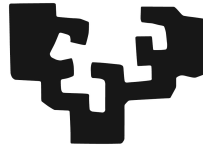


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Estudio epidemiológico clínico y molecular de la Retinosis Pigmentaria en Gipuzkoa

Tesis Doctoral

Tesis presentada por Cristina Irigoyen Laborra al departamento de
Dermatología, Oftalmología y Otorrinolaringología

Bajo la supervisión de los doctores
Javier Ruiz Ederra y Javier Araiz Iribarren

Universidad del País Vasco

Donostia- San Sebastián

Enero de 2017

© 2017 Cristina Irigoyen Laborra

Imprime: Grupo Delta Ediciones digitales, S.L.

Quedan rigurosamente prohibidas, sin la autorización escrita de los titulares del copyright, bajo las sanciones establecidas en la ley, la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático, y la distribución de ejemplares de esta mediante alquiler o préstamo públicos.

A mis aitas, Isabel y Victor.
Por todo su apoyo y amor incondicional.

Parte de esta tesis ha sido publicada en los siguientes artículos:

High prevalence of mutations affecting the splicing process in a Spanish cohort with autosomal dominant retinitis pigmentosa. Ezquerro-Inchausti M, Barandika O, Anasagasti A, **Irigoyen C**, López de Munain A, Ruiz-Ederra J. Sci Rep. 2017 Jan 3;7:39652.

A Cost-Effective Mutation Screening Strategy for Inherited Retinal Dystrophies. *Barandika O, ***Irigoyen C**, *Anasagasti A, Eiguren G, Ezquerro-Inchausti M, López de Munain A; Ruiz-Ederra J. Ophthalmic Res. 2016;56(3):123-31. *Indica misma contribución.

Genetic high throughput screening in Retinitis Pigmentosa base on high resolution melting (HRM) analysis. Anasagasti A, Barandika O, **Irigoyen C**, Benitez BA, Cooper B, Cruchaga C, López de Munain A, Ruiz-Ederra J. Exp Eye Res. 2013; 116:386-94.

Current mutation discovery approaches in Retinitis Pigmentosa. Anasagasti A, **Irigoyen C**, Barandika O, López de Munain A, Ruiz-Ederra J. Vision Res. 2012;75:117-29.

6.2.3. Prótesis retiniana	79
6.2.4. Trasplante retiniano	81
Hipótesis	83
Objetivos	85
Material y Métodos	87
1. Tipo de estudio	87
2. Lugar del estudio	87
3. Criterios de inclusión y exclusión	88
4. Creación del registro	89
5. Estudio clínico: Confirmación diagnóstica y obtención de los datos clínicos para los diferentes estudios	89
5.1. Diagnóstico oftalmológico	89
5.1.1. Estudio del caso índice	92
5.1.2. Estudio clínico completo de las formas de RP sindrómicas	92
5.1.3. Estudio clínico de la familia	92
5.2. Árbol genealógico y clasificación del tipo hereditario familiar	92
6. Estudio genético	93
6.1. Colección de muestras	93
6.2. Análisis de High Resolution Melting (HRM)	94
6.2.1. Selección de genes	94
6.2.2. Diseño de primers	95
6.2.3. Condiciones de ensayo HRM y PCR en tiempo real	95
6.2.4. Análisis HRM	96
6.3. Microarrays de ADN	97
6.3.1. Análisis de filtrado de datos	98
6.4. Next Generation Sequencing (NGS)	100
6.4.1. Método de terminación reversible (Illumina)	100
6.4.2. Método de secuenciado mediante semi-conducción (ION Torrent Personal Genome Machine-PGM)	100
6.4.2.1. Análisis de secuenciación	101
6.5. Filtrado de variantes relevantes y valoración del grado de patogenicidad	102
6.6. Método de Sanger o de terminación de cadena	103
6.7. Recursos Web	104
7. Protocolo de estudio	105
8. Análisis estadístico	106
Resultados	107
1. Estudio de prevalencia de la RP en Gipuzkoa	107
2. Características demográficas	107
3. Tipo de herencia	108
3.1. Consanguinidad	109
3.2. RP sindrómica	109
4. Resultados moleculares	109
4.1. Resultados en familias RPAD	112
4.2. Resultados en familias RPAR	115
4.3. Resultados en familias RPLX	118
4.4. Resultados en familias RP esporádica	118
4.5. Resultados en RP sindrómica	118
4.5.1. Síndrome de Usher	118
4.5.2. Síndrome de Bardet Biedl	121

4.6. Resultados en familias de origen guipuzcoano	121
4.7. Mapa de mutaciones	126
5. Características clínicas de la RP en Gipuzkoa	127
5.1. Síntoma al diagnóstico y edad media de diagnóstico	127
5.2. Agudeza visual y equivalente esférico	128
5.3. Ceguera legal: CV y AV	129
5.4. Triada clásica	131
5.5. RP sectorial	131
5.6. Complicaciones oculares	131
5.6.1 Catarata	131
5.6.2 Presión intraocular y OCT CFN	132
5.6.3 Patología macular: MER, EM, OCT, Anillo hiperautofluorescencia	133
5.6.4 Drusas papilares	136
5.6.5 Test de colores	137
5.6.6 Otra patología ocular	138
6. Correlaciones genotipo-fenotipo	139
6.1. Correlación genotipo-fenotipo RPAD: mutaciones en el gen RHO	139
6.2. Correlación genotipo-fenotipo RPAR y RPesp: mutaciones en el gen CERKL	140
6.3. Correlación genotipo-fenotipo RPAR: mutaciones en el gen CRB1	141
6.4. Correlación genotipo-fenotipo RPAR: mutaciones en el gen TULP	142
6.5. Correlación genotipo-fenotipo RPAR: mutaciones en el gen ABCA4	142
6.6. Correlación genotipo-fenotipo RPAR: mutaciones en el gen RLBP1	142
6.7. Correlación genotipo-fenotipo RPLX: mutación en el gen RP2	143
6.8. Correlación genotipo-fenotipo Síndrome de Usher	143
6.9. Correlación genotipo-fenotipo Síndrome de Bardet-Biedl	146
7. Creación del registro	148
Discusión	149
1. Prevalencia de la RP en Gipuzkoa	149
2. Características demográficas	151
3. Tipo de herencia	152
3.1. Consanguinidad	154
4. Resultados moleculares	155
4.1. Resultados en familias RPAD	156
4.1.1. Correlación genotipo-fenotipo RPAD: mutaciones en gen RHO	160
4.2. Resultados en familias RPAR	162
4.2.1. Correlación genotipo-fenotipo RPAR y RPesp con mutaciones en el gen CERKL	163
4.2.2. Correlación genotipo-fenotipo RPAR: mutaciones en el gen CRB1	164
4.2.3. Correlación genotipo-fenotipo RPAR: mutaciones en el gen TULP	164
4.2.4. Correlación genotipo-fenotipo RPAR: mutaciones en el gen ABCA4	164
4.2.5. Correlación genotipo-fenotipo RPAR: mutaciones en el gen RLBP1	165
4.3. Resultados en familias RPLX	165
4.3.1. Correlación genotipo-fenotipo RPLX: mutación en el gen RP2	166
4.4. Resultados en familias RP esporádica	167
4.5. Resultados en familias con origen guipuzcoano	167
5. Síndrome de Usher	170
5.1. Correlación genotipo-fenotipo Síndrome de Usher	172
6. Síndrome de Bardet Biedl	173
6.1. Correlación genotipo-fenotipo Síndrome de Bardet Biedl	174

7.	Características clínicas de la RP en Gipuzkoa	175
7.1.	Síntoma al diagnóstico y edad media de diagnóstico. Correlación genotipo-fenotipo	175
7.2.	Agudeza visual y equivalente esférico	176
7.3.	Ceguera legal	176
7.4.	Triada clásica	178
7.5.	RP sectorial	178
7.6.	Complicaciones oculares	178
7.6.1.	Catarata	178
7.6.2.	Presión intraocular y OCT CFN	180
7.6.3.	Patología macular: MER, EM, OCT, Anillo hiperautofluorescencia	181
7.6.3.1.	Hallazgos en OCT	181
7.6.3.2.	Anillo hiperautofluorescente macular	187
7.6.4.	Drusas papilares	188
7.6.5.	Test de colores	189
7.6.6.	Otra patología ocular	189
8.	Líneas futuras	190
8.1.	Diagnóstico genético molecular en las distrofias de la retina	190
8.2.	Análisis de expresión de miRNAs-mRNAs	191
8.3.	Terapia génica	192
8.4.	Ensayo clínico en electroestimulación transcorneal	192
8.5.	Unidad de distrofias retinianas	192
	Limitaciones	195
	Conclusiones	197
	Referencias bibliográficas	199
1.	Publicaciones del grupo de neurodegeneración sensorial del Instituto Biodonostia relacionadas con el presente estudio	199
1.1.	Artículos en revistas indexadas	199
1.2.	Capítulo libro	199
1.3.	Comunicaciones orales	200
1.4.	Posters en congresos	200
2.	Bibliografía	201
	Anexos	219
1.	Informes de evaluación por el comité de ética	219
2.	Consentimiento informado para el estudio genético	220
3.	Volante para la toma de muestra para el biobanco	221
4.	Plantilla de obtención de datos clínicos de pacientes y familiares asintomáticos	222
5.	Becas concedidas	223

Agradecimientos

Desde el 2008 que surgió la idea de este proyecto ha pasado ya casi una década. Me gustaría con estas palabras agradecer a todas y cada una de las personas que se han visto involucradas en este proyecto.

La medicina avanza gracias a la tecnología y la investigación pero siempre está centrada en los pacientes y son ellos los que de alguna manera nos hacen cuestionarnos en la práctica clínica diaria. Fue así como nació este proyecto. Los pacientes afectados de Retinosis Pigmentaria de Gipuzkoa dados los resultados de los primeros ensayos clínicos en terapia génica en animales vieron la necesidad de ser estudiados en el hospital y de conocer la genética de su enfermedad para así poder acceder en un futuro a este tipo de terapias. El futuro ya está aquí, y está prevista la aprobación de la primera terapia génica en Retinosis Pigmentaria a nivel mundial en febrero del 2018.

Tras varias reuniones con Dirección Médica y Gerencia del Hospital, la unidad experimental del Hospital Donostia (hoy en día Biodonostia) y el Servicio de Oftalmología comenzamos a darle forma al proyecto. Yo era residente de último año por aquel entonces y la retina era la subespecialidad de Oftalmología que más me gustaba y a la que me quería dedicar y Javier Mendicute y Miguel Ruiz apostaron por mí para ser la responsable clínico del estudio. Me acuerdo que desde residente de primer año uno de mis objetivos era realizar la tesis doctoral, pero tras varios trabajos en lentes tóricas Javier me recomendó que realizará la tesis en retina, ya que era el área al que me dedicaría en el futuro. Y aunque la Retinosis Pigmentaria se trata de una enfermedad rara, frecuentemente olvidada como muchas otras enfermedades raras, me embarqué en esta historia con ilusión y con muchas cosas por aprender, de residente creo recordar haber visto solamente uno o dos pacientes de Retinosis Pigmentaria. Me gustaría, por lo tanto, agradecer a los impulsores de este proyecto al inicio: Javier, Miguel, Adolfo, Julio Arrizabalaga, Maximo Goikoetxea, Gustavo Aguirre, Lorea Leanizbarrutia, Markel, Itziar y toda la Asociación de Begisare.

Quiero agradecer al Servicio de Oftalmología por acogerme desde la residencia. Gracias a los adjuntos, residentes, ópticos, enfermería y administrativos. Gracias a enfermería por las extracciones de sangre, a los administrativos por la guerra que doy con los resultados. A los ópticos por los estudios electrofisiológicos y a Jorge por su buen hacer y conocimiento en neurofisiología. Creo que al menos hemos conseguido que se haga visible esta enfermedad entre nosotros.

Por supuesto, un agradecimiento especial a mis directores de tesis a Javier Ruiz Ederra y Javier Araiz. Javier Ruiz Ederra, el responsable del análisis molecular de los pacientes, gracias por tu paciencia y por todas tus correcciones y apoyo metodológico. Este proyecto hubiera sido imposible sin tu trabajo. A Javier Araiz, gracias por estar disponible en todo momento, gracias por tus consejos y tus correcciones.

Gracias al equipo de Biodonostia del Grupo de Neurodegeneración Sensorial, especialmente a Olatz Barandika y Maitane Ezquerro por su implicación en el análisis molecular y a Ander Anasagasti por su apoyo metodológico desde el principio. A las recientes incorporaciones Marina Crespo y a los que dejaron su granito de arena, Garazi Eiguren. Este trabajo en parte es vuestro, formáis un gran equipo.

Me gustaría agradecer también a Cristina Sarasqueta, del Departamento de Epidemiología del Instituto Biodonostia por su ayuda y sugerencias en el análisis estadístico de la tesis. Y en general a todo Biodonostia, en especial a Arantza Abad por su apoyo y ayuda en la consecución de las subvenciones. También agradecer a la Directora Médica, Idoia Gurruchaga, por su apoyo al proyecto.

Gracias a todos mis amigos que han “padecido” la tesis, a los restos, a la kuadrilla, a las neskas... A Laura por aquellas horas en la biblioteca, a Lucía por liberar tensiones con la korrika y a todos por las risas, conversaciones y momentos vividos estos últimos años. Xabi, te doy la R de doctor por haberme apoyado estos últimos meses y haberme hecho el camino mucho más agradable, espero seguir viajando a tu lado.

Gracias a todos los pacientes y familiares por creer y confiar en mí, por apoyarme y hacer que este proyecto tenga sentido. Gracias a Inocencia Mena, Oier Esteban, Mikel Azkue, Jone Azkue, Ekain Iburguren, Andoni Arrillaga y Nora Imaz por vuestra disponibilidad y entusiasmo en el viaje a Tübingen. Fue un honor vivir esa experiencia con vosotros y espero que sirva en el futuro.

La mayoría de los estudios han sido avalados por la concesión de subvenciones. Me gustaría agradecer a la Fundación Mutua Madrileña, Saiotek, Begisare, Còlegio de Médicos de Gipuzkoa, Instituto de Salud de Carlos III y Osakidetza que creyeron y apoyaron económicamente nuestros proyectos.

Y por último, esta tesis va dedicada a mi familia. A Iñaki por tu apoyo desde la distancia y creer siempre en mí. A mi aita por tu ejemplo, por inculcarme esa pasión por la medicina, por las correcciones y por estar ahí siempre en los momentos difíciles. A mi ama al igual que el aita, gracias por estar ahí siempre, por tu apoyo en todo momento, por tu positividad y alegría. Gracias por la educación que nos habéis dado a Iñaki y a mí. Por dejarnos elegir siempre en libertad y habernos dado la confianza para realizar nuestros sueños.

Muchas gracias a todos, eskermile!!!



