



**GRADO EN ÓPTICA Y OPTOMETRÍA**

**TRABAJO FINAL DE GRADO**

---

**OPTOGENÉTICA Y POSIBLES TERAPIAS PARA LA  
RETINOSIS PIGMENTARIA**

**MARC SANSA FAYOS**

**DIRECTOR: PERE GARRIGA SOLE  
CO-DIRECTORA: MARGARITA MORILLO CAZORLA  
DEPARTAMENTO: ENG. QUÍMICA**

## ÍNDICE

1.	Introducción .....	7
2.	Retinosis Pigmentaria (RP).....	9
2.1.	Síntomas y signos .....	9
2.2.	Herencia .....	10
2.3.	Genes y mutaciones .....	11
2.4.	De la mutación en la proteína a la degeneración retiniana .....	12
2.5.	Factores que afectan potencialmente el progreso de la enfermedad.....	13
3.	Optogenética.....	14
3.1.	Fundamentos de la optogenética.....	15
3.2.	Opsinas microbianas en la regeneración visual .....	16
3.3.	Últimos desarrollos de la optogenética .....	18
4.	Aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la RP .....	19
4.1.	Terapia génica y celular .....	19
4.1.1.	Terapia con células madre.....	19
4.1.2.	Factores neurotróficos .....	20
4.1.3.	Optogenética.....	22
4.1.4.	Trasplantes .....	23
4.2.	Otras aproximaciones terapéuticas .....	23

4.2.1. Protección de la luz .....	23
4.2.2. Terapia con vitaminas u otros productos naturales .....	24
4.2.3. Implantes .....	24
5. Conclusiones .....	25
5.2. Limitaciones.....	26
5.3. Futuras investigaciones.....	26
6. Bibliografía.....	28

## Resumen

La retinosis pigmentaria (RP) es un grupo clínico y genéticamente heterogéneo de trastornos de la retina hereditarios caracterizados por una disfunción progresiva difusa de fotorreceptores predominantemente bastón, con la posterior degeneración de fotorreceptores de cono y epitelio pigmentario retiniano. La discapacidad visual generalmente se manifiesta como ceguera nocturna y pérdida progresiva del campo visual. Su prevalencia es de 1:3000 a 1:5000. La RP puede verse de forma aislada (RP típica) o en asociación con enfermedad sistémica.

El presente trabajo se enfoca en la RP típica con una breve mención de tipos de RP raros pero con posibles opciones terapéuticas y las diferentes formas de abordarlas. Existe una variación considerable en la gravedad clínica de estas afecciones; El tratamiento actual de la RP incluye un intento de desacelerar el proceso degenerativo a través de terapias. Las terapias novedosas incluyen el uso de terapia génica a medida, trasplante de células madre o tratamiento de neuroprotección.

Se han explorado muchos tratamientos sin beneficio comprobado para las formas aisladas de RP. Estos incluyen varias vitaminas y minerales, vasodilatadores, terapia de tejidos con extracto placentario, cortisona, simpatectomía cervical, inyecciones de un hidrolizado, factor de transferencia, dimetilsulfóxido, ozono, trasplantes musculares e inyecciones subretinianas de células retinianas fetales. A pesar de estos avances, no existe un tratamiento efectivo disponible en la actualidad

Tras una revisión de la literatura actual exhaustiva se ha podido concluir que los recientes avances en la terapia génica y la tecnología de células madre han posicionado el campo al borde de lo que muchos creen que será un gran avance en la estrategia terapéutica. La tecnología de prótesis retiniana ha permitido restaurar la vista a los ojos completamente ciegos "sin percepción de luz", una hazaña que hace poco tiempo se veía como imposible.

La terapia génica basada en líneas de células madre específicas del paciente y la edición *in vivo* de genes pueden convertirse en las principales direcciones de la terapia basada en células y la terapia génica. Se espera que las células fotorreceptoras artificiales basadas en aproximaciones optogenéticas compitan con los implantes protésicos.

**Palabras clave:** *retinitis pigmentosa, opsinas microbianas, tratamiento, optogenética.*

## Abreviaturas

AAV	Vectores virales adenoasociados
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
ChR2	Channelrhodopsin-2
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
DHA	Ácido docosahexaenoico
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ESC	Células madre derivadas de embriones
FCF	Factor de crecimiento derivado de fibroblastos
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
HPSC	Células madre hematopoyéticas
IPSC	Células madre pluripotentes inducidas
MSC	Células madre mesenquimales
NFG	Factor de crecimiento nervioso
NpHR	Halorodopsina
RP	Retinosis Pigmentaria
RPE	Epitelio pigmentario de la retina

## 1. Introducción

La retinosis pigmentaria (RP) se refiere a un grupo diverso de enfermedades hereditarias progresivas que conducen a ceguera incurable y que se estima que afectan a aproximadamente dos millones de personas en todo el mundo<sup>1</sup>. La RP comúnmente comienza con ceguera nocturna en adultos jóvenes, lo que refleja la degeneración temprana de las células fotorreceptoras bastón altamente sensibles. Esto es seguido por una disminución progresiva de la visión central a la luz del día, debido a la pérdida de la función de las células fotorreceptoras cono menos sensibles. Se han demostrado mutaciones en más de 44 genes en diferentes formas de RP,<sup>1,2</sup> pero en aproximadamente el 50% de los casos la mutación aún no se ha identificado. La mayoría de los genes causantes de RP conocidos se expresan en bastones y, en tales casos, se cree que la degeneración de conos es una consecuencia secundaria de la muerte de los bastones<sup>4</sup>. No hay cura para la RP, pero existen varios enfoques para el tratamiento de formas particulares de RP que se encuentran en la fase de ensayos clínicos, y es probable que otros se introduzcan pronto<sup>5</sup>.

Estos enfoques se pueden dividir en tres grupos. Primero, la suplementación de genes<sup>6</sup> es conceptualmente simple y una estrategia atractiva si, como es el caso en la mayoría de las formas recesivas de RP, la enfermedad se debe a mutaciones de pérdida de función. El progreso en el desarrollo de la terapia génica para una forma de amaurosis congénita de Leber causada por defectos en el gen específico del epitelio pigmentario de la retina, RPE65, no solo ha ofrecido esperanza a los pacientes con esta enfermedad, sino que también ha aumentado la confianza general en las estrategias de terapia génica para los trastornos de la retina, demostrando la seguridad y la eficacia de los vectores virales AAV después de la administración intraocular en humanos<sup>7-11</sup>.

Como la suplementación de genes solo se puede aplicar cuando el tipo de célula que expresa el gen todavía está vivo, el diagnóstico temprano y la terapia génica en la infancia pueden ser necesarios en el caso de los genes específicos de bastones más comunes. La suplementación genética es más complicada en formas dominantes de RP<sup>12</sup>, donde la mutación induce una vía tóxica o en RP recesiva, si el gen excede la capacidad de empaquetamiento de los vectores virales que son adecuados para su uso en humanos. Sin embargo, cuando es posible, la suplementación genética es la forma más obvia y

probablemente la más efectiva para restaurar la función. Un segundo enfoque es disminuir la degeneración de los fotorreceptores y, por lo tanto, retrasar la progresión de la enfermedad<sup>13, 14</sup>.

Finalmente, hay una serie de enfoques que no interfieren con la progresión intrínseca de la enfermedad, sino que intentan restaurar la fotosensibilidad creando nuevos fotosensores y acoplándolos a los circuitos retinianos restantes. Los pacientes que son legalmente ciegos son la población objetivo clave de estas terapias. Se investigan tres estrategias diferentes: (1) la implantación de fotorreceptores diferenciados o no diferenciados<sup>15</sup>, (2) implantes retinianos electrónicos<sup>16</sup>, y (3) el tema de esta revisión, los llamados enfoques 'optogenéticos',<sup>17</sup> que utilizan sensores de luz codificados genéticamente para hacer que las células respondan de nuevo a la luz<sup>18</sup>.

El éxito de los enfoques de implantación celular depende de la formación de sinapsis funcionales entre los fotorreceptores implantados y las células bipolares endógenas, y del epitelio funcional del pigmento retiniano para suministrar fotorreceptores con 11-*cis*-retinal. Los implantes retinianos electrónicos y los enfoques optogenéticos son similares en el sentido de que la luz es capturada por un fotosensor artificial y la corriente generada se usa para estimular las células retinianas dentro del circuito retiniano restante. La diferencia clave entre estas dos técnicas radica en la forma en que la corriente generada por la luz estimula las células. En el caso de los implantes electrónicos, la corriente se distribuye extracelularmente y activa las células en función de la proximidad y otros parámetros físicos. Los implantes retinianos validaron la posibilidad de reactivar los circuitos retinianos para restaurar cierta percepción visual. Algunos pacientes con gran deficiencia visual pueden leer letras e incluso palabras<sup>19</sup>.

En los enfoques optogenéticos, un sensor de luz codificado genéticamente se encuentra en la membrana de una célula retiniana. La corriente generada fluye a través de la membrana celular y, por lo tanto, activa o inactiva esa célula particular. El aspecto crítico de los enfoques optogenéticos es que los sensores de luz se pueden dirigir genéticamente a diferentes tipos de células de la retina y, por lo tanto, pueden proporcionar una actividad de la retina estimulada artificialmente que está más cerca de la actividad normal de los circuitos de la retina. Los enfoques optogenéticos están solo en la fase de ensayos preclínicos. Esta revisión se centra en los avances en la estimulación



optogenética de los circuitos retinianos en la RP y discute los desafíos de hacer avanzar esta tecnología hacia su aplicación clínica.

