en línea]. [Consultado en Mayo 2016]. Disponible en: <http://www.setgyc.es/Informaci%C3%B3n-de-Inter%C3%A9s/Introducci%C3%B3n-a-la-Terapia-G%C3%A9nica-y-la-Terapia-Celular.aspx>
  45. Solano, A. La vulnerabilidad de las células ganglionares de la retina a los defectos

- mitocondriales. Arch Soc Esp Oftalmol. 2012;87(3):69-71.
46. Thouin A, Griffiths P, Hudson G, Chinnery P, Yu-Wai-Man P. Raised intraocular pressure as a potential risk factor for visual loss in Leber hereditary optic neuropathy. PLoS ONE. 2013;8(5):e63446.
  47. Tischner C, Wenz T. Keep the fire burning: Current avenues in the quest of treating mitochondrial disorders. Mitochondrion. 2015 24:32-49.
  48. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Introducción a la microbiología. 9ª edición. Médica Panamericana;2007.
  49. Vademécum. Monografías de principios activos: ciclosporina [en línea]. [Consultado en Junio 2016]. Disponible en: <http://www.vademecum.es/principios-activos-ciclosporina-l04ad01>
  50. Walsh, G. Nucleic acid and cell based therapeutics. En: Walsh, G. Pharmaceutical biotechnology: concepts and applications. 1ª edición. England: Wiley;2007. p. 419-463
  51. Wenz T, Diaz F, Spiegelman B, Moraes C. Activation of the PPAR/PGC-1 $\alpha$  pathway prevents a bioenergetic deficit and effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype. Cell Metabolism. 2008;8(3):249-256.
  52. Wenz T, Williams S, Bacman S, Moraes C. Emerging therapeutic approaches to mitochondrial diseases. Developmental Disabilities Research Reviews. 2010;16(2):219-229.
  53. Wong A, Cortopassi G. mtDNA Mutations confer cellular sensitivity to oxidant stress that is partially rescued by calcium depletion and cyclosporin A. Biochem Biophys Res Commun. 1997;239(1):139-145.
  54. Yu-Wai-Man P, Chinnery PF. Leber hereditary optic neuropathy. GeneReviews® [en línea]. 19 Sept 2013. [Consultado en Mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1174/>
  55. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Chinnery PF. Mitochondrial optic neuropathies- disease mechanisms and therapeutic strategies. Prog Retin Eye Res. 2011;30:81-114.
  56. Yu-Wai-Man P, Votruba M, Moore AT, Chinnery PF. Treatment strategies for inherited optic neuropathies: past, present and future. Eye. 2014;28:521-537.