DONOSTIA UNIBERTSITATE OSPITALEA
HOSPITAL UNIVERSITARIO DONOSTIA



GIPUZKOAKO SENDAGILEEN ELKARGO OFIZIALA
COLEGIO OFICIAL DE MÉDICOS DE GIPUZKOA



BEGISARE
ASOCIACIÓN DE AFECTADOS POR
RETINOSIS PIGMENTARIA DE GIPUZKOA

FUNDACIÓN
MUTUAMADRILEÑA



Abreviaturas

AAV:	Virus adeno-asociado
ACL:	Amaurosis congénita de Leber
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AF:	Autofluorescencia
AG:	Adenina/guanina
AO:	Ambos ojos
ARN:	Ácido ribonucleico
ASO:	Oligonucleótidos antisentido modificados
AV:	Agudeza visual
BBS:	Síndrome de Bardet Biedl
bp:	Pares de bases
CAR:	Retinopatía asociada al cáncer
CFN:	Capa de fibras nerviosas
CHR2:	Canal rhodopsina
CNTF:	Factor neurotrófico ciliar
CNV:	Variación del número de copias
CRISPR	(<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>): Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas.
CSP:	Catarata SCP
CV:	Campimetria o campo visual
ddNTP:	Didesoxinucleótido trifosfato
DE:	Desviación estándar
DGP:	Diagnóstico genético preimplantacional
dHPLC:	Cromatografía líquida desnaturalizante de alta presión
dNTP:	Desoxinucleótido trifosfato
DMAE:	Degeneración macular asociada a la edad
DMD:	Distrofia muscular de Duchenne
EMQ:	Edema macular quístico.
EPR:	Epitelio pigmentario de la retina
ERG:	Electrorretinograma
ERGMf:	Electrorretinograma multifocal
EZ:	Zona de elipsoides
FDA:	Administración de drogas y alimentos de EEUU.
FR:	Fotorreceptores
GC:	Guanina/citosina
gRNA:	RNA guía
GU:	Guanina/uracilo
HITI	(Homology-independent targeted integration): Integración dirigida independiente de homología.
HRM:	Análisis de High Resolution Melting
IBT-CRI:	Centro de recursos para la inclusión del alumnado con discapacidad visual
iPSCs:	Células madre pluripotentes inducidas
ISP:	Partículas de la esfera de Ion enriquecidas
IZ:	Zona de interdigitación
MER:	Membrana epirretiniana
MLE:	Membrana limitante externa
NGS:	Next generation sequencing
NTC:	Non template control, control negativo sin muestra de ADN
OCT:	Tomografía de coherencia óptica

OCT-A: OCT angiografía.
OD: Ojo derecho
OI: Ojo izquierdo
ONL: Capa nuclear externa de la retina
OS: Segmentos externos de los fotorreceptores
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PERG: Electrorretinograma pattern
PGM: Ion Torrent Personal Genome Machine
RdcvF: Factor de viabilidad de conos derivado de los bastones
RDS: La proteína transmembrana periférica/ enlentecimiento de la degeneración retiniana
RFLP: Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción
RHO: Gen que codifica para la rodopsina
RNA: Ácido ribonucleico
RNAi: RNA interferente
RNAm: RNA mensajero
ROM1: Gen que codifica para la proteína retiniana del segmento externo 1.
RP: Retinosis Pigmentaria
RPAD: Retinosis Pigmentaria con herencia autosómico dominante
RPAR: Retinosis Pigmentaria con herencia autosómico recesiva
RPE65: Proteína 65 del epitelio pigmentario de la retina
RPesp: Retinosis Pigmentaria esporádica
RPGR: Proteína reguladora de la GTPasa de la Retinosis Pigmentaria
RPLX: Retinosis pigmentaria recesiva ligada al sexo
rs: *Reference SNP*: polimorfismo de nucleótido simple de referencia
Sd.: Síndrome
siRNA: RNA de transferencia
SNP: Polimorfismos de nucleótido simple
snRNP: Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas
SSCP: Polimorfismo de conformación de cadena sencilla
TVM: Tracción vitreomacular
USH: Síndrome Usher
USH1: Síndrome de Usher tipo 1
USH2: Síndrome de Usher tipo 2
USH2A: Gen que codifica para la proteína usherina
VUS: Variantes de significado incierto
WT: Wild type, sin mutación.
WES: Whole Exome Sequencing, secuenciado del exoma completo
WGS: Whole Genome Sequencing, secuenciado del genoma completo

Índice de tablas y figuras

Tablas

Tabla 1. Carga de la discapacidad por patología. Estimado a partir de datos de la ONCE	41
Tabla 2. Coste anual de la ceguera en España. Datos obtenidos de Retinaplus	42
Tabla 3. Tipos más frecuentes de RP sindrómica	47
Tabla 4. Síndrome de Usher. Tipos clínicos, manifestaciones visuales y auditivas y genes implicados	48
Tabla 5. Diagnóstico diferencial RP	49
Tabla 6. Especificaciones técnicas y ventajas y desventajas de los 3 tipos de implantes comercializados	80
Tabla 7. Descripción de los genes RP y BBS analizados	97
Tabla 8. 31 genes de familias RPAD analizados mediante Ion Torrent (NGS)	101
Tabla 9. Número de casos estudiados con cada técnica de secuenciado y genes o variantes analizadas con cada técnica	101
Tabla 10. Prevalencia de RP en Gipuzkoa por grupos de edad	107
Tabla 11. Resultados moleculares con las diferentes técnicas de secuenciado	110
Tabla 12. Análisis realizado en 10 familias diagnosticadas de RP mediante arrays de ADN	110
Tabla 13. Listado de variantes genéticas encontradas por análisis de HRM	111
Tabla 14. Tipo de mutación de cada gen, su frecuencia en las 28 familias de RPAD, la técnica empleada para su detección y la bibliografía correspondiente	113
Tabla 15. Tipo de mutación de cada gen, su frecuencia en las 21 familias de RPAR, la técnica empleada para su detección y la bibliografía correspondiente	115
Tabla 16. Tipo de mutación en las 5 familias de Sd.Usher, la técnica empleada para su detección y la bibliografía correspondiente	119
Tabla 17. Mutaciones encontradas en el gen USH2A en nuestra serie y su frecuencia en las 4 familias con Sd. Usher II	120
Tabla 18. Mutaciones encontradas en el gen USH2A en nuestra serie y su frecuencia en las 8 familias con RPAR y Sd. Usher II	120
Tabla 19. Tipo de mutación en las 3 familias de Sd. Bardet Biedl, la técnica empleada para su detección y la bibliografía correspondiente	121
Tabla 20. Mutaciones encontradas en las 18 familias de origen guipuzcoano y la población de origen de cada familia	123
Tabla 21. Mutaciones en genes encontrados en los pacientes de origen guipuzcoano que coinciden por proximidad territorial en familiares no guipuzcoanos	124
Tabla 22. Agudeza visual. Porcentaje de AV por grupos de AV y por tipos de herencia	128
Tabla 23. Equivalente esférico medio en OD y OI en los pacientes estudiados y por tipos de herencia	128
Tabla 24. Número de ojos, edad, AV y grosor macular central en los subgrupos de zona de elipsoides	135

Tabla 25. Características clínicas oftalmológicas de los pacientes según tipo de herencia y en total	137
Tabla 26. Otra patología ocular	138
Tabla 27. Resultados oftalmológicos en pacientes afectados de Síndrome de Usher Tipo I. Medias	143
Tabla 28. Resultados oftalmológicos en pacientes afectados de Síndrome de Usher Tipo I. Porcentajes	144
Tabla 29. Resultados oftalmológicos en pacientes afectados de Síndrome de Usher Tipo II. Medias	144
Tabla 30. Resultados oftalmológicos en pacientes afectados de Síndrome de Usher Tipo II. Porcentajes	144
Tabla 31. Resultados oftalmológicos en pacientes afectados de Síndrome de Usher Tipo II y RPAR con la mutación p.Cys759Phe	145
Tabla 32. Resultados clínicos en los pacientes afectados de Síndrome de Bardet-Biedl (BBS)	146
Tabla 33. Resultados oftalmológicos en pacientes afectados de Síndrome de Bardet-Biedl (BBS). Medias	146
Tabla 34. Resultados oftalmológicos en pacientes afectados de Síndrome de Bardet-Biedl (BBS). Porcentajes	147
Tabla 35. Prevalencia de RP en diferentes poblaciones	149
Tabla 36. Prevalencia de RP no sindrómica en diferentes poblaciones	150
Tabla 37. Distribución geográfica de los diferentes tipos de herencia en RP	153
Tabla 38. Localidades guipuzcoanas mayores de 500 habitantes con consanguinidad >5%. En negrita se resaltan las localidades de origen de pacientes con RP y consanguinidad en nuestro estudio	168
Tabla 39. Localidades de menos de 500 habitantes con frecuencia de consanguinidad mayor al 5%	169
Tabla 40. Tabla de prevalencia del Síndrome de Usher en diferentes países	171
Tabla 41. Porcentaje de afiliados a la ONCE en Gipuzkoa por las patologías más frecuentes	177
Tabla 42. Prevalencia de catarata según tipos de herencia de RP en diferentes estudios	179
Tabla 43. Grosor medio de capa de fibras nerviosas (CFN) medido mediante OCT según diferentes autores	181
Tabla 44. Porcentaje de edema macular, membrana epirretiniana (MER), tracción vitreomacular (TVM) y agujero macular diagnosticado mediante OCT en diferentes estudios poblacionales	186

Figuras

Figura 1. Dr. Franciscus Donders, uno de los pioneros de la oftalmología científica. Nombró por primera vez la Retinosis Pigmentaria en la literatura	37
Figura 2. Prevalencia y Registro de casos en España (www.esretnet.org)	38
Figura 3. Registro de enfermedades raras en la historia clínica electrónica Osabide Global de Osakidetza	40
Figura 4. Costes directos e indirectos de la patología retiniana	42
Figura 5. Aspecto histológico de la retina humana sana (izquierda) y de la retina de un paciente con RP en una etapa media de la enfermedad. Se puede observar una gran disminución en la densidad de células fotorreceptoras en la capa nuclear externa (modificado de Hartong et al., 2006)	44
Figura 6. Porcentaje de mutaciones causantes de RPAD en 270 familias estudiadas Modificado de Daiger y cols, 2014. Prevalencia de genes de los casos de RP autosómica dominante, que representan aproximadamente el 20-40% de todos los casos de esta enfermedad	50
Figura 7. Prevalencia de genes de los casos de RP autosómica recesiva, que representan aproximadamente el 30-50% de todos los casos de esta enfermedad (modificado de Hartong et al., 2006)	51
Figura 8. Prevalencia de genes de los casos de RP ligado al cromosoma X, que representan aproximadamente el 5-15% de todos los casos de esta enfermedad	51
Figura 9. Genes identificados de enfermedades retinianas desde 1980 hasta 2017	52
Figura 10. Análisis High Resolution Melting (HRM)	55
Figura 11. Imagen del DNA Axiom® Exome 319 Array Plate de Affymetrix formado por 96 arrays idénticos para el genotipado en paralelo del mismo número de muestras	57
Figura 12. A: Método Sanger clásico y B: secuenciación por terminador fluorescente ...	58
Figura 13. Representación esquemática del proceso de amplificación “bridge PCR” utilizado en la plataforma de secuenciación de Illumina	61
Figura 14. Ion Torrent	63
Figura 15. Formas atípicas de RP	65
Figura 16. ERG en pacientes sano y en pacientes con RPAD, RPAR y RPLX. Tanto la amplitud como la latencia se ven alterados y son más acusados en RPLX	68
Figura 17. Factor neurotrófico ciliar (CNTF)	71
Figura 18. Terapia génica. Técnica quirúrgica de inyección del vector en el espacio subretiniano	74
Figura 19: Incorporación de la edición mediada por CRISPR / Cas en la clínica	78
Figura 20: Estructura y aplicaciones de CRISPR/Cas9 en enfermedades degenerativas de la retina. BH: Helice puente; PI: interacción PAM	78
Figura 21. Esquema de funcionamiento de las prótesis retinianas	80
Figura 22. A: Implante Iris. B: Implante Argus II. C: Implante subretiniano Alpha	81
Figura 23. Esquema de diferenciación de células madre	82
Figura 24. Análisis de HRM del gen PDE6A. Gráfico de diferencias obtenido a partir del análisis de HRM del gen PDE6A	96
Figura 25. Diagrama de flujo del análisis de datos	99

Figura 26. Algoritmo de filtrado de variantes relevantes y valoración del grado de patogenicidad. adIRD: Distrofias retinianas AD. LOF: pérdida de función	103
Figura 27. Protocolo de estudio: Paciente afecto de RP, caso índice	105
Figura 28. Porcentaje de tipo de herencia en las 127 familias estudiadas	108
Figura 29. Porcentaje de tipo de herencia en los 175 pacientes estudiados	108
Figura 30. Porcentaje de las diferentes RP sindrómicas en las formas sindrómicas ...	109
Figura 31. Porcentaje de genes mutados en las 28 familias con herencia dominante y mutación conocida	112
Figura 32. Árboles genealógicos representativos de las 2 mutaciones más prevalentes en los genes SNRP200 y RHO	114
Figura 33. Porcentaje de genes mutados en las 21 familias con herencia recesiva y diagnóstico genético	117
Figura 34: Árbol genealógico de la familia RP153, correspondiente a una de las familias RPAR con mutación p.Arg283Ter en el gen CERKL	117
Figura 35. Árbol genealógico de familia con herencia recesiva ligada al cromosoma X (familia RP121 de nuestro estudio) con mutación en el gen RP2 (c.1073-9T>A)	118
Figura 36. Porcentaje de tipo de herencia en las 42 familias de origen guipuzcoano ...	122
Figura 37. Porcentaje de mutaciones en las 18 familias guipuzcoanas con diagnóstico genético	125
Figura 38. Porcentaje de genes mutados en las 14 familias de RPAR de origen guipuzcoano	125
Figura 39. Porcentaje de genes mutados en las 4 familias de RPAD de origen guipuzcoano	125
Figura 40. Mapa de origen de los genes mutados en nuestros pacientes	126
Figura 41. Porcentaje de ceguera legal según tipo de herencia	130
Figura 42. Porcentaje de tipos de herencia dentro de los pacientes con ceguera legal (95 pacientes)	130
Figura 43. Porcentaje de catarata según tipo de herencia	131
Figura 44. Porcentaje de catarata según la edad estratificado por tipo de herencia	132
Figura 45. OCT en pacientes con RP. Estadios de zona de elipsoides. A: Estadio 1: zona de elipsoides no visible. B: Estadio 2: zona de elipsoides alterada. C: Estadio 3: zona de elipsoides normal	134
Figura 46. Gráfica de correlación entre la longitud de la línea IS/OS o zona de elipsoides y la agudeza visual en LogMAR (AVLogMAR)	135
Figura 47. Drusas papilares en la autofluorescencia en 6 pacientes del estudio	137
Figura 48. Retinografía y autofluorescencia en paciente con RP sectorial y mutación en gen RHO	140
Figura 49. Fenotipo ocular de paciente con mutación en gen CERKL. A: Retinografía, B: Autofluorescencia, C: Pimiento en grumos en periferia. D: OCT macular: atrofia retiniana	140
Figura 50. A: Retinografía de paciente con mutaciones en gen CERKL. B: Autofluorescencia del mismo paciente, hipoautofluorescencia macular e hipoautofluorescencia parcheada en media periferia y peripapilar	141
Figura 51. Autofluorescencia de paciente con mutación en el gen CRB1. Anillo de hiperautofluorescencia macular e hipoautofluorescencia parcheada en media periferia	141