## **2. RP**

### **2.1. Síntomas y signos**

La RP es la degeneración hereditaria progresiva hereditaria más común que causa ceguera. Se caracteriza por una función inicial y severamente deteriorada de los bastones seguida por la degeneración en la funcionalidad de los conos. Tanto la función de los bastones como la de los conos pueden verse gravemente afectadas o ser indetectables en las etapas avanzadas (con mayor frecuencia incluso a una edad temprana). Las manifestaciones clínicas incluyen ceguera nocturna, constricción progresiva de los campos visuales, agudeza visual gradualmente reducida y cambio degenerativo del fondo de ojo. El examen fundoscópico generalmente revela discos pálidos cerosos, atenuación de las arterias retinianas y degeneración retiniana<sup>19, 20</sup>. (Figura. 1)

La degeneración retiniana ocurre inicialmente y más significativamente en la región periférica media del fondo del ojo, mostrando un cambio degenerativo similar a una alfombra en la pigmentación típica de la espícula ósea. Aunque la pigmentación de la espícula ósea se describe con frecuencia como un signo típico de retinitis pigmentosa, algunos pacientes solo presentan un cambio similar a una alfombra apenas reconocible, especialmente aquellos pacientes en la etapa temprana de la enfermedad. La degeneración macular generalmente se observa en la etapa tardía de la enfermedad, pero se observa con mayor frecuencia en pacientes con RP autosómica recesiva<sup>1,3</sup>.

La expresión variable en los cambios de fondo puede estar presente en diferentes pacientes por diferentes causas, en diferentes pacientes causados por mutaciones en el mismo gen, en diferentes pacientes de la misma familia, y probablemente incluso en diferentes ojos del mismo paciente. Así, la RP ocurre principalmente sola como una forma no sindrómica, mientras que en una pequeña fracción de casos puede desarrollarse en asociación con otras enfermedades oculares o sistémicas como una forma sindrómica<sup>3</sup>. El síntoma inicial puede notarse desde la primera infancia hasta la edad adulta tardía. En casos raros, la enfermedad en etapas tardías puede ser difícil de diferenciar de otras enfermedades<sup>1,3</sup>.

También es posible que la RP de inicio temprano muestre signos y síntomas superpuestos con la amaurosis congénita de Leber<sup>7-9</sup>. A veces, se pueden observar cambios degenerativos de la retina en niños sin ningún síntoma. La evaluación sistémica del fondo de ojo, especialmente la región periférica media, proporciona pistas útiles para el diagnóstico inicial, mientras que la electroretinografía generalmente ayuda a confirmar el diagnóstico. Otros tipos de examen, como la tomografía de coherencia óptica y la angiografía con fluoresceína del fondo de ojo, pueden no ser necesarios para el diagnóstico clínico de rutina<sup>7</sup>.

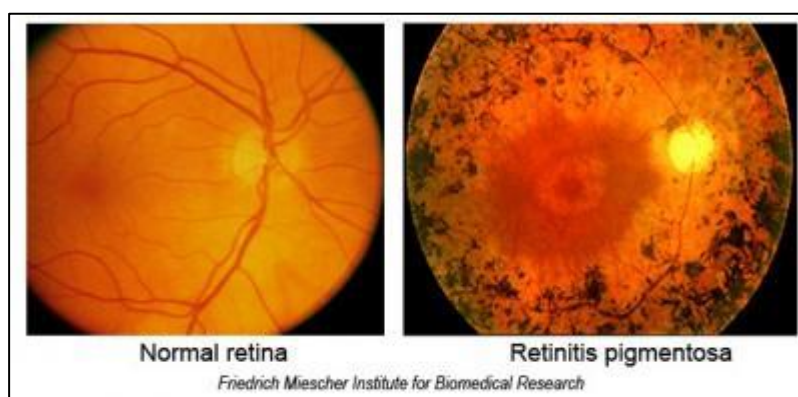


Fig.1: Retina normal y retina afectada RP

## 2.2.Herencia

La RP puede transmitirse con un patrón genético autosómico dominante (30% a 40% de los casos), autosómico recesivo (50 a 60% de los casos) o rasgo ligado al cromosoma X (5 a 15% de los casos)<sup>3</sup>. En algunos casos, se han descrito formas mitocondriales o digénicas<sup>6,7</sup>. Aunque los casos esporádicos o únicos de RP son los más frecuentes clínicamente, la enfermedad puede transmitirse como cualquiera de esas formas dependiendo de las mutaciones y genes<sup>3</sup>.

En casos raros, la enfermedad dominante en realidad puede pertenecer a un rasgo recesivo o un rasgo ligado a X, mientras que la enfermedad en un estado que parece ser autosómico recesivo en realidad puede ser causada por una mutación dominante debido al mosaicismo somático<sup>8</sup>. Por lo tanto, el asesoramiento genético debe combinar cuidadosamente la información genealógica con el análisis de mutaciones sistémicas.

## 2.3. Genes y mutaciones

Desde el descubrimiento del primer gen responsable de la RP en 1990, se ha informado que mutaciones en al menos 79 genes son responsables de la enfermedad (Tabla 1).

Tabla 1: Genes y loci para la retinitis pigmentosa

Categoría de la enfermedad	Loci mapeados (no identificados)	Genes mapeados e identificados
<b>RP, autosómica dominante</b>	RP63	BEST1, CA4, CRX, FSCN2, GUCA1B, HK1, IMPDH1, KLHL7, NR2E3, NRL, OR2W3, PRPF3, PRPF4, PRPF6, PRPF8, PRPF31, PRPH2, RDH12, RHO, ROM1, RP1, RP9, RPE65, SEMA4A, SNRNP200, SPP2, TOPORS
<b>RP, autosómica recesiva</b>	RP22, RP29, RP32	ABCA4, ARL6, ARL2BP, BBS1, BBS2, BEST1, C2orf71, C8orf37, CERKL, CLRN1, CNGB1, CNGB1, CRB1, CYP4V2, DHDDS, DHX38, EMC1, EYS, FAM161A, GPR125, HGSNAT, IDH3B, IFT140, IFT172, IMPG2, KIAA1549, KIZ, LRAT, MAK, MERTK, MVK, NEK2, NEUROD1, NR2E3, NRL, PDE6A, PDE6B, PDE6G, PRC1, PROM1, RBP3, RGR, RHO, RLBP1, RP1, RP1L1, RPE65, SAG, SLC7A14, SPATA7, TTC8, TULP1, USH2A, ZNF408, ZNF513
<b>Retinitis pigmentosa, ligada al cromosoma X</b>	RP6, RP24, RP34	OFD1, RP2, RPGR

Fuente: <https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm#A-genes>

Las proporciones de mutaciones para genes individuales pueden diferir ligeramente en diferentes poblaciones étnicas, pero los genes principales que contribuyen a la RP son similares. El análisis sistémico de todos estos genes puede identificar mutaciones en aproximadamente el 60% de las familias<sup>3, 10-15</sup>. Aproximadamente dos tercios de las mutaciones se encuentran en los 7 genes principales, como CYP4V2, RHO, USH2A, RPGR, CRB1, RP2 y CHM.

Para que un gen se confirme como responsable de la RP debe verificarse a nivel familiar, ya que no todas las mutaciones registradas son realmente causales. La aclaración adicional del papel de estos genes y sus variantes en la RP se basa en gran medida en el análisis de secuenciación sistémica de todos estos genes en diferentes poblaciones,

incluidos pacientes y controles, junto con un cuidadoso análisis de genotipo-fenotipo<sup>21,22</sup>. Se espera que los datos generados por la secuenciación tanto del exoma como del genoma completos en los próximos años sean de gran ayuda para definir las mutaciones causales de las variantes benignas. El estudio funcional de las variantes *in vitro* puede proporcionar pistas útiles para comprender la patogénesis de una mutación, pero puede que no siempre nos dé la respuesta correcta<sup>23</sup>.

Los modelos animales transgénicos proporcionan una herramienta valiosa no solo para confirmar el papel causal de una mutación sino también para dilucidar la fisiopatología de la enfermedad. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la misma mutación puede conducir a diferentes fenotipos entre ratones y seres humanos.<sup>24</sup> La identificación de una mutación en un paciente proporciona no solo un marcador confiable para el diagnóstico genético y el asesoramiento genético firme, sino también un objetivo claro para el gen futuro basada en la terapia. La evaluación cuidadosa de los datos clínicos y el estudio de seguimiento pueden enriquecer la comprensión de la enfermedad sobre la base de genes individuales y, por lo tanto, establecer criterios para la reclasificación de la enfermedad basada en genes en el futuro.