Figura 52. Retinografía en paciente con mutación en gen TULP	142
Figura 53. Retinografía de paciente con Síndrome de Bothnia	142
Figura 54. Fenotipo mutación RP2. A y B: retinografía con fondo de ojo con atrofia retiniana. C: autofluorescencia con hiperautofluorescencia macular. D: Atrofia macular en OCT.....	143
Figura 55. Retinografía en 2 pacientes con Sd. Bardet Biedl	148
Figura 56. Distribución geográfica de los diferentes tipos de herencia en RP	154
Figura 57. Modelo esquemático de la rodopsina humana modificado de Keen et al. ...	161
Figura 58: Mapa de las familias de origen guipuzcoano en nuestro estudio. En rojo se muestran las familias con consanguinidad, en azul familias no consanguíneas. En la circunferencia se muestran las localidades en la zona de Aralar donde se han encontrado familias consanguíneas en Ataun, Idiazal y Zaldivia	170
Figura 59. Esquema que muestra la jerarquía alélica propuesta de mutaciones USH2A: la presencia de al menos un alelo USH2A específico de la enfermedad de la retina ('retina-specific') en un paciente con enfermedad relacionada con USH2A da como resultado una audición normal, al menos en la infancia	173
Figura 60. Catarata subcapsular posterior en paciente con RP	180
Figura 61. Localización de la rodopsina mediante inmunohistoquímica en una retina normal (A) y la retina de un hombre con RPLX (B)	182
Figura 62. La fovea de la retina humana normal (A) contiene de seis a ocho filas de núcleos fotorreceptores tipo cono (n). Los conos tienen segmentos internos delgados (c) y segmentos externos largos y delgados (*); RPE, EPR; C, coroides. La figura B muestra la mácula de un hombre con RPLX cuya agudeza visual era 6/120. Los fotorreceptores se reducen a una monocapa de núcleos de conos con segmentos externos muy cortos (*); RPE, EPR; n, núcleos de conos; rn, capa nuclear interna; C, coroides. × 500. Imagen cedida por la Dra. Milam	183

Resumen

Introducción

La retinosis pigmentaria (RP) se trata de un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias de la retina que comparten la pérdida gradual de los dos tipos de fotorreceptores (bastones y conos). La prevalencia mundial de RP es de aproximadamente 1 en 4000 personas. La enfermedad puede heredarse de forma autosómica dominante (20-40%), autosómica recesiva (30-50%) o ligado a X (5-15%). Hasta la fecha se han identificado más de 3000 mutaciones en 107 genes asociados a RP.

Objetivos

Conocer la prevalencia de la Retinosis Pigmentaria en Gipuzkoa y la distribución de las diferentes formas de herencia en nuestra población. Realizar la caracterización genético-molecular y clínica de la RP en nuestra población y conocer las complicaciones asociadas de la RP. Por último, realizar correlaciones genotipo-fenotipo.

Material y métodos

Se realizó un estudio observacional transversal. Se incluyeron 175 pacientes de 127 familias con miembros afectados de RP derivados a la consulta del Hospital Donostia a través de las consultas de Oftalmología de Gipuzkoa y a través de la asociación de afectados de RP de Gipuzkoa (Begisare), en un periodo comprendido entre Junio 2009 y Diciembre 2015.

Los pacientes se sometieron a una exploración oftalmológica completa. Se realizó un árbol genealógico y se tomó una muestra de ADN para su estudio molecular.

El análisis molecular se realizó mediante diferentes técnicas: análisis de *High Resolution Melting* (HRM), *Next generation sequencing* (NGS) y *microarrays* de ADN (Affymetrix). Las variantes genéticas clínicamente relevantes detectadas se confirmaron con la secuenciación de Sanger.

Se realizó un estudio descriptivo general de las características clínicas, epidemiológicas y moleculares de los pacientes.

Posteriormente se creó un registro de todos los pacientes afectos de RP en Gipuzkoa.

El estudio se llevó a cabo siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki y de confidencialidad en la recolección de datos. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Donostia.

Resultados

La **prevalencia** de RP en Gipuzkoa ha sido de 1 paciente por cada 4244 personas. Por grupos de edad la prevalencia en el grupo de edad más numeroso (entre 20 y 64 años) ha sido de 1 paciente entre 3512 personas. La prevalencia de las formas sindrómicas de RP ha sido para el Sd. de Usher de 1/47619 y para el Sd. de Bardet Biedl 1/119048.

Según el tipo de herencia las formas autosómico recesivas (RPAR) han sido las más frecuentes (47%), seguido de las formas dominantes (RPAD) (28%), esporádicas (RPesp)

(23%) y recesivas ligadas al cromosoma X (RPLX) (2%). El 25% de las familias presentaba consanguinidad.

Resultados moleculares: de las 127 familias se han encontrado resultados moleculares en el 45,7% de familias. La técnica de NGS ha sido la técnica que más resultados ha ofrecido. En las formas de RPAD las mutaciones en el gen RHO han sido las más frecuentes (34%), en RPAR las mutaciones más frecuentes han sido en los genes CERKL (23%) y USH2A (19%), en RPLX se ha encontrado una única mutación en el gen RP2.

Las mutaciones más frecuentes encontradas en las familias de origen guipuzcoano para las formas recesivas han sido mutaciones en los genes CERKL (29%), USH2A (22%) y CRB1 (14%). En las formas dominantes las mutaciones más frecuentes han sido en el gen PRPF8 (50%), RHO (25%) y PRPH2 (25%). En las formas sindrómicas la mutación más frecuente en el Sd. de Usher ha sido la mutación p.Cys759Phe en el gen USH2A y en el Sd. Bardet Biedl la mutación p.Met390Arg en el gen BBS1.

Características clínicas: El principal síntoma al diagnóstico fue la nictalopía y la edad media de diagnóstico 29 años. El 58% de pacientes presentó ceguera legal. Respecto a las complicaciones secundarias a partir de los 40 años se detectó catarata en al menos el 50% de los pacientes. En un 25,3% y 27,8% de pacientes se detectó membrana epirretiniana y edema macular en la tomografía de coherencia óptica (OCT) respectivamente. El anillo hiperfluorescente macular en la autofluorescencia se apreció en el 61,5% de casos.

Correlación genotipo-fenotipo: los pacientes con mutaciones en el gen más prevalente CERKL, presentaron un fenotipo característico de baja agudeza visual, atrofia macular, atrofia coriorretiniana parcheada y pigmento en media periferia en grumos.

Conclusiones

La prevalencia de RP en Gipuzkoa se asemeja a la prevalencia encontrada en otras poblaciones. No se ha podido demostrar una mutación fundadora en los pacientes guipuzcoanos. Las mutaciones en el gen CERKL han sido las más frecuentes. Mediante este estudio se ha podido crear un registro de pacientes con RP en Gipuzkoa y gracias a la caracterización molecular de nuestros pacientes, en un futuro se podrá orientar más eficientemente el estudio genético. Las pruebas como la OCT y la autofluorescencia han demostrado su utilidad para detectar las complicaciones asociadas, evaluar la progresión de la enfermedad y la respuesta a futuras terapias.

Summary

Introduction

Retinitis pigmentosa (RP) is a heterogeneous group of hereditary retinal diseases that shares the gradual loss of photoreceptors (rods and cones). The worldwide prevalence of RP is approximately 1 in 4000 individuals. The disease can be inherited as an autosomal dominant (20-40%), autosomal recessive (30-50%) or X-linked (5-15%) trait. To date, more than 3000 mutations have been identified in 107 genes associated with RP.

Objectives

To determine the prevalence of RP in Gipuzkoa and the distribution of the different forms of inheritance in our population. To perform the molecular and clinical characterization of RP and the secondary complications associated and to perform genotype-phenotype correlations.

Material and methods

A population based cross-sectional study that included 175 patients with RP from 127 families referred to the Donostia Hospital through the Ophthalmology clinics of Gipuzkoa and through the association of RP in Gipuzkoa (Begisare), between June 2009 and December 2015.

Patients underwent a complete ophthalmological examination. A family tree was made and a DNA sample was taken for the molecular study.

Molecular analysis was performed by different techniques: *High Resolution Melting* (HRM) analysis, *Next generation sequencing* (NGS) and *DNA microarrays* (Affymetrix). The clinically relevant genetic variants detected were confirmed with Sanger sequencing.

A description of the clinical, epidemiological and molecular characteristics of the patients was carried out.

Subsequently, a registry was created with all the patients affected by RP in Gipuzkoa.

The study was carried out following the principles of the Declaration of Helsinki and confidentiality in data collection. All patients signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the Ethics Committee of the Donostia University Hospital.

Results

The **prevalence** of RP in Gipuzkoa was 1 in 4244 people. By age groups, the prevalence in the bigger age group (between 20 and 64 years) was 1 in 3512 people. The prevalence of syndromic RP was 1 in 47619 for Usher syndrome and 1 in 119048 for Bardet Biedl syndrome.

According to the type of inheritance the autosomal recessive forms (ARRP) were the most frequent (47%), followed by the dominant (ADRP) (28%), sporadic RP (23%) and X linked forms (XLRP) (2%). Consanguinity was found in 25% of the families.

Molecular analysis: genetic results were obtained in 45.7% of families. The technique with greatest diagnostic yield was NGS. Mutations in the RHO gene were the most frequent

(34%) among ADRP patients. Mutations in CERKL (23%) and USH2A (19 %) were the most frequent among ARRP patients, and only a mutation in the RP2 gene was found among XLRP patients.

In families of Gipuzkoan origin, the most frequent mutations for ARRP were mutations in the genes CERKL (29%), USH2A (22%) and CRB1 (14%). In ADRP, the most frequent mutations were in the PRPF8 (50%), RHO (25%) and PRPH2 (25%) genes. In syndromic RP, the most frequent mutation in Usher syndrome was the p.Cys759Phe mutation in the USH2A gene and in Bardet Biedl syndrome p.Met390Arg mutation in the BBS1 gene.

Clinical characteristics: The main symptom at diagnosis was nictalopia and the average age of diagnosis was 29 years. 58% of patients had legal blindness. Regarding secondary complications, cataract was detected in at least 50% of patients over 40 years of age. In 25.3% and 27.8% of the patients, epiretinal membrane and macular edema were detected in the optical coherence tomography (OCT), respectively. The hyperfluorescent macular ring in the autofluorescence was found in 61.5% of cases.

Genotype-phenotype correlation: patients with mutations in the most prevalent gene, CERKL, had a distinctive phenotype of low visual acuity, macular atrophy, patchy chorioretinal atrophy and pigment clumps in the periphery.

Conclusions

The prevalence of RP in Gipuzkoa resembles the prevalence found in other populations. A founder mutation has not been demonstrated in Gipuzkoan patients. Mutations in the CERKL gene have been the most frequent. This study has enabled the creation of a registry of RP patients in Gipuzkoa and thanks to the molecular analysis, in the future we will be able to guide the genetic study more efficiently. The OCT and autofluorescence have proven useful for detecting associated complications, assessing the progression of the disease and the response to future therapies.

Introducción

1. La Retinosis Pigmentaria: nota histórica y nosológica

El nombre de Retinitis Pigmentosa (Retinosis Pigmentaria en castellano) lo acuñó por primera vez el Doctor Donders en 1857 (Oftalmólogo holandés Dr. Franciscus Donders). Es la descripción fenotípica de diferentes entidades hereditarias todas ellas relacionadas, aunque distintivas, de los fotorreceptores (FR) de la retina y del epitelio pigmentario de la retina (EPR). Los pacientes presentan escotoma en anillo y problemas para la visión nocturna (nictalopía), los síntomas progresan perdiendo el campo visual periférico y por último la visión central. Es la causa más frecuente de degeneración retiniana hereditaria asociada a ceguera.¹



Figura 1. Dr. Franciscus Donders, uno de los pioneros de la oftalmología científica. Nombró por primera vez la Retinosis Pigmentaria en la literatura.

El término anglosajón “Retinitis Pigmentosa” como muchos otros términos médicos antiguos es una denominación errónea. A pesar del sufijo “itis”, no existe componente inflamatorio ni infeccioso en este grupo de enfermedades. Sería más correcto el término latino de Retinosis Pigmentaria, donde el sufijo “osis” hace referencia a un proceso degenerativo. La Retinosis Pigmentaria (RP) clásicamente ocurre de forma aislada como una enfermedad hereditaria, pero también puede estar asociada a otras enfermedades, denominándose RP sindrómica.

2. Epidemiología descriptiva

2.1. Prevalencia

La RP, incluyendo las formas sindrómicas y las no sindrómicas, tiene una prevalencia en todas las edades de aproximadamente de 1 de cada 4.000 personas, aunque la prevalencia descrita en diferentes estudios varía de 1 de cada 750 a 9000 personas.²⁻¹² En el grupo de edad de entre 45 y 64 años la prevalencia se encuentra en 1 de cada 3.195.⁶ No existe predilección por sexo, pero, como las formas de RP recesivas ligadas al cromosoma X se expresan sólo en varones, estadísticamente puede que los hombres se afecten ligeramente en mayor frecuencia.

La RP no muestra especificidad por etnias, pero la RP causada por mutaciones en genes particulares puede ser más frecuente en ciertas poblaciones aisladas o consanguíneas (como el gen USH3 asociado al síndrome de Usher tipo III, normalmente raro, pero más frecuente en los finlandeses y judíos askenazis).¹³

Los diferentes estudios epidemiológicos demuestran una diferente distribución geográfica de los distintos tipos de herencia de la enfermedad, con una mayor predominancia de los casos ligados al sexo (RPLX) en el Reino Unido frente a una menor proporción de ellos en Norteamérica (USA y Canadá). Esto puede ser debido a que existen muchos casos esporádicos en la RP en los cuales determinar el tipo de herencia sólo es posible al conocer la mutación causante de la enfermedad y por lo tanto, la distribución por tipo de herencia puede cambiar en los estudios de prevalencia más recientes realizados con genotipado.¹⁴

2.2. Estudios en España

En el estudio del grupo multicéntrico de retinosis pigmentaria en España (www.esretnet.org)¹⁵ analizaron 1583 familias con RP.^{14,15} Los resultados epidemiológicos hasta el momento los recoge la siguiente figura:

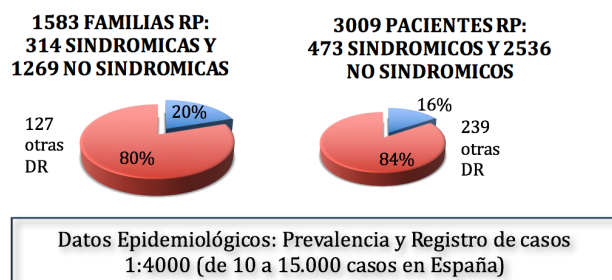


Figura 2. Prevalencia y Registro de casos en España (www.esretnet.org).