#### **2.4. De la mutación en la proteína a la degeneración retiniana**

La pérdida de fotorreceptores en la RP se considera mediada por la apoptosis<sup>25</sup>, pero los mecanismos precisos desde la activación de esta vía hasta la pérdida celular aún no se han definido de manera inequívoca. Comprender cómo una mutación conduce a la pérdida de fotorreceptores es fundamental para desarrollar posibles terapias. Los análisis de mutaciones individuales en diferentes genes que afectan a los diferentes factores, pueden estar involucrados en el progreso de una mutación hacia la pérdida de fotorreceptores, como respuesta al mal plegado de proteínas y al estrés del retículo endoplásmico<sup>26,27</sup>, en su localización anormal o tráfico de proteínas relacionadas<sup>28,29</sup> fagocitosis defectuosa<sup>30</sup>, activación de Bax,<sup>31</sup> y estrés oxidativo<sup>32</sup>.

Sin embargo, este tipo de cambios pueden verse en otras formas de enfermedades. Es razonable suponer que una o varias vías únicas pueden mediar el desarrollo de la RP porque la enfermedad sola podría ser causada por mutaciones en varios genes expresados universalmente. Además, algunas de las vías únicas pueden ser comunes en algún nivel porque la misma enfermedad podría ser causada por una gran cantidad de mutaciones en

al menos 79 genes, que codifican proteínas involucradas en diferentes compartimentos estructurales o funcionales de las células bastón<sup>33</sup>.

En el futuro, el análisis comparativo sistemático de transcriptomas<sup>34-38</sup>, basado en diferentes modelos animales y iPSC específicos del paciente<sup>39</sup>, puede proporcionar una idea para comprender las vías comunes y las moléculas clave asociadas que median las diferentes mutaciones que conducen a la muerte celular de los fotorreceptores, pudiendo así revelar, por lo tanto, objetivos potenciales para intervención terapéutica en RP.

## **2.5. Factores que afectan potencialmente el progreso de la enfermedad**

Evitar la exposición a la luz intensa, un comportamiento de lectura adecuado, un estilo de vida diario saludable y una dieta equilibrada pueden considerarse factores beneficiosos. Hasta ahora, la revisión sistemática de ensayos clínicos aleatorios no encontró evidencia clara para apoyar la efectividad del tratamiento médico en la prevención de la progresión de la RP, incluida la terapia con vitamina A, aceite de pescado (ácido docosahexaenoico), ácido valproico, suministro de oxígeno hiperbárico, tartrato de brimonidina tópico, gangliósidos, luteína, nilvadipino oral o factor neurotrófico ciliar<sup>4,11,40</sup>.

Por el contrario, otros estudios informaron que el factor neurotrófico ciliar, el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial y el factor neurotrófico derivado del cerebro mostraron protección contra la degeneración de los fotorreceptores en un ratón transgénico modelo de RP<sup>4, 26, 41</sup>.

Además, la sobreexpresión de histona desacetilasa 4 o su dominio N-terminal corto preserva los fotorreceptores y restaura la función visual en ratones rd1<sup>42</sup>. Otros tratamientos farmacológicos potenciales pueden prevenir el estrés oxidativo, factores antiapoptóticos, mejorando el plegamiento correcto de proteínas y disminución del estrés del retículo endoplásmico. Sin embargo, no se espera que ningún método único prevenga con éxito la pérdida de fotorreceptores<sup>43</sup>, y ninguno de estos tratamientos potenciales se ha utilizado como procedimiento de rutina en la práctica clínica.

### 3. Optogenética

Optogenética es el nombre colectivo de la tecnología relacionada con el control de eventos biológicos por estimulación óptica<sup>44</sup>. Se descubrió en 2005 que el potencial de acción que se dispara en las neuronas de mamíferos podría controlarse ópticamente alterando genéticamente las membranas celulares para expresar el canal catiónico no específico, sensible a la luz azul de 470 nm, *Channelrhodopsin-2* (ChR2), que se encuentra naturalmente en las algas verdes *Chlamydomonas reinhardtii*<sup>45,46</sup>. Aunque la estimulación a través de la fotoactivación de ChR2 depende mucho del tiempo de exposición a la luz (Figura. 2), se ha demostrado que se pueden generar potenciales de acción con intensidades tan bajas como  $1 \text{ mW mm}^{-2}$ <sup>44</sup>. Este enfoque permite la orientación de tipos de células específicas que no es posible con el estímulo de electrodos tradicional<sup>46</sup>.

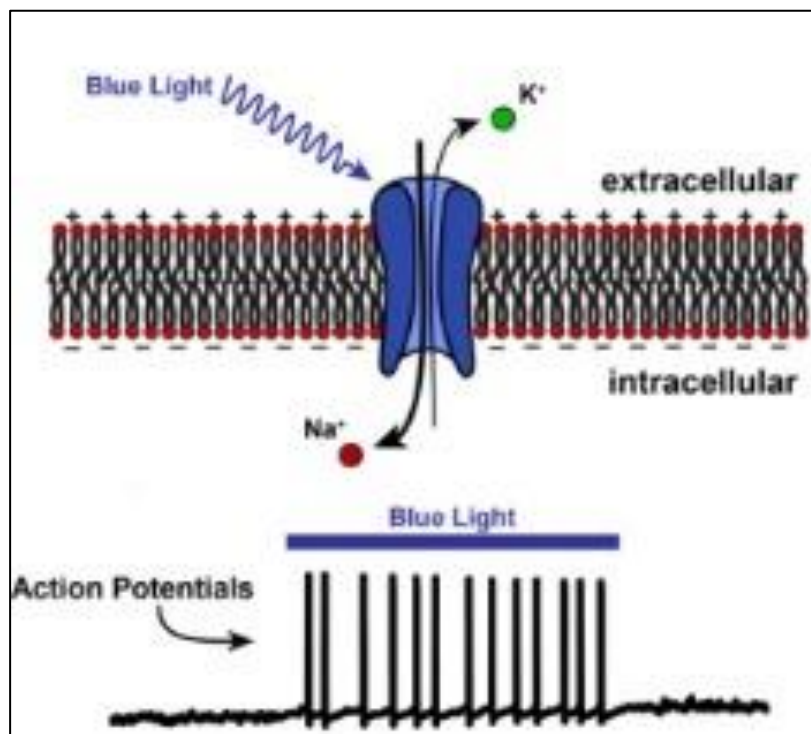


Fig.2: Cuando la luz azul ilumina ChR2, este se abre, permitiendo que los iones cargados positivamente atraviesen la membrana celular. Esto “activa” la neurona produciendo muchos potenciales de acción.

### 3.1. Fundamentos de la optogenética

Naturalmente, la comunicación entre las neuronas se realiza tanto eléctrica como químicamente. En la mayoría de los casos, la señal eléctrica se usa para transferir la información en una sola neurona, mientras que la química se usa en las comunicaciones interneuronales<sup>47</sup>. En la estimulación eléctrica, el potencial de acción, se propaga desde las dendritas a los axones y estimula la liberación de neurotransmisores para las comunicaciones inter-neuronales de sinapsis. El método más común para controlar las comunicaciones neuronales es usar la estimulación eléctrica y luminosa (optogenética). Al comparar ambos métodos, la optogenética ofrece una mayor precisión en la selección de neuronas específicas, minimiza el estrés celular en comparación con la estimulación eléctrica y crea menos interferencia con las células circundantes. La optogenética es un método para manipular artificialmente la comunicación neuronal utilizando luz a una longitud de onda específica<sup>47, 48</sup>

Según sus características, la construcción optogenética puede tener efectos excitadores o inhibitorios. El potencial postsináptico excitatorio (PEPS) se refiere al caso en que la membrana celular se despolariza como resultado de la apertura de los canales de membrana de iones de sodio y calcio, lo que hace que se genere un potencial de acción. Por otro lado, el potencial postsináptico inhibitorio (PIPS) es cuando la membrana celular se hiperpolariza causada por la apertura de los canales de la membrana de iones de cloruro o potasio, lo que resulta en el bloqueo de la generación de potencial de acción. En optogenética, la *Channelrhodopsin-2* (ChR2) exhibe características excitadoras. Esta construcción se obtiene mediante la ingeniería genética de las neuronas con las opsinas de la bacteria ya mencionada *Chlamydomonas reinhardtii*<sup>48</sup>.

La iluminación con luz azul desencadena la generación del potencial de acción. Para un efecto inhibitorio, la hiperpolarización se puede hacer de dos maneras, usando bombas de cloruro o de protones. La bomba de cloruro utiliza la *halorodopsina* (NpHR) de *Archaeon Natronomonas pharaonis*<sup>47</sup>. La versión mejorada de NpHR se llama eNpHR3.0, que puede activarse con luz verde, amarilla o roja. Durante su activación, las puertas del canal de iones de cloruro se abren, llevando iones de cloruro a las células. La bomba de protones es la alternativa de la bomba de cloruro para realizar el efecto inhibitorio.

Para crear bombas de protones, hay cuatro tipos de herramientas optogenéticas que se pueden usar: *archaerhodopsin-3* (Arch) de *Halorubrum sodomense*, el (Mac) del hongo *Leptosphaeria maculans*, *archaerhodopsin* (ArchT) de *Halorubrum* cepa TP009 y eBR (una versión mejorada de *bacteriorhodopsin* de *Halobacterium salinarum*)<sup>48</sup>.