2.3. Estudios poblacionales

Diferentes estudios poblacionales han detectado diferentes prevalencias de RP. En Dinamarca en un estudio poblacional llevado a cabo sobre distrofias retinianas en el 2013 se encontró una prevalencia de 1:3454, con un 28% de casos asociados a síndromes y el 72% restante sólo padecían afectación ocular. En cuanto a la herencia encontraron un 45% de casos esporádicos y el patrón de herencia más frecuente fue el autosómico recesivo (RPAR) (23%).¹⁶

Se han encontrado prevalencias más altas en los Indios del Sur (1:570)⁸ y en poblaciones chinas (1:1000) mayores de 40 años⁷, y en Puerto Rico (1:229) en pacientes con RP de todas las edades.¹⁷ La alta prevalencia encontrada en estos países puede ser debido en parte a la mayor incidencia de matrimonios consanguíneos. Se han detectado prevalencias más bajas de RP en Eslovenia (1:6023)¹⁸, Suiza (1:7000)³, EEUU (1:3700)¹⁹, Noruega (1:4440)⁵, el Estado de Maine (1:4756)², China (1:3784)⁴ y la ciudad de Birmingham en el Reino Unido (1:4869)²⁰. Varios autores han estudiado frecuencias en grupos no-poblacionales de pacientes con RP con el objetivo de clasificación genética.^{21,22}

2.4. Registros

Existen registros nacionales de distrofias retinianas en diferentes países. En España tenemos el registro EsRetNet, dentro de la Red de Grupos (G03/018) de investigación cooperativa. El Departamento de Salud del Gobierno Vasco, siguiendo las recomendaciones del Consejo Asesor de enfermedades poco frecuentes de Euskadi, creó en el año 2015 el Registro de Enfermedades Raras de Euskadi. Un registro que recaba los datos por vía telemática desde distintas fuentes: registros de hospitales públicos y privados, del Departamento de salud y Osakidetza, asociaciones de enfermos y familiares. En Osakidetza en el 2015-2016 se implantó el registro de enfermedades raras en el Osabide Global. Se irá creando el registro de enfermedades raras de Osakidetza de una forma paulatina a medida que se registran los diagnósticos de los pacientes vistos por primera vez o tras revisiones.

Impresión Diagnóstica / Diagnóstico / Motivo de Consulta

CIE10 Salud Mental CIE10

Impresión diagnóstica CIE10 F^o Fin Diag.

Capítulo

Subcapítulo

1 RETINOSIS PIGMENTARIA AO 36274

ENFERMEDADES RARAS

Paciente: IRIGOYEN LABORRA, CRISTINA 06/11/2017 14:01:55

1. Nombre de Enfermedad Rara: Retinosis pigmentaria

En caso de seleccionar la categoría OTRAS, o si se quiere precisar, especificar:

2. Código de Enfermedad Rara: H3552 A

3. Tipo de Diagnóstico: **No declarar con una simple sospecha clínica**

Confirmado

Confirmado: si constan en la H. Clínica los resultados de las pruebas específicas de la enfermedad

Probable: si los resultados indican una alta probabilidad y se agotan las pruebas disponibles que existan en el centro declarante

4. Prueba diagnóstica más específica: De las siguientes pruebas diagnósticas seleccione la que considere más específica para este caso.

Críterios Clínicos

En caso de seleccionar "otras" especificar:

Figura 3. Registro de enfermedades raras en la historia clínica electrónica Osabide Global de Osakidetza.

2.5. Impacto económico-social

Se ha estimado que al menos el 90% de los afectados llega en su etapa laboral a una situación de incapacidad. En un estudio multicéntrico en Japón que incluyeron 29 centros de rehabilitación visual, la RP fue la mayor causa de discapacidad visual o ceguera, sumando el 25% de pacientes²³. En Kuwait, la RP fue la primera causa de discapacidad visual en pacientes menores de 60 años²⁴, y en Dinamarca, la RP y la neuropatía óptica fueron las primeras causas de ceguera en la población comprendida entre los 20 y 64 años, cada una correspondiendo al 29% de los casos respectivamente.²⁵ En un estudio retrospectivo llevado a cabo en EEUU estimaron el gasto anual por paciente de los servicios sanitarios de los pacientes con RP comparando con un grupo de pacientes sin RP.²⁶ El gasto sanitario fue significativamente mayor en pacientes con RP con un coste de 894\$, 4855\$ y 452\$ más respecto al grupo control para ingresos, consultas externas y farmacia respectivamente. El gasto sanitario total fue de 7317\$ más por paciente al año en el grupo de RP. El estudio concluye que los tratamientos que retrasen o reestablezcan la visión en pacientes con RP pueden ser costo-eficientes para la sociedad.

En España, a partir de datos estimados de un informe elaborado por la fundación Retinaplus se estima que la RP supone un 24% del coste de discapacidad por patología ocular, ocupando el tercer puesto por detrás de la degeneración macular asociada a la edad y la retinopatía diabética (Ver tabla 1). Y el coste de la ceguera en el grupo de RP calculado en el mismo informe ascendería a un total de 1.479,95€ por persona al año, situándose en el segundo lugar después de la retinopatía diabética (ver tabla 2).

En la figura 4 se resumen los costes directos e indirectos de la patología retiniana.

<i>Patología</i>	<i>Distribución del coste de discapacidad por patología</i>
Degeneración macular asociada a la edad (DMAE)	35%
Retinopatía Diabética (RD)	35%
Retinosis Pigmentaria	24%
Glaucoma	5%
Cataratas	1%

Tabla1. Carga de la discapacidad por patología. Estimado a partir de datos de la ONCE. Datos cedidos por la Fundación Retinaplus.

<i>Enfermedades</i>	<i>Coste patologías</i>	<i>% afiliados ONCE</i>	<i>% afiliados ONCE normalizado</i>	<i>Coste de la Ceguera</i>
Retinopatía Diabética	7.990 €	6,87%	22,25%	1.777,76 €
Retinosis Pigmentaria	5.191 €	8,80%	28,51%	1.479,95 €
Glaucoma	2.558 €	3,64%	11,79%	301,59 €
Cataratas	1.149 €	1,62%	5,25%	60,32 €
DMAE	4.585 €	9,94%	32,20%	1.476,37 €
Total		30,87%	100%	5.095,99 €

Tabla 2. Coste anual de la ceguera en España. Datos cedidos por la Fundación Retinaplus.

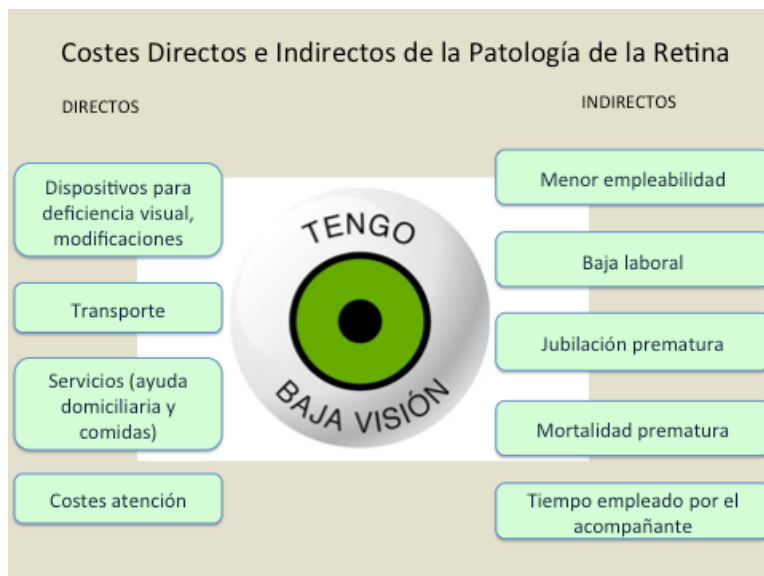


Figura 4. Costes directos e indirectos de la patología retiniana.

3. Patogenia y aspectos clínicos de la Retinosis Pigmentaria

La RP se trata de un grupo heterogéneo de enfermedades que comparten la pérdida gradual de los dos tipos de fotorreceptores (figura 5): bastones, que median la visión acromática a la luz de las estrellas o la luz de la luna; y los conos, que son importantes para la visión del color y la agudeza fina en la luz del día. La capa nuclear externa de la retina se compone de los núcleos de bastones y conos y se ve severamente atenuada en pacientes con RP. La capa nuclear interna, compuesta de células amacrinas, células bipolares y células horizontales, y la capa de células ganglionares están bastante bien conservadas, pero muchas de estas células degeneran según avanza la enfermedad.

Los bastones representan el 95% de todos los fotorreceptores de los humanos y son responsables de la visión escotópica, mientras que los conos son responsables de la visión fotópica, visión en colores y la agudeza visual y aumentan en intensidad a medida que nos acercamos al centro de la mácula.

En 1990 se identificó, el primer gen implicado en la RP, Rhodopsina (RHO).²⁷ Codifica el pigmento visual de los bastones. Desde entonces, se ha establecido que las mutaciones en muchos genes pueden causar RP (RetNet: Summaries of Genes and Loci Causing Retinal Diseases).²⁸ Hasta la fecha, se han identificado 70 genes y loci en RP no sindrómicos, incluidos 23 para formas dominantes, 42 para formas recesivas, 5 para la herencia ligada al cromosoma X y uno, ROM1, que se ha encontrado mutado sólo en el digenismo con RDS. Los productos génicos se localizan en los bastones (a veces en bastones y conos), estando involucrados en diversas vías metabólicas. Incluyen proteínas de la transducción visual de bastones (rhodopsina, las subunidades α y β de la fosfodiesterasa de bastones, las

subunidades α y β del canal GMPc de bastones, arrestina, la proteína 1B activadora de la guanilato ciclasa), las proteínas del citoesqueleto (periferina/RDS, ROM1, fascina 2), proteínas responsables del tráfico (RPGR, RP1, RP2, prominina-like 1), proteínas involucradas en la diferenciación de fotorreceptores (NRL, NR2E3, CRX), en el corte y empalme (*splicing*) del RNAm (PRPC8, HPRP3, PRPF3, PRPF4, PRPF6, PRPF8, PRPF31, PAP1, SNRNP200), en la composición de las matrices extracelulares (USH2A) y en las vías metabólicas de lípidos (ABCA4, CERKL), nucleótidos (IMPDH1) u otras sustancias (TULP1, CRB1, MITS2, CA4, SEMA4A). Además, la RP también está causada por mutaciones de los genes expresados en los tejidos de apoyo al fotorreceptor, como es, el epitelio pigmentario de la retina (EPR), las proteínas codificadas por estos genes están involucradas en el metabolismo del retinol (retinol isomerasa RPE65, el 11-cis retinoide transportador CRALBP, la lecitina retinol acilo transferasa LRAT, RGR) o en la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores (cMERTK).

3.1. Especificidades de los fotorreceptores

La heterogeneidad genética de la RP es difícil de correlacionar con el fenotipo bastante homogéneo de la enfermedad. Los fotorreceptores, y particularmente los bastones, pueden requerir un ambiente altamente regulado para funcionar correctamente y cualquier alteración de su homeostásis puede hacer que estas células sean propensas a la apoptosis, causando la pérdida de bastones y conos. Los fotorreceptores se componen de un segmento externo (OS), un segmento interno, un cuerpo celular y una terminal sináptica donde ocurre la neurotransmisión con una neurona de segundo orden (Figura 5). Los OS se renuevan en un ritmo circadiano desde la base del OS del fotorreceptor, el epitelio pigmentario de la retina fagocita los discos distales del OS, y así se mantiene la longitud del OS constante. Los bastones tienen un segmento exterior muy alargado que contiene varios centenares de discos de membrana en los que ocurre la transducción visual. Los discos contienen enormes cantidades de proteínas de la transducción visual, particularmente rodopsina ($\sim 4 \times 10^7$ moléculas por bastón) y proteínas del citoesqueleto. Los discos del ápice del segmento externo del bastón son fagocitados diariamente por el epitelio pigmentario de la retina (EPR), y este fenómeno es compensado por un aumento diario de la síntesis del disco en la base del segmento externo. Esto requiere de una intensa actividad de RNAm y síntesis de proteínas, así como un importante tráfico de proteínas desde el segmento interno del bastón, a través del cilio de conexión, hasta el segmento externo del bastón. Esta actividad celular genera un importante consumo energético, requiriendo alto contenido de mitocondrias y oxígeno, y mecanismos para proteger la célula contra el estrés oxidativo.²⁹

3.2. Posibles vías comunes para la muerte celular de los fotorreceptores

La pérdida del segmento externo de los bastones puede estar causada por mutaciones que conducen a su desestabilización (mutaciones en el citoesqueleto o en las proteínas de tráfico). Esto acortaría considerablemente la capa fotorreceptora y expondría al cuerpo celular del fotorreceptor a niveles altos de presión de oxígeno, y por consiguiente se produciría toxicidad por el oxígeno. Las mutaciones que conducen a la disminución de la capacidad de responder a la alta demanda de energía o de la síntesis de RNAm / proteína pueden desestabilizar el segmento externo. Otros mecanismos que pueden estar implicados son la toxicidad del calcio o el agotamiento metabólico por la apertura permanente del canal cerrado por GMPc, debido a proteínas de transducción visual defectuosas, o, inversamente, debido al bajo nivel de calcio cuando la transducción visual está permanentemente activada.³⁰ Por último, las alteraciones en las funciones críticas del EPR, como la fagocitosis del disco o el metabolismo del retinol, también pueden alterar el equilibrio fino del metabolismo de los fotorreceptores.²⁹

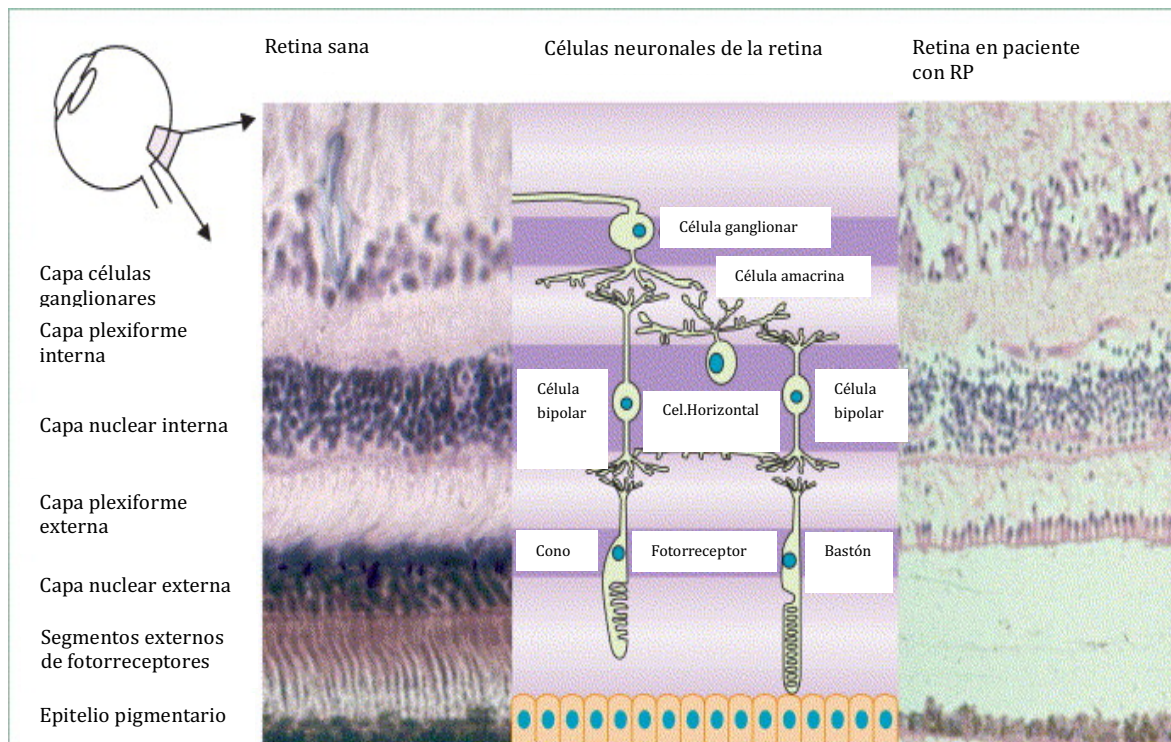


Figura 5. Aspecto histológico de la retina humana sana (izquierda) y de la retina de un paciente con RP en una etapa media de la enfermedad. Se puede observar una gran disminución en la densidad de células fotorreceptoras en la capa nuclear externa (modificado de Hartong et al., 2006).³¹

La RP se caracteriza por la triada clínica de pigmento en forma de espículas óseas, atenuación arteriolar y palidez papilar. Estudios post-mortem han descrito que la pigmentación está causada por la gemación y asentamiento de las células del EPR sobre las capas de la retina neurosensorial. En estadios avanzados de la enfermedad se aprecia un adelgazamiento de los vasos retinianos, probablemente debido a la pérdida de células retinianas y por consiguiente menor requerimiento vascular.

La RP evoluciona a un gradual deterioro de las células retinianas sensibles a la luz. Se pueden afectar tanto los conos como los bastones, y dependiendo del defecto genético de cada paciente se verán afectados los conos y los bastones en diferente proporción. La pérdida de los bastones es la norma en la RP y los conos se afectarán a medida que avanza la enfermedad. Las distrofias de conos, sin embargo, son una entidad propia donde se afectan los conos sin afectación de bastones y se presentan con diferente clínica.

3.3. Síntomas y signos

Los **síntomas** frecuentemente comienzan en la adolescencia con pérdida de la visión nocturna (nictalopía). Se produce una pérdida de la visión periférica gradual (muchas veces refieren tropiezos frecuentes, no ver el balón en las clases de gimnasia, etc), al afectarse los bastones antes que los conos el campo visual se va estrechando progresivamente, quedando en fases avanzadas lo que se conoce como visión en cañón de escopeta. En casos evolucionados puede producirse la pérdida de la visión central. Cuando la agudeza visual es menor de 0,5 (escala de Snellen) también se altera la percepción de los colores. La RP evoluciona a la ceguera en un rango variable de pacientes. Los síntomas normalmente son aparentes en las edades comprendidas entre los 10 y 30 años (en las formas recesivas y ligadas al sexo se suele iniciar en la primera década y en las dominantes en la segunda década), aunque existen casos de diagnóstico en niños y en adultos. En una forma de RP, la amaurosis congénita de Leber (ACL), los niños pueden padecer ceguera o pérdidas severas de agudeza visual en los primeros seis meses de vida. Otros tipos de RP presentan síntomas en la edad adulta y pueden diagnosticarse como hallazgo casual en una exploración oftalmológica. En algunos casos, la RP se diagnostica tras un accidente de tráfico, debido a la disminución del campo visual (CV) periférico.

Signos

Los hallazgos oftalmoscópicos más característicos son: pigmentación retiniana en forma de espículas óseas, atenuación arteriolar y palidez del nervio óptico. También se observan con frecuencia lesiones en la retina central.

La dispersión y agregación de pigmento retiniano produce cambios que van desde un moteado granular hasta agregados focales con la apariencia de espículas óseas. La retina presenta concentraciones de pigmento en forma de estrella marrón oscuro o negro. Existen diferentes patrones de pigmentación, incluyendo el pigmento localizado a un cuadrante de la retina (RP sectorial), pigmentación que parece irradiar desde el nervio óptico y paravascular.

Otras manifestaciones oculares son:³¹

- Catarata subcapsular posterior (41%)³²
- Membrana epirretiniana (MER) (0,6 a 27,3%)³³
- Edema macular (EMQ) (5,5 a 24,5%)³⁴
- Miopía³⁵
- Drusas del nervio óptico (10%)³⁶
- Glaucoma (2,3%)³⁷
- Alteraciones vítreas: células pigmentadas finas, con aspecto de polvo, liberadas por la degeneración del EPR, desprendimiento posterior del vítreo, turbidez vítrea.

3.4. Asociaciones sistémicas

La RP generalmente afecta únicamente al ojo, aunque un 20-30% de casos presentan asociaciones sistémicas. Se han descrito al menos 30 síndromes asociados diferentes.³¹ La RP sindrómica más frecuente es el síndrome de Usher, el cual cursa con pérdida de audición, que puede ser leve o severa y congénita o de aparición tardía (Ver tabla 4). El síndrome de Usher está implicado en la mitad de todos los casos de sordoceguera combinada.³⁸ La RP asociada a la pérdida de audición también se asocia al síndrome de Waardenburg, síndrome de Alström, síndrome de Alport, síndrome de Refsum y otras alteraciones sistémicas, las cuales tienen sus propias manifestaciones sistémicas. El síndrome de Bardet-Biedl o síndrome de Laurence-Moon es la segunda RP sindrómica en frecuencia y es responsable del 5-6% de todos los casos de RP. Este síndrome asocia RP a obesidad, insuficiencia renal, polidactilia, retraso mental e hipogonadismo.³¹ Para una descripción de los diferentes síndromes ver la tabla 3.

SÍNDROME	ASOCIACIONES SISTÉMICAS
Amaurosis congénita de Leber (ACL)	Amaurosis y nistagmo. Alteraciones psicomotoras. Estrabismo
Síndrome de Usher	Sordera
Síndrome de Bardet-Biedl	Retraso mental. Obesidad. Hipogonadismo. Polidactilia. Nefropatía.
Síndrome de Hallgren	Sordera congénita. Ataxia vértigo-cerebral (90%). Deficiencia mental (25%).
Síndrome de Almstrom	Nistagmo. Sordera neurosensorial progresiva. Obesidad. Diabetes insulino dependiente. Nefropatía. Hipogonadismo.
Síndrome de Cockayne	Baja estatura. Fotosensibilidad de la piel. Demencia prematura. Caquexia. Disfunción cerebelar. Sordera.
Síndrome de Joubert	Hipoplasia vermis, ataxia. Nistagmus. Retraso mental. Quistes renales. Taquipnea. Polidactilia
Síndrome de Jeune	Hipoplasia torácica. Braquidactilia. Nefropatía.
Síndrome de Senior Loken	Nefronoptosis.
Síndrome de Bassen-Kornzweig	Esteatorrea. Ataxia. Neuropatía periférica sensorial y motora. Depósitos de pigmento a nivel retiniano
Enfermedad de Refsum	Neuropatía periférica. Anosmia. Sordera. Ataxia. Cardiomiopatía.
Síndrome de Kearns-Sayre	Oftalmoplejía externa. Ptosis. Debilidad muscular. Cardiomiopatía. Sordera. Baja estatura.
Síndrome de Hallen Vorden-Spatz	Disfunción motora extrapiramidal progresiva. Demencia.
Síndrome de Pelizaeus-Merzbacher	Alteraciones del troncoencéfalo. Espasticidad. Ataxia. Nistagmo. Raquitismo. Retraso mental.
Ataxia cerebelosa dominante tipo II (SCA7)	Atrofia olivopontocerebelosa. Ataxia. Tremor. Oftalmoplejía.
Síndrome de Graefe	Cambios degenerativos graves del SNC. Oftalmoplejía progresiva hasta inmovilidad y ptosis.
Lipofuscinosis neuronal (Enfermedad de Batten)	Demencia. Retraso mental. Las formas infantiles y juveniles se asocian a RP: infantil (Haltia- Santavuori), infantil tardía (Jansky- Bielschowsky), juvenil precoz (Lake- Cavanagh) y juvenil (Spielmeyer- Vogt-Batten).
Mucopolisacaridosis	Retraso mental. Displasia del esqueleto. Sólo los tipos en los que se deposita heparan sulfato se asocian a distrofia retiniana: Tipo IH (Síndrome de Hurler), tipo IS (Síndrome de Scheie), tipo II (Síndrome de Hunter) y tipo III (Síndrome de Sanfilippo).

Tabla 3. Tipos más frecuentes de RP sindrómica. Tabla modificada de Retinosis Pigmentaria. Avances diagnósticos y terapéuticos.³⁹

Tipo clínico	Visión	Audición	Función vestibular	Locus (Genes) implicados
Tipo I	Disminución progresiva de visión desde la infancia	Sordera de nacimiento.	Problemas de equilibrio graves desde una edad temprana, que empeora con la disminución de visión.	USH1B (MYO7A), USH1C(USH1C), USH1D (CDH23), USH1E, USH1F (PCDH15), USH1G(USH1G), USH1H, USH1J (CIB2), USH1K
Tipo II	Disminución progresiva de visión comienza en la adolescencia o edad adulta temprana	Sordera moderada a severa al nacimiento, disminución progresiva de audición.	No ataxia vestibular.	USH2A (USH2A), USH2C (GPR98), USH2D (DFNB31)
Tipo III	Disminución progresiva de visión comienza en la adolescencia o edad adulta temprana	No problemas de audición al nacer, pero disminución progresiva de audición que comienza en la adolescencia o edad adulta temprana.	Variable alteración del equilibrio.	USH3A (CLRN1), USH3B

Tabla 4. Síndrome de Usher. Tipos clínicos, manifestaciones visuales y auditivas y genes implicados.

3.5. Diagnóstico diferencial

Las degeneraciones de la retina pigmentarias ocurren en numerosas enfermedades metabólicas y neurodegenerativas, varios síndromes y otras enfermedades oculares. Entre ellas incluimos las más relevantes: distrofia de conos y bastones, distrofia de conos, ataxia de Friedreich, mucopolisacaridosis (síndrome de Hurler, síndrome de Scheie, síndrome de Sanfilippo), algunas enfermedades mitocondriales como el síndrome de Kearns-Sayre, que se manifiesta con ptosis palpebral, oftalmoplejía externa y alteraciones en la conducción cardíaca, distrofia miotónica de Steinert, síndrome de Batten, síndrome de Bassen-kornzweig (abetalipoproteinemia), homocistinuria, oxalosis, trauma, glaucoma con cambios en el EPR, estadios avanzados de retinopatía por cloroquina y retinopatía por tioridacina, neurorretinitis sifilítica y retinopatía asociada al cáncer, síndrome de Alagille,

Sd. de Cockayne, Sd. de Flynn-Aird, Sd. de Hallervorden-Spatz, Sd. de Jeune, Sd. de Senior-Loken...⁴⁰

Para el diagnóstico diferencial es clave la asimetría de la afectación en los casos de “Pseudoretinosis pigmentaria”, la historia clínica en busca de causas secundarias como toxicidad farmacológica y la no existencia de antecedentes familiares.

<i>Diagnóstico diferencial: PseudoRP</i>
<ul style="list-style-type: none"> Enfermedades inflamatorias retinianas: Retinopatía de la rubéola Sífilis
<ul style="list-style-type: none"> Retinopatía asociada al cáncer (CAR)
<ul style="list-style-type: none"> Toxicidad farmacológica: Tioridazina, clorpromazina, cloroquina, hidroxiclороquina, quinina.
<ul style="list-style-type: none"> Retinopatía traumática.
<ul style="list-style-type: none"> Neurorretinitis subaguda unilateral difusa (DUSN)
<ul style="list-style-type: none"> Pigmentación en grupos de la retina (en huellas de oso)

Tabla 5. Diagnóstico diferencial RP.

4. Genética de la RP

Las enfermedades hereditarias de la retina son genéticamente heterogéneas y complejas, con más de 290 genes implicados hasta el momento (figura 9). En el caso de la RP se han identificado más de 3000 mutaciones en 107 genes para la RP y RP sindrómica (RetNet: Summaries of Genes and Loci Causing Retinal Diseases (<https://sph.uth.edu/retnet/>)).²⁸ Se ha estimado que los genes identificados representan aproximadamente el 80% de la RP dominante, el 60% de la RP recesiva y aproximadamente el 80% de la RP ligada al cromosoma X, el resto de mutaciones en diferentes genes o en zonas regulatorias de los genes conocidos o en regiones intrónicas del genoma, están aún por determinar.⁴¹⁻⁴³ La mayoría de casos son monogénicos, y el 30% de los casos conocidos están causados por mutaciones en 3 genes: rodopsina (RHO), USH2A y RPGR (ver figuras 6-8).³¹

La enfermedad puede heredarse de una forma autosómica dominante (RPAD) (en el 20-40% de casos), autosómica recesiva (RPAR) (30-50%), o ligada al cromosoma X (RPLX) (5-15%).^{31,44} Estos porcentajes de patrones de herencia asumen que todos los casos esporádicos, por ejemplo, pacientes sin otros familiares afectados, son autosómicos recesivos, aunque alguno puede corresponder a una nueva mutación dominante, a casos

de isodisomía uniparental^{45,46} o, en el caso de varones, a mutaciones ligadas al cromosoma X. Otros autores hablan de un 40% de casos esporádicos, aunque estos porcentajes varían según poblaciones.⁴⁴ Se han descrito patrones de herencia no mendeliana, como la herencia digénica y la herencia materna (mitocondrial), aunque estos casos son la minoría.⁴⁷⁻⁵¹

Las formas autosómicas dominantes tienden a tener una progresión más lenta y detectarse en edades más avanzadas, preservando la visión hasta la quinta o sexta década. Las formas ligadas al cromosoma X son las formas más graves, con pérdida de visión en la tercera década.