### 3.2.Opsinas microbianas en la regeneración visual

La estrategia optogenética para la restauración de la visión se basa en un concepto simple: la conversión genética de las neuronas retinianas insensibles a la luz en células fotosensibles que imparten sensibilidad a la luz después de la muerte de los fotorreceptores de bastones y cono<sup>50</sup>. Dos cuestiones son importantes para la viabilidad de esta estrategia.

#### 1) Estado de las células fotorreceptoras en retinas degeneradas

Fundamental para la viabilidad de la aproximación optogenética es la preservación anatómica y funcional de las neuronas retinianas internas después de la muerte de las células fotorreceptoras. Este requisito previo también ha sido la clave para otras estrategias de restauración de la visión basadas en la retina, como la implantación de dispositivos y el trasplante de fotorreceptores.

#### 2) Las herramientas optogenéticas

Para la viabilidad de esta estrategia es fundamental la disponibilidad de sensores de luz adecuados que cumplan dos criterios: (a) están codificados genéticamente para que puedan insertarse permanentemente en las neuronas de la retina, y (b) la activación por la luz puede alterar el potencial de membrana de la célula. Los candidatos obvios para tales sensores de luz, o herramientas optogenéticas, son las rodopsinas, que son los sensores de luz natural del sistema biológico ocular. Las rodopsinas se clasifican en dos grupos, rodopsinas animales y microbianas<sup>51</sup>.

**Rodopsinas animales:** Los primeros estudios estudiaron rodopsinas de vertebrados e invertebrados para conferir sensibilidad a la luz en las neuronas<sup>52</sup>, pero la necesidad de reconstruir múltiples componentes para la cascada de señalización en las neuronas representa un gran inconveniente práctico. La melanopsina, un homólogo del fotopigmento de rodopsina de vertebrados, se expresa en una pequeña población de



células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles que regulan las reacciones a la luz que no forman imágenes, como el ritmo circadiano y el reflejo pupilar<sup>53</sup>, funciona de manera diferente a los fotopigmentos en los bastones y conos.

La melanopsina alberga el 11-*cis*-retinal como cromóforo, pero su isomerización es reversible y la cascada de señalización de la melanopsina es más parecida a la encontrada en las rodopsinas de invertebrados (Figura 3).

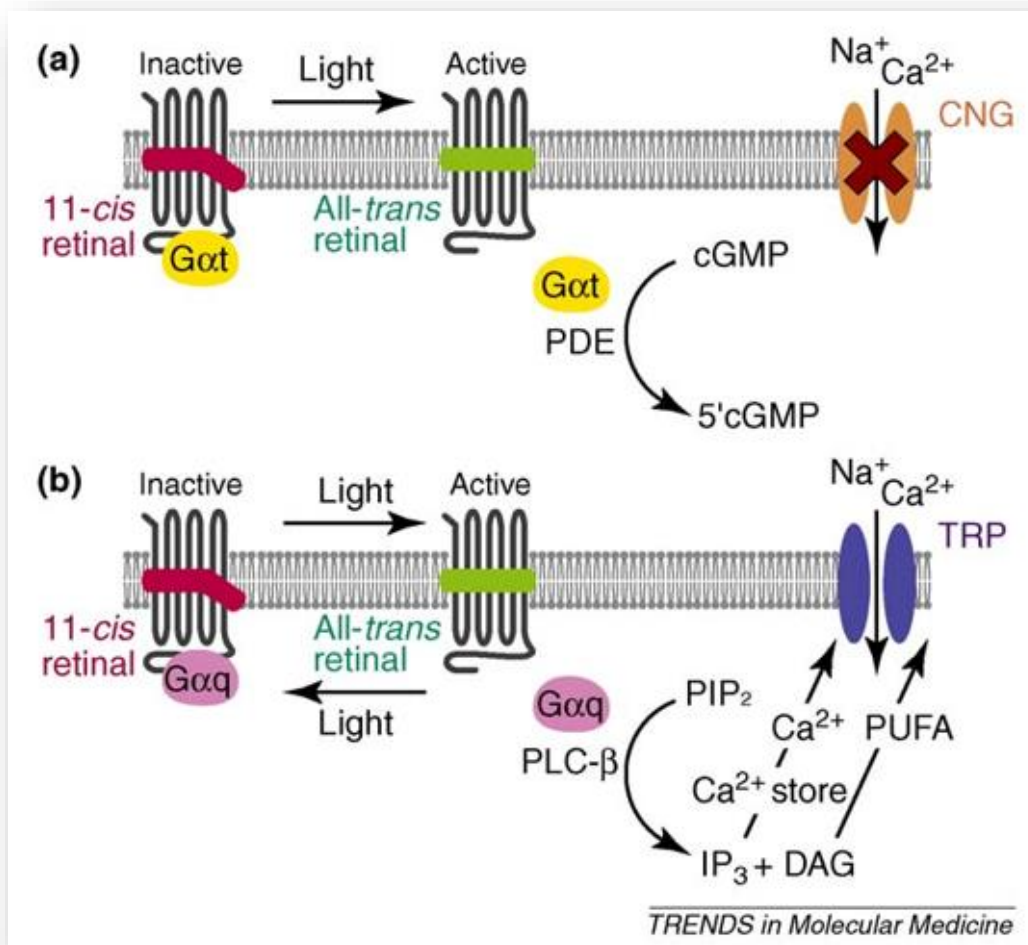


Figura 3: Mecanismos de fototransducción de rodopsinas de vertebrados e invertebrados clásicos<sup>53</sup>

Además, se ha determinado que los componentes necesarios para la vía de señal de melanopsina existían en todas las células ganglionares de la retina<sup>54</sup>. Por lo tanto, la expresión de melanopsina sola es capaz de proporcionar fotocorriente en células ganglionares de la retina no sensibles a la luz. Sin embargo, el uso de melanopsina para

la optogenética también tiene un inconveniente importante: su lenta cinética de activación y desactivación.

***Rodopsinas microbianas.*** Actualmente, las rodopsinas microbianas representan la opción preferida para la restauración de la visión debido a su simplicidad, cinética de respuesta rápida y disponibilidad como herramientas de despolarización e hiperpolarización celular. El principal inconveniente del uso de rodopsinas microbianas en la restauración de la visión es su baja sensibilidad a la luz. Sin embargo, como se discute a continuación, esta limitación ha sido parcialmente superada por el reciente desarrollo de variantes más sensibles a la luz<sup>55, 56</sup>.

### **3.3.Últimos desarrollos de la optogenética**

Los métodos optogenéticos han entrado en un amplio uso y desarrollo en relación con las tareas neurofisiológicas, y en el futuro cercano las herramientas optogenéticas mejorarán probablemente aún más, abriendo nuevas posibilidades para los investigadores<sup>57</sup>. Las principales ventajas de los métodos optogenéticos son su especificidad para células con fenotipos definidos por construcciones genéticas, y la capacidad de controlar la dinámica de procesos excitadores e inhibitorios con precisión, utilizando canales de membrana sensibles a la luz, es decir, rodopsinas.

Los primeros experimentos con optogenética se realizaron en invertebrados: moscas (*Drosophila melanogaster*) y nemátodos (*Caenorhabditis elegans*)<sup>58</sup>. Ahora se han superado las limitaciones y se han desarrollado construcciones de virus para estudios efectivos en cerebros de vertebrados<sup>59</sup>.

La aplicación de la optogenética en combinación con otro método de investigación ha ampliado los límites de nuestra comprensión. Se han obtenido resultados interesantes utilizando métodos optogenéticos en combinación con otros enfoques experimentales: registro extracelular e intracelular de la actividad neuronal, registro de potenciales locales, electrocardiograma, neuroimagen, resonancias magnéticas funcionales y pruebas de comportamiento<sup>57</sup>.

En combinación con métodos electrofisiológicos y pruebas de comportamiento en animales en diferentes condiciones experimentales, la optogenética permite que grupos

individuales de neuronas se identifiquen, manipulen y registren en experimentos en el cuerpo vivo, con propuestas para las funciones de estas células, la identificación de sus roles en procesos observados en el cerebro y estudios de interacciones en redes neuronales.

#### **4. Aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la RP**

##### **4.1. Terapia génica y celular**

En las últimas décadas, se han ideado varias terapias para el tratamiento de la RP con terapia génica y terapia con células, terapia de neuroprotección y otros tratamientos alternativos<sup>6, 8, 15, 17, 60</sup>.

##### **4.1.1. Terapia con células madre**

Se han aislado varios tipos de células madre de una variedad de tejidos, incluidos embriones previos a la implantación, fetos, tejidos asociados con el parto y órganos adultos. Según la fuente, estas células pueden clasificarse ampliamente en células madre derivadas de embriones (ESC) y células madre derivadas de tejido adulto. Y basándose en marcadores bioquímicos y genómicos, estas células madre pueden clasificarse en términos generales en ESC, células madre mesenquimales (MSC), células madre hematopoyéticas (HPSC) y células madre pluripotentes inducidas (IPSC)<sup>25, 61</sup>.

La terapia con células madre es un enfoque novedoso para la restitución de la visión en la RP<sup>61</sup>. El trasplante de células madre que pueden ser estimuladas para convertirse en fotorreceptores de sustitución y apoyar las células de la retina externa, teóricamente puede conducir a tratamientos que restauren la función visual<sup>62</sup>. En los últimos años, la terapia de trasplante de células madre en RP ha progresado mucho. Los mecanismos de la terapia con células madre para esta enfermedad incluyen los siguientes (ver tabla 2).

*Tabla 2: Mecanismos de la terapia con células madre para la RP<sup>63-66</sup>*

---

<b>Reemplazo celular</b>	Las células madre trasplantadas pueden diferenciarse en células retinianas e integrarse en la retina de los pacientes, y las células madre diferenciadas reemplazan las células retinianas apoptóticas o lesionadas <sup>63</sup>
--------------------------	---

---

<b>Apoyo nutricional</b>	La función de las células trasplantadas es liberar factores difusibles y sustancias nutricionales que actúan como un sistema local de entrega de células para los factores tróficos y pueden promover la supervivencia de las células fotorreceptoras <sup>64</sup>
<b>Protección de los vasos sanguíneos y conos retinianos</b>	Las células madre derivadas de la médula ósea contienen precursores endoteliales. Mediante una regulación positiva significativa de muchos genes antiapoptóticos, estas células madre pueden rescatar los vasos sanguíneos de la retina que normalmente se degenerarían por completo <sup>65</sup>
<b>Promoción de conexiones sinápticas</b>	Muchos estudios han demostrado que las células de donantes tomadas del desarrollo de la retina de ratón en un momento coincidente con el pico de la génesis de los bastones, pueden combinarse con las células de un adulto normal o una retina de ratón en degeneración y, posteriormente, construir conexiones sinápticas con el resto células de la retina y, por lo tanto, mejorar efectivamente la función visual <sup>66</sup>

A pesar del progreso reciente realizado por la terapia de trasplante de células madre como tratamiento para la degeneración de la retina, quedan muchos desafíos. En primer lugar, debe resolverse el problema de la baja tasa de supervivencia y migración de células madre. En segundo lugar, a pesar de que la retina está aislada físicamente del sistema inmune, la respuesta inmune que se desencadena cuando las células madre se trasplantan al espacio subretiniano durante la terapia dificultando su supervivencia, no puede ignorarse. En tercer lugar, hay algunos problemas de bioseguridad. Por ejemplo, no se puede descartar la formación de tumores por trasplantes y, por lo tanto, no se puede descartar la falta de idoneidad terapéutica de las células madre trasplantadas, que incluyen factores como la edad del paciente<sup>67</sup>.

#### **4.1.2. Factores neurotróficos**

La neuroprotección proporciona un entorno simpático para prolongar la viabilidad de los fotorreceptores por su efecto sobre las vías bioquímicas secundarias. Es una estrategia terapéutica que se puede lograr mediante la administración de factores de

crecimiento neurotróficos, por un lado, o la inhibición de las vías proapoptóticas por el otro<sup>68</sup>.

También se puede administrar mediante la implementación de factores de viabilidad, como el factor de viabilidad del cono derivado de los bastones para el tratamiento de la enfermedad neurodegenerativa de la retina que es independiente de la etiología de la degeneración. Se han identificado una serie de factores de crecimiento neurotróficos que retrasan la muerte de los fotorreceptores en modelos animales: factor de crecimiento derivado de fibroblastos (FCF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), cardiotrofina-1, factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor neurotrófico ciliar (CNTF). La vía común final de todos los tipos de RP es la muerte celular fotorreceptora por apoptosis<sup>68</sup>.

Se ha demostrado que varios factores neurotróficos protegen a los fotorreceptores de la degeneración, incluido el CNTF. En diferentes modelos animales de degeneración retiniana, se demostró que CNTF retrasa la degeneración de fotorreceptores<sup>68, 70</sup>. Se observó una capa nuclear externa más gruesa en los animales tratados con este factor, lo que reflejaba la preservación de los fotorreceptores y el rescate anatómico. Los registros electrofisiológicos realizados para evaluar la función retiniana, demostraron una mejora en las respuestas escotópicas y fotópicas registradas de los ojos tratados con CNTF en comparación con los ojos no tratados<sup>68</sup>.

Si bien los factores neuroprotectores pueden ofrecer resultados prometedores en el tratamiento de la RP en modelos animales, se deben desarrollar estrategias de tratamiento efectivas para su uso clínico. Se han realizado inyecciones directas de factor neurotrófico intravítreo o subretiniano en modelos animales con efecto terapéutico<sup>71</sup>; sin embargo, un dispositivo implantable permite resultados a largo plazo evitando inyecciones repetidas con el riesgo de complicaciones mecánicas o infecciosas. La terapia génica *ex vivo* es un enfoque prometedor mediante el cual las células epiteliales de pigmento retiniano humano encapsuladas genéticamente se implantan en el vítreo a través de un dispositivo celular<sup>72</sup>.

### 4.1.3. Optogenética

La terapia génica es prometedora para una amplia variedad de enfermedades humanas hereditarias. Hasta la fecha, la terapia génica ocular (optogenética) se ha probado con éxito en ratones, perros y recientemente en algunos humanos. La optogenética requiere modificación genética de células oculares mutantes para producir un efecto terapéutico. Las enfermedades de la retina son objetivos excelentes de la optogenética, ya que en muchos casos se entiende la etiología genética y hay acceso a los fotorreceptores o al epitelio pigmentario de la retina (EPR) mediante inyección subretiniana. Además, están disponibles modelos animales transgénicos y que proporcionan evidencia preclínica de seguridad y eficacia. La optogenética requiere primero identificar la causa genética de la RP y luego genotipar a los pacientes para detectar mutaciones en ese gen antes de inscribirse en ensayos de terapia génica<sup>73</sup>.

Las estrategias de terapia génica difieren mucho dependiendo de la herencia de la enfermedad o más exactamente del tipo de mutación objetivo. Algunas formas de RP se deben a mutaciones de pérdida de función (generalmente autosómicas y recesivas ligadas al cromosoma X). Para que la optogenética sea efectiva, la terapia debe reemplazar el producto génico faltante o insuficiente. Por ejemplo, Tan et al., utilizaron vectores adenovirales AAV para transducir dos modelos de RP en ratones debido a la deficiencia de proteína tipo receptor de hidrocarburo arilo 1 (Aip11) (mutante hipomórfico) y ausencia (mutante nulo), estableciendo el potencial de la terapia de reemplazo génico en la condición humana<sup>73</sup>.

El mecanismo en la terapia génica hace uso de dos métodos para reemplazar o corregir genes anómalos: (1) terapias de aumento de genes, donde se inserta un gen normal en el genoma para reemplazar genes no viables o enfermos utilizando un vector portador; (2) terapias de silenciamiento génico, en las que la expresión del gen mutado se inhibe mediante el uso de ribozima o ARN de interferencia<sup>74</sup>. Las terapias de aumento exitosas dependen de la transducción eficiente de la célula objetivo por el virus AAV y la expresión sostenida del virus recombinante a un nivel suficiente. Hasta la fecha, más de 30 pacientes han recibido este tipo de terapia génica, con un seguimiento de 90 días a 1,5 años y no se han detectado efectos secundarios importantes<sup>74</sup>.

Se han propuesto dos enfoques para silenciar el gen anormal: ribozimas e interferencia de ARN (ARNi). La eliminación de la interferencia de ARN (ARNi) es una estrategia terapéutica eficaz para silenciar genes causantes de distrofias retinianas dominantes<sup>75</sup>. Algunos estudios mostraron que la eliminación de alelos específicos o no específicos de un mutante dominante GCAP1 puede mejorar la distrofia de fotorreceptores en modelos dominantes de RP y distrofia de cono-bastón causados por mutaciones en el gen GCAP1<sup>75</sup>.

Sin embargo, puede ser difícil juzgar qué modelo es más relevante para una condición específica en humanos. Algunas de las mutaciones entre humanos y animales no son similares. La mutación y el fenotipo en el modelo animal deben verse con cierto grado de precaución. Por lo tanto, no se puede suponer que estos son realmente representativos de la enfermedad que está ocurriendo en el paciente hasta que los fenotipos se examinen críticamente utilizando los mismos criterios. Las iniciativas de investigación clínica traslacional finalmente ofrecen esperanza a los familiares y pacientes con RP, pero la seguridad de estas técnicas aún no se ha establecido en grandes experimentos comparativos entre animales de laboratorio y humanos<sup>75</sup>.

#### **4.1.4. Trasplantes**

El trasplante de retina coloca láminas de células epiteliales de retina y pigmento retiniano en desarrollo en el espacio subretiniano<sup>76</sup>. Considerando que los trasplantes de adultos se han realizado en humanos con RP y degeneración macular relacionada con la edad<sup>77</sup> los trasplantes no han causado daño, pero no hay evidencia de que las células del tejido trasplantado se mezclen o desarrollen conexiones sinápticas. Radtke et al., informaron eficacia y seguridad en el implante de retina fetal con RPE acompañante en pacientes con degeneración macular relacionada y RP con visión de 20/200. Siete de los diez pacientes estudiados mostraron una agudeza visual mejorada, lo que corrobora los resultados en modelos animales de degeneración retiniana<sup>78</sup>.

### **4.2. Otras aproximaciones terapéuticas**

#### **4.2.1. Protección de la luz**

La evidencia clínica y los datos de estudios en animales sugieren que algunas retinopatías pigmentarias son particularmente susceptibles al daño causado por la luz<sup>79</sup>.