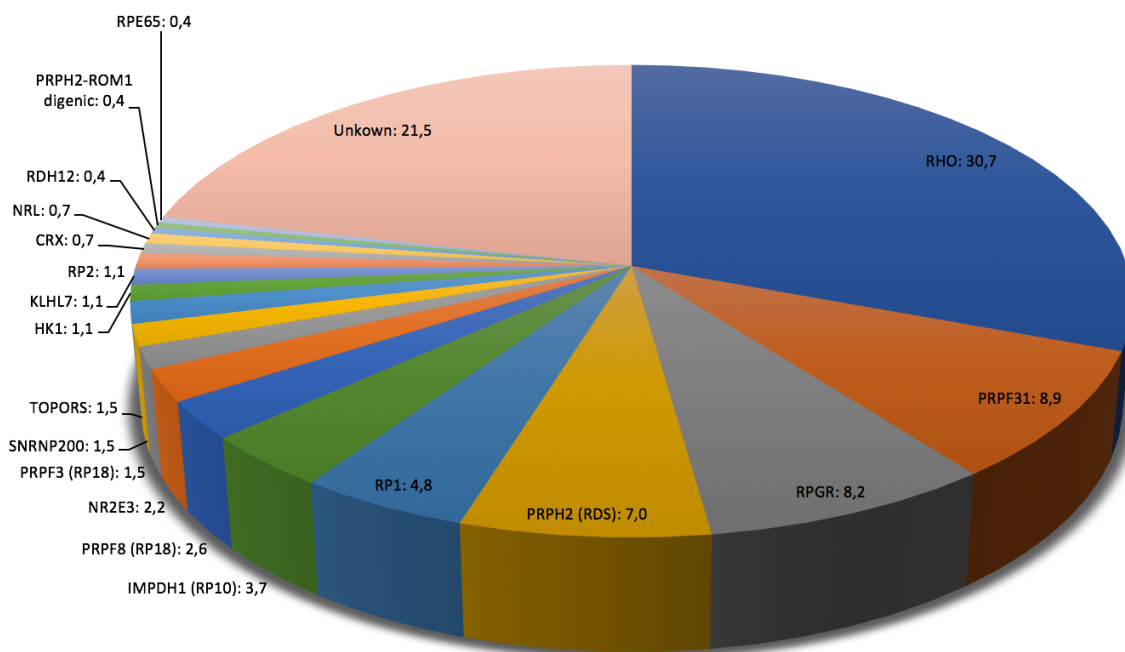


Figura 6. Porcentaje de mutaciones causantes de RPAD en 270 familias estudiadas. Modificado de Daiger y cols, 2014 ⁵² . Prevalencia de genes de los casos de RP autosómica dominante, que representan aproximadamente el 20-40% de todos los casos de esta enfermedad.³¹

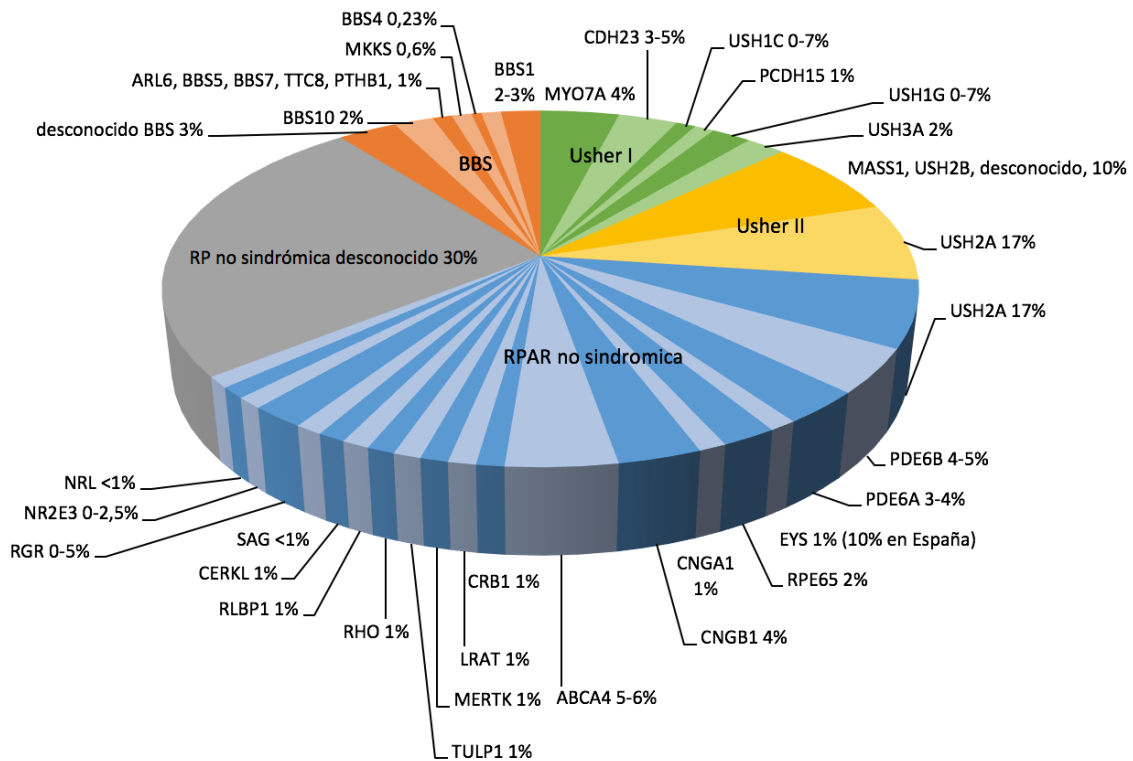


Figura 7. Prevalencia de genes de los casos de RP autosómica recesiva, que representan aproximadamente el 30-50% de todos los casos de esta enfermedad (modificado de Hartong et al., 2006).^{31,43}

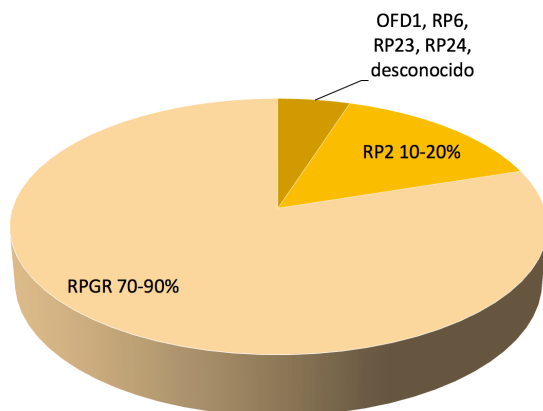


Figura 8. Prevalencia de genes de los casos de RP ligado al cromosoma X, que representan aproximadamente el 5-15% de todos los casos de esta enfermedad.^{31,43}

Varios factores han contribuido a que la caracterización molecular y la correlación fenotipo-genotipo de la RP sea un verdadero desafío. Entre estos factores se incluyen el elevado número de genes y variantes genéticas implicadas (gran heterogeneidad genética), así como la implicación de distintos patrones de herencia, difíciles de poder identificar en muchos casos, dado el pequeño tamaño de las familias occidentales actuales. Además, también existen casos aislados de herencia no mendeliana, tales como penetrancia incompleta o herencia mitocondrial. Existen además casos en los que dos mutaciones diferentes en el mismo gen pueden generar diversas enfermedades (por ejemplo, mutaciones en el gen ABCA4 pueden producir RP y enfermedad de Stargardt), y casos con la misma mutación en un gen, que puede causar fenotipos diferentes en distintos individuos. Por ejemplo, a pesar de que las mutaciones en el gen de la rodopsina suelen estar vinculadas a RP dominantes, unas pocas mutaciones raras en este gen pueden causar RP recesiva. Además, la fracción de mutaciones causantes de la enfermedad varía también con la raza y con la localización geográfica del individuo.^{13,29,53,54}

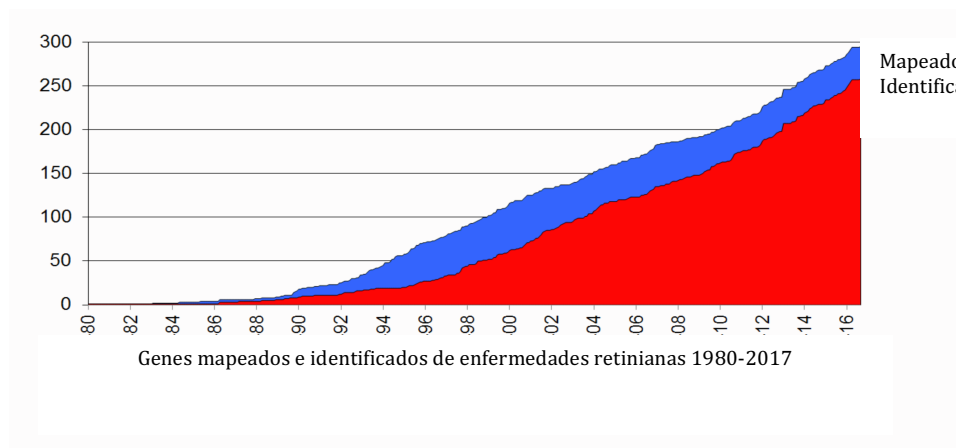


Figura 9. Genes identificados de enfermedades retinianas desde 1980 hasta 2017.

4.1. Secuenciación del genoma

Los métodos para determinar la secuencia del ADN fueron desarrollados a finales de 1970 por Frederick Sanger y Walter Gilbert, y han revolucionado la ciencia de la genética molecular. El desarrollo del método de terminación de cadena en 1977, y en especial la conclusión del primer borrador del genoma humano en el año 2001,^{55,56} han impulsado el florecimiento de nuevas tecnologías que proporcionan información genética precisa de forma rápida con una relación coste/eficiencia sin precedentes. Esta nueva generación de tecnologías se conoce como las tecnologías de *Next Generation Sequencing* (NGS). Gracias a esta nueva tecnología se han visto reducidos de forma exponencial, el tiempo empleado, la dificultad técnica y el coste de la secuenciación total o parcial del genoma humano.^{13,57} Por

ejemplo, el coste por nucleótido de la secuenciación del ADN se ha reducido 100.000 veces en la última década y la actual generación de sistemas de secuenciación puede leer hasta 250 mil millones de bases en una semana en comparación con 25.000 en 1990 y 5 millones en 2000.^{55,58}

A pesar de la reducción tan significativa en el coste asociado a la secuenciación del genoma, existe un número de limitaciones técnicas de interpretación y almacenaje de resultados, que hacen que aún siga siendo una opción no contemplada por la mayoría de laboratorios como método diagnóstico clínico. Una opción más práctica como primer método de detección de mutaciones consiste en secuenciar un grupo o panel de genes asociados a cierta enfermedad.

Resumimos brevemente las diferentes técnicas de diagnóstico molecular que se han empleado en las distrofias retinianas y que hemos dividido en métodos de cribado y de secuenciado:

4.1.1. Métodos de cribado genético

4.1.1.1. Análisis de High Resolution Melting (HRM)

4.1.1.2. Arrays de ADN

4.1.2. Métodos de secuenciado

4.1.2.1. Método de Sanger o de terminación de cadena

4.1.2.2. Next Generation Sequencing (NGS):

4.1.2.2.1. Método de terminación reversible (Illumina)

4.1.2.2.2. Método de secuenciado mediante semi-conducción (ION Torrent)

Para más información sobre las técnicas empleadas ver el artículo de revisión publicado por nuestro grupo.⁵⁹

4.1.1. Métodos de cribado genético

4.1.1.1. Análisis de High Resolution Melting (HRM)

El análisis de *High Resolution Melting* (HRM) es un método de cribado post-PCR rápido y coste-eficiente que proporciona una rápida detección de variantes genéticas, basada en mediciones biofísicas del ADN amplificado.^{60,61} La transición de una única molécula de ADN de doble hebra a sus dos hebras complementarias –desnaturalización o *melting*– permite el estudio de la estructura y composición de esa molécula de ADN midiendo el cambio en la intensidad de la fluorescencia por unidad de tiempo. El método HRM ofrece

información valiosa para el genotipado, la detección de mutaciones, metilación del ADN, análisis de microsatélites y otras aplicaciones en la investigación de genética molecular.⁶²

El HRM es más rápido, simple y asequible que otras técnicas de análisis de variación de ADN debido a la eliminación de pasos como la adición, el procesamiento o la separación del ADN.⁶³ La reacción y el análisis tiene lugar en el mismo instrumento reduciendo al mínimo los errores de manipulación.⁶⁴ Estos hechos contribuyen a hacer el análisis de HRM más sensible y específico que otras técnicas, tales como la cromatografía líquida desnaturizante de alta presión (dHPLC), el polimorfismo de conformación de cadena sencilla o (SSCP) y los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción o (RFLP).^{65,66} La reciente disponibilidad de fluoróforos de unión a secuencias de doble hebra de alta densidad, junto con la nueva instrumentación y los programas de análisis de PCR a tiempo real de última generación, han aumentado la sensibilidad y la precisión mejorando notablemente el potencial clínico de esta tecnología de cribado.

El análisis mediante el método de HRM comienza con la amplificación selectiva del amplicón diana mediante PCR en presencia de un fluoróforo de unión a la doble hebra de ADN. A medida que el producto de la PCR se disocia gradualmente en dos cadenas simples, el fluoróforo es liberado y se produce una fuerte pérdida de emisión de fluorescencia del orden de 1000 veces, relacionada con este proceso. La fluorescencia emitida por el fluoróforo, que se mide con instrumentos especializados, genera una curva característica y muy precisa gracias a un gran número de puntos de medida de la fluorescencia por unidad de temperatura. Mediante la medición de la temperatura de fusión (temperatura en la que el 50% del ADN permanece en estado de doble cadena), se pueden detectar diferencias entre 2 grupos de amplicones que difieren en una única base (hebra mutada vs. hebra salvaje o *wild type* (wt)).⁶⁷

Una característica interesante del análisis HRM es su capacidad para detectar todas las categorías de variantes genéticas, incluyendo las sustituciones, inversiones, y pequeñas inserciones y deleciones de hasta 63 pb de longitud⁶⁸. Sin embargo, las deleciones o inserciones en las que estén implicados varios exones pueden escapar a su detección mediante esta técnica.⁶⁹

La sensibilidad en la detección de variantes heterocigotas es notable, con varios estudios que confirman la detección del total de mutaciones heterocigotas examinadas con HRM.^{70,71} Las variantes homocigotas difieren de las muestras *wt* en la temperatura de

fusión del ADN, mientras que las variantes heterocigotas producen una modificación que es más acentuada en la forma de la curva de fusión generada que en el cambio en la temperatura. Estos últimos tipos de variantes se resuelven mejor mediante el uso de diagramas de curvas de fusión avanzados, en los que las pequeñas diferencias en los valores de fusión se representan de manera amplificada.⁷² Para la detección de variantes genéticas mediante la técnica HRM se recomiendan tamaños de amplicones de longitudes que oscilan entre los 100 y los 300 pb, incluyendo los *primers*.