Se recomienda a los pacientes con RP que usen lentes oscuras al aire libre. El uso de lentes ámbar debería bloquear los rayos ultravioletas y las longitudes de onda visibles hasta aproximadamente 527 nm. Al aire libre, es recomendable el uso de gafas que bloqueen los rayos ultravioletas y la luz hasta aproximadamente 550 nm para filtrar la luz azul<sup>79</sup>.

#### **4.2.2. Terapia con vitaminas u otros productos naturales**

La vitamina A puede proteger los fotorreceptores por sus efectos tróficos y antioxidantes. La suplementación a largo plazo (5 a 15 años) de vitamina A en dosis de 15,000 UI por día disminuyó la pérdida de amplitudes de ERG<sup>79</sup>. La vitamina E a 4.000 UI ha tenido efectos adversos. Los médicos continúan debatiendo las conclusiones de estos estudios<sup>80</sup>. No hay consenso sobre la utilidad del tratamiento con vitamina A. La vitamina A no debe administrarse a pacientes con RP causada por mutaciones en el gen ABCA4. En otro estudio, los pacientes con RP recibieron suplementos de ácido docosahexaenoico (DHA) a 1200 mg / día además de vitamina<sup>81</sup>.

Este estudio mostró que el curso de la enfermedad inicialmente se desaceleró mediante la adición de DHA; sin embargo, el efecto beneficioso no duró más de dos años. Berson et al., han informado sobre los beneficios para los pacientes con RP de una dieta rica en ácidos grasos omega-3<sup>81</sup>. Los pacientes con RP que tomaron palmitato de vitamina A, pero no cápsulas de DHA, se beneficiaron de una dieta rica en omega-3 (equivalente a comer salmón, atún, caballa, arenque o sardinas, una o dos veces por semana).

#### **4.2.3. Implantes**

Diferentes estudios han revisado el tratamiento de pacientes con RP con pérdida visual severa utilizando implantes epirretinianos o subretinianos<sup>83-85</sup>.

Caspi et al.<sup>86</sup> utilizaron una prótesis retiniana de 16 electrodos en un sujeto totalmente ciego con RP. El implante fue controlado de forma inalámbrica por una computadora externa y una cámara de video montada en la cabeza. La visión espacial se evaluó midiendo la respuesta del sujeto a los patrones de estimulación directa y comparando la capacidad del sujeto para identificar la orientación de las rejillas con el sistema encendido y apagado. Los resultados mostraron que la estimulación sincronizada



de diferentes ubicaciones de la retina podría producir visión espacial a largo plazo con un nivel de agudeza determinado por la distancia entre los electrodos.

Yanai et al<sup>87</sup>. evaluaron el rendimiento de la tarea visual en tres sujetos afectados de RP. Se implantó una prótesis epirretiniana en el ojo con peor visión y la entrada se controló de forma inalámbrica mediante una computadora o una cámara de video. Los sujetos obtuvieron mejores puntuaciones en 8 de 9 experimentos controlados por ordenador. Este estudio, aunque de tamaño pequeño, sugirió que una prótesis epiretinal de baja resolución podría proporcionar información visual para realizar tareas simples que eran imposibles con solo la visión de percepción de luz.

Se ha intentado utilizar electrodos subretinianos en modelos animales y los resultados indican que se puede inducir la actividad cortical y se han iniciado experimentos similares en humanos<sup>88</sup>. No se ha evaluado el efecto a largo plazo de los implantes, ni el efecto de los electrodos colocados entre la neurorretina y el epitelio pigmentario de la retina sobre la función metabólica de la retina.

## **5. Conclusiones**

La RP no es un trastorno único, sino una categoría de enfermedad degenerativa de la retina con más de 60 causas genéticas distintas que comparten similitudes fenotípicas. Es un diagnóstico devastador y una de las fronteras de la oftalmología. Aunque todavía se carecen de tratamientos, los avances en las imágenes de la retina han permitido un fenotipado profundo y han llevado a un diseño más efectivo de ensayos clínicos.

Se están diseñando y aplicando estrategias terapéuticas para ralentizar el proceso degenerativo, tratar las complicaciones oculares y ayudar con el impacto social y psicológico de la ceguera resultante de la RP.

Los enfoques de la terapia para la RP ahora incluyen: terapia génica, factores de crecimiento neurotróficos, agentes antiapoptóticos, terapia de ribozima, ARNi, trasplante de retina, suplementos dietéticos, prótesis de retina y terapia con células madre. Más recientemente, se han empezado a desarrollar también aproximaciones optogénicas

como las discutidas en este trabajo. Esperamos que, en el futuro, los descubrimientos del laboratorio se lleven al entorno clínico.

Los recientes avances en la terapia génica y la tecnología de células madre han posicionado el campo al borde de lo que muchos creen que será un gran avance en la estrategia terapéutica. La tecnología de prótesis retiniana ha permitido restaurar la vista a los ojos completamente ciegos "sin percepción de luz", una hazaña que antes era imposible.

La terapia génica ha mejorado los resultados visuales para al menos un subgrupo genético, y muchos tratamientos adicionales están bajo investigación clínica activa. Se espera que el paisaje cambie rápidamente y esto ofrezca esperanza a los afectados por estas incapacitantes patologías.

## **5.2. Limitaciones**

Las limitaciones del presente trabajo están sujetas a la heterogeneidad de los artículos, analizados y la disparidad en cuanto a la efectividad de los tratamientos para la RP. No se ha podido establecer el grado de efectividad de las intervenciones terapéuticas de la RP, ni se han determinado los posibles eventos adversos relacionados con cada uno de los tratamientos puntualizados.

## **5.3. Futuras investigaciones**

Para los pacientes con RP en etapa terminal, la pérdida de la mayoría de los fotorreceptores de bastón y cono conduce a una falta total de visión útil para la vida diaria. La visión artificial basada en prótesis epirretinianas o implantes subretinianos puede restaurar la vista de los pacientes ciegos pero los avances en este campo son más lentos de lo esperado.

El progreso en optogenética, ha permitido agregar proteínas fotosensibles a las células retinianas sobrevivientes, como las células bipolares o ganglionares, en pacientes con RP en etapa terminal con el objetivo de que estas células puedan convertirse directamente en células fotorreceptoras artificiales sensibles a la luz. El transcriptoma y

la proteómica de todo el genoma pueden revelar la vía común única y las moléculas clave asociadas que conectan las mutaciones y la muerte celular de los fotorreceptores en la RP.

La terapia génica basada en líneas de células madre específicas del paciente y la edición *in vivo* de genes (mediante la tecnología CRISP) pueden convertirse en las principales direcciones de la terapia basada en células y la terapia génica. Se espera que las células fotorreceptoras artificiales basadas en optogenética compitan con los implantes protésicos. Se espera, también, que el tratamiento médico dirigido a moléculas clave disminuya o evite el progreso de la degeneración retiniana. Las esperanzas de restaurar la visión de los pacientes con RP pueden hacerse realidad en un futuro cercano si se profundiza en estas investigaciones.

## 6. Bibliografía

1. Daiger SP, Sullivan LS, Bowne SJ. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Clinical genetics*. 2013 Aug;84(2):132-41.
2. Wright AF, Chakarova CF, El-Aziz MM, Bhattacharya SS. Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nature Reviews Genetics*. 2010 Apr;11(4):273.
3. Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. Genes and mutations causing autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015 Oct 1;5(10): a017129.
4. Sahaboglu A, Paquet-Durand O, Dietter J, Dengler K, Bernhard-Kurz S, Ekström PA, Hitzmann B, Ueffing M, Paquet-Durand F. Retinitis pigmentosa: rapid neurodegeneration is governed by slow cell death mechanisms. *Cell death & disease*. 2013 Feb;4(2): e488.
5. Bhalla S, Joshi D, Bhullar S, Kasuga D, Park Y, Kay CN. Long-term follow-up for efficacy and safety of treatment of retinitis pigmentosa with valproic acid. *British Journal of Ophthalmology*. 2013 Jul 1;97(7):895-9.
6. Smith AJ, Bainbridge JW, Ali RR. Prospects for retinal gene replacement therapy. *Trends in Genetics*. 2009 Apr 1;25(4):156-65.
7. Bainbridge JW, Mehat MS, Sundaram V, Robbie SJ, Barker SE, Ripamonti C, Georgiadis A, Mowat FM, Beattie SG, Gardner PJ, Feathers KL. Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis. *New England Journal of Medicine*. 2015 May 14;372(20):1887-97.
8. Campbell JP, McFarland TJ, Stout JT. Ocular gene therapy. In *Retinal Pharmacotherapeutics 2016* (Vol. 55, pp. 317-321). Karger Publishers.
9. Testa F, Maguire AM, Rossi S, Marshall K, Auricchio A, Melillo P, Bennett J, Simonelli F. Evaluation of ocular gene therapy in an Italian patient affected by congenital Leber amaurosis type 2 treated in both eyes. In *Retinal Degenerative Diseases 2016* (pp. 533-539). Springer, Cham.

10. Ashtari M, Zhang H, Cook PA, Cyckowski LL, Shindler KS, Marshall KA, Aravand P, Vossough A, Gee JC, Maguire AM, Baker CI. Plasticity of the human visual system after retinal gene therapy in patients with Leber's congenital amaurosis. *Science translational medicine*. 2015 Jul 15;7(296):296ra110-.
11. Ghazi NG, Abboud EB, Nowilaty SR, Alkuraya H, Alhommadi A, Cai H, Hou R, Deng WT, Boye SL, Almaghami A, Al Saikhan F. 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*. 2016 Mar 1;135(3):327-43.
12. Mussolino C, Sanges D, Marrocco E, Bonetti C, Di Vicino U, Marigo V, Auricchio A, Meroni G, Surace EM. Zinc-finger-based transcriptional repression of rhodopsin in a model of dominant retinitis pigmentosa. *EMBO molecular medicine*. 2011 Mar 1;3(3):118-28.
13. Léveillard T, Sahel JA. Rod-derived cone viability factor for treating blinding diseases: from clinic to redox signaling. *Science translational medicine*. 2010 Apr 7;2(26):26ps16-.
14. Nakazawa M, Ohguro H, Takeuchi K, Miyagawa Y, Ito T, Metoki T. Effect of nilvadipine on central visual field in retinitis pigmentosa: a 30-month clinical trial. *Ophthalmologica*. 2011;225(2):120-6.
15. Dahlmann-Noor A, Vijay S, Jayaram H, Limb A, Khaw PT. Current approaches and future prospects for stem cell rescue and regeneration of the retina and optic nerve. *Canadian Journal of Ophthalmology*. 2010 Aug 1;45(4):333-41.
16. Zrenner E, Bartz-Schmidt KU, Benav H, Besch D, Bruckmann A, Gabel VP, Gekeler F, Greppmaier U, Harscher A, Kibbel S, Koch J. Subretinal electronic chips allow blind patients to read letters and combine them to words. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2010 Nov 3;278(1711):1489-97.
17. Busskamp V, Duebel J, Balya D, Fradot M, Viney TJ, Siegert S, Groner AC, Cabuy E, Forster V, Seeliger M, Biel M. Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *science*. 2010 Jul 23;329(5990):413-7.
18. Reiner A, Isacoff EY. The Brain Prize 2013: the optogenetics revolution. *Trends in neurosciences*. 2013 Oct 1;36(10):557-60.

19. Zrenner E, Bartz-Schmidt KU, Benav H, Besch D, Bruckmann A, Gabel VP, Gekeler F, Greppmaier U, Harscher A, Kibbel S, Koch J. Subretinal electronic chips allow blind patients to read letters and combine them to words. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2010 Nov 3;278(1711):1489-97.
20. Gibson-Corley KN, Cranston C, Anfinson K, Kaalberg E, Han I, Slusarski DC, Goeken A, Businga T, Brown H, Mullins RF, Stone EM. Development of gene augmentation strategy for the treatment of MAK associated Retinitis Pigmentosa. *The FASEB Journal*. 2019 Apr;33(1\_supplement):802-20.
21. Zhang Q, Li S, Xiao X, Jia X, Guo X. The 208delG mutation in FSCN2 does not associate with retinal degeneration in Chinese individuals. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007 Feb 1;48(2):530-3.
22. Sharon D, Kimchi A, Rivolta C. OR2W3 sequence variants are unlikely to cause inherited retinal diseases. *Ophthalmic genetics*. 2016 Oct 1;37(4):366-8.
23. Li J, Zhang Q. PRIMPOL mutation: functional study does not always reveal the truth. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2015 Feb 1;56(2):1181-2.
24. Li J, Gao B, Xiao X, Li S, Jia X, Sun W, Guo X, Zhang Q. Exome sequencing identified null mutations in LOXL3 associated with early-onset high myopia. *Molecular vision*. 2016;22:161.
25. Sharma YR, Kapoor M. Cell-based therapy for retinal degenerative disease. *The Indian journal of medical research*. 2016 Jan;143(1):121.
26. Shinde V, Kotla P, Strang C, Gorbatyuk M. Unfolded protein response-induced dysregulation of calcium homeostasis promotes retinal degeneration in rat models of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Cell death & disease*. 2016 Feb;7(2):e2085.
27. Griciuc A, Aron L, Ueffing M. ER stress in retinal degeneration: a target for rational therapy?. *Trends in molecular medicine*. 2011 Aug 1;17(8):442-51.
28. Eblimit A, Nguyen TM, Chen Y, Esteve-Rudd J, Zhong H, Letteboer S, Van Reeuwijk J, Simons DL, Ding Q, Wu KM, Li Y. Spata7 is a retinal ciliopathy gene critical for correct RPGRIP1 localization and protein trafficking in the retina. *Human molecular genetics*. 2014 Nov 14;24(6):1584-601.
29. Rao KN, Li L, Anand M, Khanna H. Ablation of retinal ciliopathy protein RPGR results in altered photoreceptor ciliary composition. *Scientific reports*. 2015 Jun 11;5:11137.

30. Lukovic D, Castro AA, Delgado AB, Bernal MD, Pelaez NL, Lloret AD, Espejo RP, Kamenarova K, Sánchez LF, Cuenca N, Cortón M. Human iPSC derived disease model of MERTK-associated retinitis pigmentosa. *Scientific reports*. 2015 Aug 11;5:12910.
31. Zhang Q. Retinitis pigmentosa: progress and perspective. *The Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*. 2016 Jul 1;5(4):265-71.
32. Usui S, Oveson BC, Lee SY, Jo YJ, Yoshida T, Miki A, Miki K, Iwase T, Lu L, Campochiaro PA. NADPH oxidase plays a central role in cone cell death in retinitis pigmentosa. *Journal of neurochemistry*. 2009 Aug;110(3):1028-37.
33. Moreton J, Izquierdo A, Emes RD. Assembly, assessment, and availability of de novo generated eukaryotic transcriptomes. *Frontiers in genetics*. 2016 Jan 11;6:361.
34. Hou Y, Guo H, Cao C, Li X, Hu B, Zhu P, Wu X, Wen L, Tang F, Huang Y, Peng J. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas. *Cell research*. 2016 Mar;26(3):304.
35. Dong X, You Y, Wu JQ. Building an RNA sequencing transcriptome of the central nervous system. *The Neuroscientist*. 2016 Dec;22(6):579-92.
36. Angermueller C, Clark SJ, Lee HJ, Macaulay IC, Teng MJ, Hu TX, Krueger F, Smallwood SA, Ponting CP, Voet T, Kelsey G. Parallel single-cell sequencing links transcriptional and epigenetic heterogeneity. *Nature methods*. 2016 Mar;13(3):229.
37. Elkahlon AG, Hafko R, Saavedra JM. An integrative genome-wide transcriptome reveals that candesartan is neuroprotective and a candidate therapeutic for Alzheimer's disease. *Alzheimer's research & therapy*. 2016 Dec;8(1):5.
38. Yoshida T, Ozawa Y, Suzuki K, Yuki K, Ohyama M, Akamatsu W, Matsuzaki Y, Shimmura S, Mitani K, Tsubota K, Okano H. The use of induced pluripotent stem cells to reveal pathogenic gene mutations and explore treatments for retinitis pigmentosa. *Molecular brain*. 2014 Dec;7(1):45.
39. Megaw R, Mellough C, Wright A, Lako M. Use of induced pluripotent stem-cell technology to understand photoreceptor cytoskeletal dynamics in retinitis pigmentosa. *The Lancet*. 2015 Feb 26;385:S69.

40. Kumar A, Midha N, Gogia V, Gupta S, Sehra S, Chohan A. Efficacy of oral valproic acid in patients with retinitis pigmentosa. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2014 Sep 1;30(7):580-6.
41. Dalkara D, Kolstad KD, Guerin KI, Hoffmann NV, Visel M, Klimczak RR, Schaffer DV, Flannery JG. AAV mediated GDNF secretion from retinal glia slows down retinal degeneration in a rat model of retinitis pigmentosa. *Molecular Therapy*. 2011 Sep 1;19(9):1602-8.
42. Guo X, Wang SB, Xu H, Ribic A, Mohns EJ, Zhou Y, Zhu X, Biederer T, Crair MC, Chen B. A short N-terminal domain of HDAC4 preserves photoreceptors and restores visual function in retinitis pigmentosa. *Nature communications*. 2015 Aug 14;6:8005.
43. Zarbin M. Cell-based therapy for degenerative retinal disease. *Trends in molecular medicine*. 2016 Feb 1;22(2):115-34.
44. Deisseroth K. Optogenetics. *Nature methods*. 2011 Jan 1;8(1):26.
45. Shoham S, Deisseroth K. Special issue on optical neural engineering: advances in optical stimulation technology. *Journal of neural engineering*. 2010 Aug;7(4):040201.
46. Foutz TJ, Arlow RL, McIntyre CC. Theoretical principles underlying optical stimulation of a channelrhodopsin-2 positive pyramidal neuron. *Journal of neurophysiology*. 2012 Mar 21;107(12):3235-45.
47. Haitz R, Tsao JY. Solid-state lighting: 'The case' 10 years after and future prospects. *physica status solidi (a)*. 2011 Jan;208(1):17-29.
48. Chen S, Han Z, Elahi MM, Habib KM, Wang L, Wen B, Gao Y, Taniguchi T, Watanabe K, Hone J, Ghosh AW. Electron optics with pn junctions in ballistic graphene. *Science*. 2016 Sep 30;353(6307):1522-5
49. Shevchenko V, Mager T, Kovalev K, Polovinkin V, Alekseev A, Juettner J, Chizhov I, Bamann C, Vavourakis C, Ghai R, Gushchin I. Inward H<sup>+</sup> pump xenorhodopsin: Mechanism and alternative optogenetic approach. *Science advances*. 2017 Sep 1;3(9):e1603187.
50. Simunovic MP, Shen W, Lin JY, Protti DA, Lisowski L, Gillies MC. Optogenetic approaches to vision restoration. *Experimental eye research*. 2019 Jan 1;178:15-26.