La detección de variantes genéticas o de mutaciones causantes de enfermedades humanas, ha sido el principal campo de aplicación del HRM, utilizado en trastornos autosómicos dominantes, recesivos y ligados al cromosoma X.^{65,73} Hasta la fecha, cientos de mutaciones en más de 60 genes han sido analizados con esta tecnología, incluyendo ciertos genes asociados con la RP, tales como C2ORF71, USH2A o ABCA4.^{61,65,74,75} El análisis HRM es un enfoque apropiado como método de cribado genético masivo cuando se combina con la secuenciación directa, siendo especialmente adecuado para genes relativamente pequeños (<4 KB) como USH3A, PRPF31 o ROM1 (Figura 10).

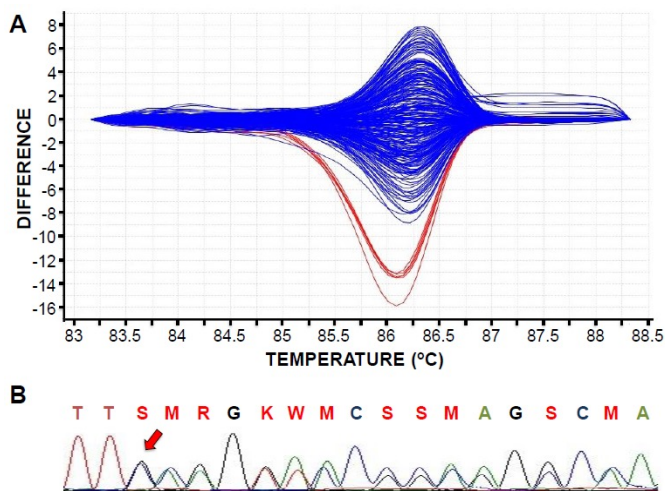


Figura 10. Análisis *High Resolution Melting* (HRM). (A) Las curvas generadas en el *Difference Plot analysis* amplifican las diferencias en la temperatura de fusión introducidas en la secuencia de DNA *mutada*, facilitando el análisis del HRM. Este ejemplo corresponde al exón 3 del gen ROM1. Dos muestras (en rojo, cada una por triplicado) se diferencian claramente de las muestras control o *wt*, lo que sugiere la presencia de una variante genética. (B) Electroferograma obtenido mediante secuenciación directa por el método de Sanger correspondiente a una de las muestras en rojo en el análisis de HRM. Se confirma la presencia de una deleción puntual heterocigota (flecha) en el exón 3 de ROM1. La deleción se identifica por la irrupción de una nueva señal de fluorescencia correspondiente a la hebra mutante que genera un cambio en el marco de lectura.^{59,61}

4.1.1.2. Arrays de ADN

Los *microarrays* o chips de ADN, consisten en una tecnología de cribado y validación de alto rendimiento rápida y eficiente utilizada con éxito en el diagnóstico de varias patologías, incluyendo glioblastoma, cáncer colorrectal, leucemia linfocítica crónica, epilepsia idiopática generalizada o autismo.⁷⁶⁻⁷⁹ Para una revisión detallada de su aplicación en diagnóstico clínico ver los artículos de Marzancola et al. y Keren et al.^{80,81}

Esta tecnología, originalmente diseñada para la detección de variantes genómicas en el número de copias o CNV (del inglés *Copy Number Variation*) y para llevar a cabo genotipados de Polimorfismos de nucleótido simple o SNPs (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*), permite el análisis del genoma completo de muestras de pacientes utilizando un formato basado en chips. Las actuales aplicaciones de los *arrays* de ADN en la genética clínica incluyen el análisis de los perfiles de expresión génica; la detección de *splicing* alternativos; la pérdida de heterocigosidad; pruebas de disomía uniparental o la identificación de adenina metiltransferasa en el ADN.⁸²⁻⁸⁵

Los *microarrays* son dispositivos en miniatura hechos de cristal de silicio compuestos por millones de pocillos de dimensiones micrométricas, cada uno de los cuales contiene cientos de miles de copias idénticas de secuencias cortas o sondas de ADN de cadena sencilla, inmovilizadas en una posición estratégica y determinada en el array (figura 11). Las sondas utilizan la atracción química natural entre las hebras de ADN para hibridarse selectivamente sólo con las moléculas de ADN perfectamente complementarias a ellas. Por lo tanto, estos arrays pueden utilizarse para identificar la presencia de un alelo particular en el contexto del genoma completo de un sólo individuo.

En lo que respecta a los *arrays* de Affymetrix, las sondas de aproximadamente 25 nucleótidos de longitud que representan a todos los posibles alelos en un sitio polimórfico (típicamente, un par), están unidos a los pocillos de 8 µm de tamaño. Una vez aislado, amplificado, fragmentado y marcado con fluorescencia, la secuencia de ADN diana se introduce en el chip hibridándose únicamente a las sondas que son perfectamente complementarias a ella. El array se escanea y la intensidad de las señales fluorescentes emitidas se miden para cuantificar la cantidad relativa de la muestra unida a cada pocillo. La posición de las señales fluorescentes dentro del array es utilizada para determinar qué alelos están presentes en el genoma del individuo genotipado. Los *arrays* de Affymetrix son capaces de determinar en un sólo ensayo hasta 1,8 millones de variantes genéticas comunes y raras validadas, incluyendo inserciones y deleciones. Esta tecnología ha sido

elegida con anterioridad para el genotipado de muestras en proyectos relacionados con trastornos de la retina.⁵⁷

La principal limitación de los *microarrays* de genotipado, es que sólo son válidos para las variantes genéticas conocidas, excluyendo los SNPs más recientemente descubiertos o los descartados por el fabricante.



Figura 11. Imagen del DNA Axiom® Exome 319 Array Plate de Affymetrix formado por 96 *arrays* idénticos para el genotipado en paralelo del mismo número de muestras (www.openarray.de/plataforms/affymetrix.php).

4.1.2. Métodos de secuenciado

4.1.2.1. Método de Sanger o de terminación de la cadena

El método de secuenciación por terminación de la cadena o más conocido como método de Sanger⁸⁶ ha proporcionando la tecnología básica para la secuenciación del ADN durante casi tres décadas y ha sido clave para el desarrollo del Proyecto Genoma Humano.⁵⁵ Este método es considerado como la tecnología de secuenciación de primera generación, y las últimas tecnologías en secuenciado de ADN se han denominado como los sistemas *Next Generation Sequencing* o NGS.⁸⁷

El método de Sanger se lleva a cabo en cuatro reacciones separadas, en cada una de las cuales se incluye un ADN polimerasa, *primers* de ADN que flanquean específicamente la secuencia diana y los cuatro tipos diferentes de desoxinucleótidos (dNTPs). El principio fundamental de esta técnica es el uso de didesoxinucleótidos trifosfatos de terminación de la cadena (ddNTPs). Uno de los cuatro tipos diferentes de ddNTPs, los cuales se encuentran marcados radiactivamente, se añade a cada reacción. En lugar de tener un grupo-OH, los ddNTPs tienen un átomo de hidrógeno unido al carbono 3', que causa la terminación de la reacción de elongación debido a la incapacidad para formar un enlace fosfodiéster con el nucleótido siguiente. Por lo tanto, la longitud de la cadena de ADN en

cada reacción dependerá de la longitud de la cadena cuando se incorpora un ddNTP al azar. Una vez que las cuatro reacciones se han completado, se aplica una separación electroforética de alta resolución en un gel de poliacrilamida para la separación por longitudes de estas cadenas con una resolución de un solo nucleótido.⁸⁸ Finalmente, el gel se seca sobre papel de cromatografía y se exponen en una película de rayos X que permite la lectura directa de la secuencia de ADN donde, una banda oscura en un carril indica un fragmento de ADN que es resultado de la terminación de la cadena después de la incorporación de un ddNTP.

A principios de la década de 1990, se introdujo una mejora metodológica llamada secuenciación por terminador fluorescente o *Dye Termination sequencing*, y se convirtió en el método principal de secuenciación automatizada. La principal mejora de esta técnica radica en el hecho de que cada ddNTP está marcado con un fluoróforo fluorescente diferente, permitiendo la secuenciación en una sola reacción en lugar de en cuatro diferentes como en el método clásico de Sanger, con la consiguiente mejora significativa en el rendimiento de la secuenciación (figura 12). Las actuales plataformas de secuenciación basadas en la metodología de secuenciación por terminador fluorescente, gracias al uso de la electroforesis capilar de forma masiva en paralelo, y a su total automatización, logran realizar el análisis de 384 muestras de ADN en una única ejecución del sistema. Las plataformas actuales de secuenciado por terminación de cadena, son por tanto más rápidas, sencillas de implementar y tienen un índice de error mucho menor en comparación con las versiones iniciales de esta técnica.⁸⁸

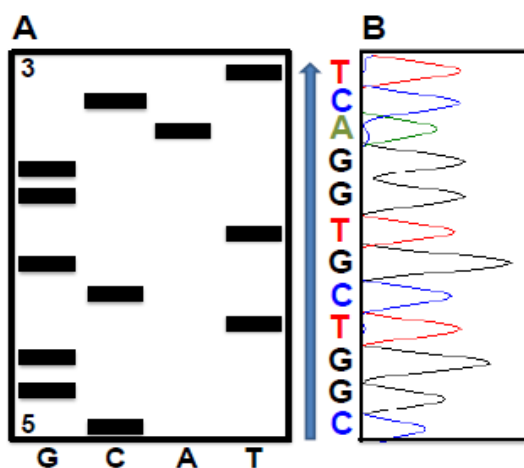


Figura 12. A: Método Sanger clásico y B: secuenciación por terminador fluorescente.

Con el método de Sanger, incluyendo las versiones que utilizan la secuenciación por terminador fluorescente, se pueden alcanzar lecturas de hasta 800-1000 pares de bases (pb) con una precisión cercana al 100%. Esta precisión es mayor que la que se consigue con las tecnologías de NGS, pero tiene un coste mucho más alto por kb de lectura, siendo esta tecnología particularmente ineficiente para proyectos que impliquen la secuenciación de fragmentos de ADN de gran tamaño, o incluso del genoma completo.⁸⁸⁻⁹⁰

Actualmente, la aplicación principal de esta tecnología es la secuenciación directa o re-secuenciación de productos amplificados por PCR⁸⁸, lo que nos permite el análisis de genes y exones con mucha precisión para la determinación de las mutaciones causantes de las enfermedades a estudio. De hecho, la técnica de Sanger es considerada todavía el método de elección para los proyectos de secuenciación que requieren de gran precisión y por lo tanto es también el método de elección para la conclusión de diagnósticos moleculares.⁹¹

4.1.2.2. Next Generation Sequencing

Next Generation Sequencing permite la detección de un amplio número de variaciones del ADN humano (pequeñas sustituciones, deleciones o inserciones, así como grandes deleciones genómicas de exones, inversiones o translocaciones). Esto representa otra ventaja con respecto a la secuenciación Sanger, que sólo permite la detección de sustituciones y pequeñas inserciones y deleciones. No obstante, existe la limitación de la secuenciación en regiones con gran contenido de guanina/citosina (GC).

Adicionalmente, *Next Generation Sequencing* permite la búsqueda de mutaciones nuevas o causantes de enfermedades en el genoma o exoma completo. Además, frente a la secuenciación familiar, no es necesario conocer, previamente, el gen o ubicación de la mutación a investigar.

Next Generation Sequencing permite la detección de mosaicismo genético por tener un nivel de sensibilidad superior (incluso, con la posibilidad de aumentarla incrementando la profundidad del estudio) que, por ejemplo, la secuenciación capilar (la cual no es capaz de detectar la presencia de este suceso).

Brevemente describiremos las dos técnicas de NGS más ampliamente empleadas hoy en día y que se han utilizado en nuestro estudio.

4.1.2.2.1. Método de terminación reversible (Illumina)

El sistema de secuenciación de Illumina se basa en una tecnología capaz de identificar decenas de miles de millones de bases por semana en una sola ejecución, produciendo datos de secuenciado de alta calidad con un rendimiento muy superior al secuenciado Sanger.⁹² Esto ha facilitado la secuenciación de genomas complejos y la caracterización de todo tipo de variantes genéticas.

En la actualidad es una de las plataformas NGS más ampliamente utilizadas y recientemente ha sido aplicada como tecnología de base para realizar diagnósticos moleculares de RP.⁹³ Esta plataforma de secuenciación utiliza un mecanismo complejo y sofisticado que combina el uso de la amplificación clonal masiva en paralelo con la secuenciación por fluoróforo terminador reversible o *reversible dye-terminator sequencing*.

Mediante el uso de ondas acústicas, la muestra de ADN es cortada al azar en fragmentos de entre 75 a 300 pares de bases (pb) de longitud, a los cuales posteriormente se les unen a ambos extremos secuencias complementarias conocidas como adaptadores, aumentando el tamaño de los fragmentos hasta varios cientos de pares de bases.⁸⁸ Los fragmentos de ADN, ahora unidos a los adaptadores, son separados por tamaño mediante electroforesis y gracias a esta separación es posible la escisión de una banda de entre 200-300 pb. Ambas hebras que conforman los fragmentos de ADN, seleccionados por tamaño en el paso anterior, se desnaturalizan y se adhieren al azar a los cebadores o *primers* (secuencias complementarias a los adaptadores) más cercanos a su posición que se hallan conectados covalentemente a una superficie sólida conocida como celda de flujo o *flow cell*, compuesta por un denso matriz de *primers* con una ubicación física determinada.⁹⁴ Mediante ciclos repetidos del sistema de amplificado por PCR de puente o *PCR bridge amplification* (Figura 13), se generan directamente en la superficie, una gran densidad de *clusters* locales (> 10 millones de *clusters*) de ADN por cada carril del *flow cell*, que contienen cada uno aproximadamente 1000 copias idénticas de cada hebra de ADN unidas a los *primers* en las etapas anteriores del proceso.^{89,94}

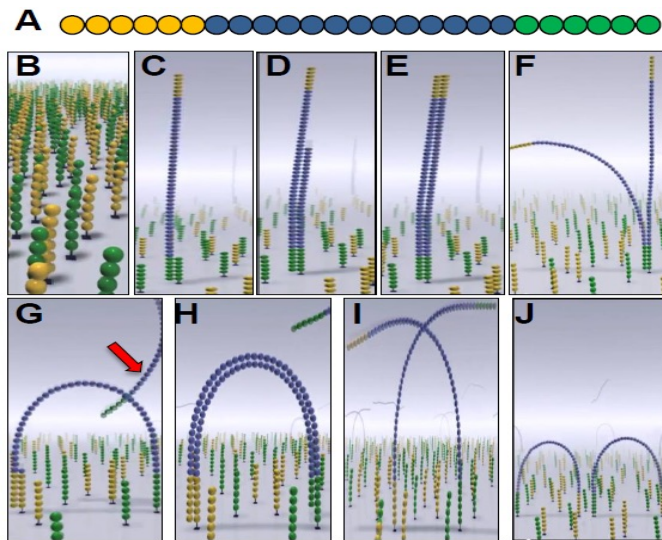


Figura 13. Representación esquemática del proceso de amplificación “bridge PCR” utilizado en la plataforma de secuenciación de Illumina. (A) construcción del ADN con los adaptadores unidos a los fragmentos en amarillo y verde, y la secuencia de interés en azul. (B) El “Flow cell” con las secuencias complementarias a los adaptadores (*primers*) adheridas, que cubren toda esta superficie. (C) Las construcciones de ADN se unen al azar a los *primers* del “Flow cell”. (D, E) El ADN se elonga a lo largo de la hebra molde. (F) El sintetizado *de novo* se disocia de la hebra molde. (G) La secuencia sintetizada *de novo* se une a un *primer* adyacente, generando un puente, y la cadena molde se retira (flecha). (H) La amplificación de puente o “*bridge amplification*” se lleva a cabo. (I) Las dos hebras se disocian. (J) Los extremos inicialmente no unidos a *primer* se unen a nuevos *primers* y se inicia un nuevo ciclo de la amplificación de puente. (Modificado de Illumina.com).