51. Ernst OP, Lodowski DT, Elstner M, Hegemann P, Brown LS, Kandori H. Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms. *Chemical reviews*. 2013 Dec 23;114(1):126-63.
52. Magnus CJ, Lee PH, Atasoy D, Su HH, Looger LL, Sternson SM. Chemical and genetic engineering of selective ion channel–ligand interactions. *Science*. 2011 Sep 2;333(6047):1292-6.
53. Pan ZH, Lu Q, Bi A, Dizhoor AM, Abrams GW. Optogenetic approaches to restoring vision. *Annual review of vision science*. 2015 Nov 24;1:185-210.
54. Feldbauer K, Zimmermann D, Pintschovius V, Spitz J, Bamann C, Bamberg E. Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009 Jul 28;106(30):12317-22.
55. Fenno L, Yizhar O, Deisseroth K. The development and application of optogenetics. *Annual review of neuroscience*. 2011 Jun 21;34.
56. Bamberg E, Gärtner W, Trauner D. Introduction: Optogenetics and Photopharmacology.
57. Deisseroth K. Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nature neuroscience*. 2015 Aug 26;18(9):1213.
58. Husson SJ, Gottschalk A, Leifer AM. Optogenetic manipulation of neural activity in *C. elegans*: from synapse to circuits and behaviour. *Biology of the Cell*. 2013 Jun;105(6):235-50.
59. Galvan A, Hu X, Smith Y, Wichmann T. Effects of optogenetic activation of corticothalamic terminals in the motor thalamus of awake monkeys. *Journal of Neuroscience*. 2016 Mar 23;36(12):3519-30.
60. Sacchetti M, Mantelli F, Merlo D, Lambiase A. Systematic review of randomized clinical trials on safety and efficacy of pharmacological and nonpharmacological treatments for retinitis pigmentosa. *Journal of ophthalmology*. 2015;2015.
61. Uy HS, Chan PS, Cruz FM. Stem cell therapy: a novel approach for vision restoration in retinitis pigmentosa. *Medical hypothesis, discovery and innovation in ophthalmology*. 2013;2(2):52.
62. Colozza G, Locker M, Perron M. Shaping the eye from embryonic stem cells: Biological and medical implications. *World journal of stem cells*. 2012 Aug 26;4(8):80.

63. Singh MS, MacLaren RE. Stem cells as a therapeutic tool for the blind: biology and future prospects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2011 Aug 3;278(1721):3009-16.
64. Mauri M, Lentini D, Gravati M, Foudah D, Biella G, Costa B, Toselli M, Parenti M, Coco S. Mesenchymal stem cells enhance GABAergic transmission in co-cultured hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2012 Apr 1;49(4):395-405.
65. He Y, Zhang Y, Liu X, Ghazaryan E, Li Y, Xie J, Su G. Recent advances of stem cell therapy for retinitis pigmentosa. *International journal of molecular sciences*. 2014 Aug;15(8):14456-74.
66. Bartsch U, Oriyakhel W, Kenna PF, Linke S, Richard G, Petrowitz B, Humphries P, Farrar GJ, Ader M. Retinal cells integrate into the outer nuclear layer and differentiate into mature photoreceptors after subretinal transplantation into adult mice. *Experimental eye research*. 2008 Apr 1;86(4):691-700.
67. Klassen H. Stem cells in clinical trials for treatment of retinal degeneration. *Expert opinion on biological therapy*. 2016 Jan 2;16(1):7-14.
68. Birch DG, Bennett LD, Duncan JL, Weleber RG, Pennesi ME. Long-term follow-up of patients with retinitis pigmentosa receiving intraocular ciliary neurotrophic factor implants. *American journal of ophthalmology*. 2016 Oct 1;170:10-4.
69. Leonard KC, Petrin D, Coupland SG, Baker AN, Leonard BC, LaCasse EC, Hauswirth WW, Korneluk RG, Tsilfidis C. XIAP protection of photoreceptors in animal models of retinitis pigmentosa. *PloS one*. 2007 Mar 21;2(3):e314.
70. Do Rhee K, Nusinowitz S, Chao K, Yu F, Bok D, Yang XJ. CNTF-mediated protection of photoreceptors requires initial activation of the cytokine receptor gp130 in Müller glial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013 Nov 19;110(47):E4520-9.
71. Li Y, Tao W, Luo L, Huang D, Kauper K, Stabila P, LaVail MM, Laties AM, Wen R. CNTF induces regeneration of cone outer segments in a rat model of retinal degeneration. *PloS one*. 2010 Mar 2;5(3):e9495.
72. Huang XF. Current pharmacological concepts in the treatment of the retinitis pigmentosa. In *Retinal Degenerative Diseases 2018* (pp. 439-445). Springer, Cham.

73. Tan MH, Smith AJ, Pawlyk B, Xu X, Liu X, Bainbridge JB, Basche M, McIntosh J, Tran HV, Nathwani A, Li T. Gene therapy for retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis caused by defects in APL1: effective rescue of mouse models of partial and complete Aipl1 deficiency using AAV2/2 and AAV2/8 vectors. *Human molecular genetics*. 2009 Mar 19;18(12):2099-114.
74. N Sahni J, Angi M, Irigoyen C, Semeraro F, R Romano M, Parmeggiani F. Therapeutic challenges to retinitis pigmentosa: from neuroprotection to gene therapy. *Current genomics*. 2011 Jun 1;12(4):276-84.
75. Aleman TS, Cideciyan AV, Sumaroka A, Windsor EA, Herrera W, White DA, Kaushal S, Naidu A, Roman AJ, Schwartz SB, Stone EM. Retinal laminar architecture in human retinitis pigmentosa caused by Rhodopsin gene mutations. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008 Apr 1;49(4):1580-90.
76. Tao S, Young C, Redenti S, Zhang Y, Klassen H, Desai T, Young MJ. Survival, migration and differentiation of retinal progenitor cells transplanted on micro-machined poly (methyl methacrylate) scaffolds to the subretinal space. *Lab on a Chip*. 2007;7(6):695-701.
77. Santos-Ferreira TF, Borsch O, Ader M. Rebuilding the missing part—a review on photoreceptor transplantation. *Frontiers in systems neuroscience*. 2017 Jan 5;10:105.
78. Radtke ND, Aramant RB, Petry HM, Green PT, Pidwell DJ, Seiler MJ. Vision improvement in retinal degeneration patients by implantation of retina together with retinal pigment epithelium. *American journal of ophthalmology*. 2008 Aug 1;146(2):172-82.
79. Budzynski E, Gross AK, McAlear SD, Peachey NS, Shukla M, He F, Edwards M, Won J, Hicks WL, Wensel TG, Naggert JK. Mutations of the opsin gene (Y102H and I307N) lead to light-induced degeneration of photoreceptors and constitutive activation of phototransduction in mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2010 May 7;285(19):14521-33.
80. Zhao Y, Feng K, Liu R, Pan J, Zhang L, Lu X. Vitamins and Mineral Supplements for Retinitis Pigmentosa. *Journal of ophthalmology*. 2019;2019.
81. Garg S. Retinitis pigmentosa: treatment. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate. 2017.

82. Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Weigel-DiFranco C, Brockhurst RJ, Hayes KC, Johnson EJ, Anderson EJ, Johnson CA, Gaudio AR, Willett WC. Clinical trial of lutein in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A. *Archives of ophthalmology*. 2010 Apr;128(4):403.
83. Fernandes RA, Diniz B, Ribeiro R, Humayun M. Artificial vision through neuronal stimulation. *Neuroscience letters*. 2012 Jun 25;519(2):122-8.
84. Zrenner E. Artificial vision: solar cells for the blind. *Nature photonics*. 2012 Jun;6(6):344.
85. Caspi A, Dorn JD, McClure KH, Humayun MS, Greenberg RJ, McMahon MJ. Feasibility study of a retinal prosthesis: spatial vision with a 16-electrode implant. *Archives of Ophthalmology*. 2009 Apr 1;127(4):398-401.
86. Yanai D, Weiland JD, Mahadevappa M, Greenberg RJ, Fine I, Humayun MS. Visual performance using a retinal prosthesis in three subjects with retinitis pigmentosa. *American journal of ophthalmology*. 2007 May 1;143(5):820-7.
87. Besch D, Sachs H, Szurman P, Gülicher D, Wilke R, Reinert S, Zrenner E, Bartz-Schmidt KU, Gekeler F. Extraocular surgery for implantation of an active subretinal visual prosthesis with external connections: feasibility and outcome in seven patients. *British Journal of Ophthalmology*. 2008 Oct 1;92(10):1361-8.