A continuación, se lleva a cabo la etapa de secuenciación utilizando el método conocido como secuenciación por fluoróforo terminador reversible o *reversible dye-terminator sequencing*. Este método permite la detección de las bases individualmente a medida que se van incorporando en la cadena de ADN. El proceso se realiza gracias a una polimerasa de ADN y a una mezcla compuesta por cuatro tipos de nucleótidos fluorescentes modificados los cuales, al igual que en el método de Sanger, gracias a un grupo de bloqueo en su estructura química logran detener la reacción de elongación cuando son incorporadas a las secuencias de estudio. Una vez incorporadas y parada la elongación, se produce una excitación por laser y la fluorescencia emitida (cada base unida al fluoróforo terminador reversible emite una señal de fluorescencia diferente) por cada *cluster* de moléculas es capturada por una cámara CCD, lo que permite la identificación de las bases incorporadas en cada ciclo, obviando el paso de la electroforesis posterior al secuenciado que emplea el método de Sanger.⁹² Posteriormente se eliminan los nucleótidos no incorporados por lavado y se elimina el grupo de bloqueo de todos los nucleótidos incorporados dejando libre el lugar de unión a otro nucleótido para permitir así el inicio

del siguiente ciclo con idéntico proceso. Un ordenador registra el orden y naturaleza de cada nucleótido incorporado en cada *cluster* para posteriormente mostrar las secuencias completas de cada fragmento secuenciado.

La plataforma de secuenciación de Illumina es actualmente la tecnología más rentable de entre todas las plataformas de secuenciación conocidas, siendo capaz de generar en cada ejecución 10 veces más datos de secuenciación a igualdad de coste que otras tecnologías NGS.^{90,95} Su principal limitación es su incapacidad de leer fragmentos relativamente largos pudiendo leer fragmentos de ADN de alrededor de 100-150 pares de bases, en comparación con el método de Sanger, cuyo límite se sitúa en los 800-1000 pares de bases. Esto es probablemente debido a la caída de la señal producida por las incorporaciones incompletas de algunos nucleótidos; debido a una defectuosa eliminación del grupo de bloqueo o debido a la escisión incompleta de los marcadores fluorescentes. Es posible incrementar la capacidad de lectura de fragmentos mayores, a expensas de un incremento significativo en las tasas de error. A pesar de estas limitaciones, la secuenciación por el método del fluoróforo terminador reversible se puede emplear de modo masivo lo que la hace muy apropiada para secuenciaciones de gran tamaño, como exomas o genomas completos.

4.1.2.2.2. Método de secuenciado mediante semi-conducción (ION Torrent Personal Genome Machine-PGM)

La secuenciación mediante semiconductores Ion Torrent, también conocida como secuenciación mediada por pH, es un sistema de secuenciación rápido (4,5 h por ejecución para 1 Gb de salida), simple, escalable y económico. Ion Torrent, en lugar de basarse en tecnología óptica, mide las variaciones en el pH inducidas por la liberación de un ion hidrógeno cargado positivamente acoplado a la incorporación de nucleótidos, un proceso acuñado como "secuenciación por síntesis".⁹⁶

El dispositivo Ion Torrent utiliza una matriz de alta densidad de pocillos a nanoescala para secuenciar de forma masiva y en paralelo. El ADN molde empleado para la re-secuenciación primero ha de ser fragmentado. Los fragmentos obtenidos se unen a los adaptadores, se amplifican por PCR en emulsión y se unen a un nano-pocillo en el chip.⁹⁶ El microchip es introducido en el secuenciador, donde será sometido a ciclos de fluido que contienen cada una de las cuatro bases nucleotídicas no modificadas (dNTP). Se presentará un único tipo de base por cada ciclo de flujo. Cuando se incorpora un dNTP

complementario al siguiente nucleótido del fragmento, se libera un pirofosfato que genera un ion hidrógeno cargado positivamente.

La carga del ion cambia el pH de la solución, que es detectada por el sensor de iones que conduce a un cambio en el voltaje que finalmente se traduce en la lectura del ADN que se está secuenciando sin tener que utilizar sistemas de emisión o detección de luz. Las moléculas dNTP no unidas, no generarán un cambio en el voltaje, se eliminan por lavado y se iniciará un nuevo ciclo con un tipo diferente de base. Cuando se excita el sensor de iones, el chip transmite impulsos eléctricos y el *software* muestra los datos producidos como un ionograma y la secuencia puede leerse sin conversión de señales intermedias (figura 14).

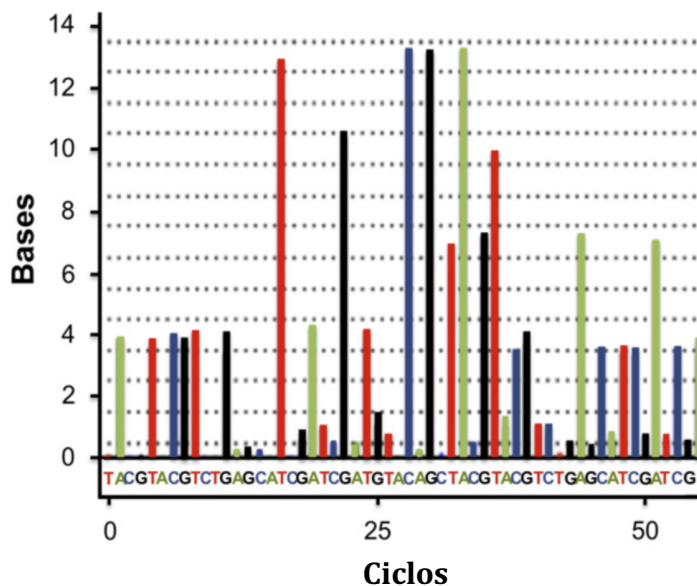


Figura 14. Ion Torrent. Un ionograma correspondiente a los primeros 55 ciclos en un micropocillo. El eje Y indica la cantidad de pares de bases incorporados por pozo. El eje X indica el número de ciclos, con los pares de bases de ADN correspondientes. Se asignan colores a las bases para seguir la nomenclatura de secuenciación de Sanger, ya que la tecnología de Ion Torrent se basa en la variación de pH, sin fluorescencia involucrada.

5. Diagnóstico de la RP

En el Simposium Internacional de RP de 1982 se establecieron los siguientes criterios diagnósticos: afectación bilateral, pérdida de visión periférica, disfunción de los bastones y pérdida progresiva de la función de ambos fotorreceptores (conos y bastones).⁹⁷ Aunque el primer criterio exige la bilateralidad del proceso algunos autores han encontrado un cuadro compatible con RP unilateral. Este diagnóstico exige cambios funcionales y del fondo de ojo típicos, con exclusión de procesos infecciosos en un ojo y electroretinograma (ERG) normal durante un tiempo de evolución de al menos cinco años en el otro ojo.⁹⁷

También se estableció en este Simposium que las alteraciones del fondo de ojo no son necesarias para realizar el diagnóstico, ya que reflejan un estadio avanzado de la enfermedad y pueden no observarse en fases incipientes.

Además de la RP típica, podemos encontrar formas atípicas, que se presentan a continuación, y las formas sindrómicas (ver tablas 3 y 4).

5.1. Formas atípicas de retinosis pigmentaria

Se trata de variedades de RP que manifiestan algunas diferencias en relación con la superficie de afectación o el aspecto del fondo de ojo (figura 15).

Retinosis Pigmentaria sin pigmento: Presenta las mismas alteraciones funcionales, fundoscópicas y electrofisiológicas que la RP típica con la única diferencia de que no se observa pigmento en la retina. Se cree que se trata de un estadio inicial de la forma típica.

Retinitis Punctata Albicans: A las manifestaciones clínicas de la RP típica se añade la presencia de pequeños puntos blanco-amarillentos en el epitelio pigmentario, dispersos entre el polo posterior y el ecuador. Mutación responsable en el gen RLBP.

Retinosis Pigmentaria Inversa Central: Los cambios pigmentarios de la retina se localizan en la mácula, estando la visión central más afectada. Parece tratarse de una degeneración de conos y bastones. Mutaciones responsables en los genes RDS y CRX.

Retinosis Pigmentaria Pericentral: Las lesiones se producen alrededor de los vasos temporales respetando la mácula y la retina periférica.

Retinosis Pigmentaria Sectorial: Las lesiones típicas de la RP se localizan en un sector retiniano, generalmente el nasal inferior. Los pacientes pueden estar asintomáticos y el ERG suele estar afectado pero no abolido. Mutaciones en el gen RHO y PRPF31.

Retinosis Pigmentaria con preservación Paraarteriolar: Presenta los mismos hallazgos oftalmoscópicos que la RP típica con la excepción de que en las primeras etapas el pigmento deja libre un espacio alrededor de los vasos. Con el tiempo estas zonas también se afectan. Mutaciones responsables en el gen *CRB1*.

Coroideremia: Las alteraciones funcionales y electrofisiológicas son similares a las de la RP típica, pero el aspecto fundoscópico muestra algunas diferencias debido a la atrofia coroidea que presenta. Se da en los varones debido a su carácter hereditario recesivo ligado al cromosoma X, con una prevalencia de uno por cada 100.000 individuos. Las mujeres portadoras manifiestan ligeros cambios en el fondo de ojo. Las mutaciones responsables se hallan en el gen *CHM*.

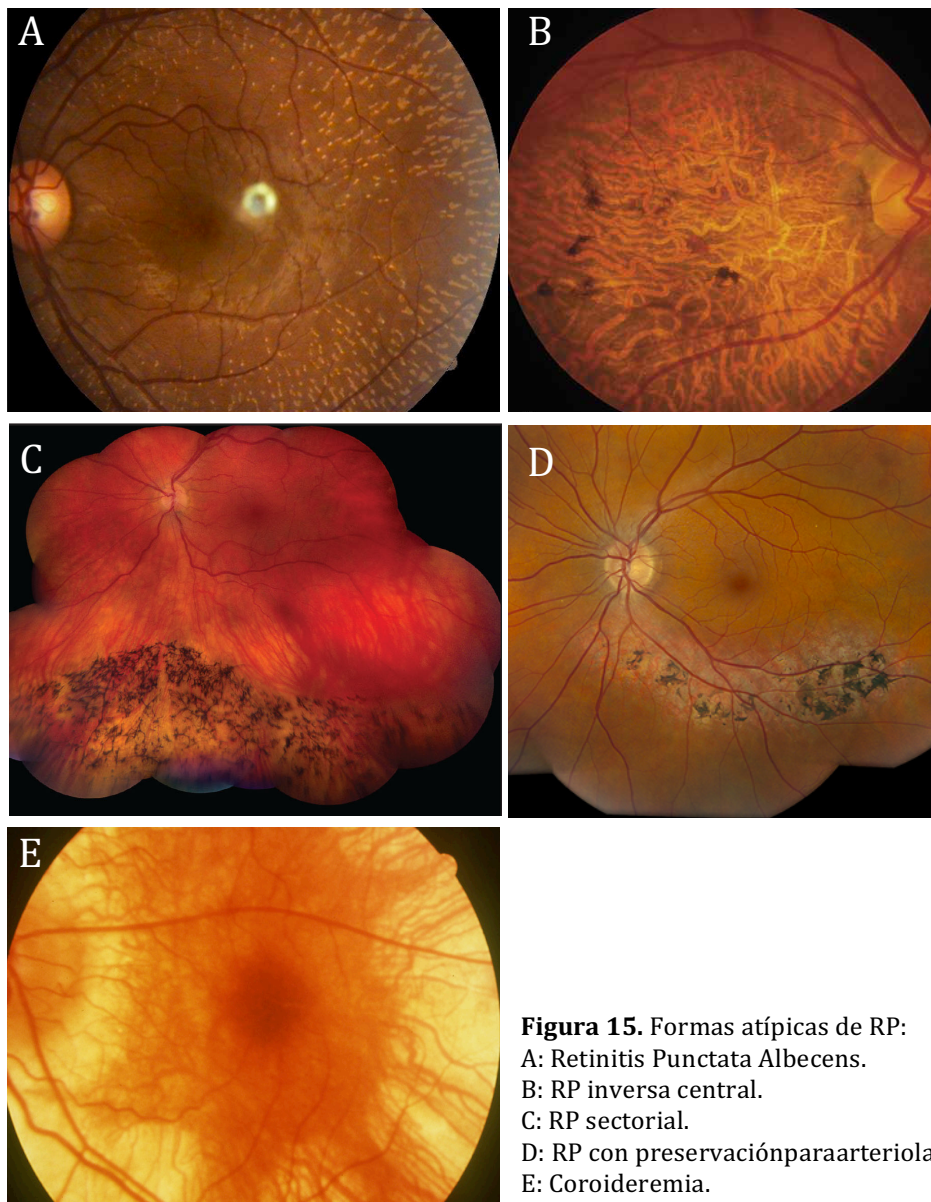


Figura 15. Formas atípicas de RP:
 A: Retinitis Punctata Albicans.
 B: RP inversa central.
 C: RP sectorial.
 D: RP con preservación paraarteriolar.
 E: Coroideremia.

5.2. Bases del diagnóstico

El oftalmólogo que trata de identificar a un paciente afecto de RP basa el diagnóstico en la historia clínica, en la exploración oftalmológica y en el estudio electrofisiológico.

5.2.1. Anamnesis

El estudio se centrará en los siguientes aspectos: sintomatología y edad de comienzo, árbol genealógico y antecedentes personales.

5.2.2. Exploración oftalmológica

Son varios los parámetros que se estudian a través de la exploración:

Agudeza visual y estado refractivo. La agudeza visual varía entre visión de unidad y no percepción de luz o amaurosis. En las formas ligadas al cromosoma X se suele afectar en la primera década, en las recesivas algo más tarde y en las dominantes no se deteriora hasta la edad adulta. Las causas más frecuentes de la disfunción visual son: la afectación de los conos, las maculopatías o las cataratas.

Segmento anterior. El hallazgo más frecuente es la opacidad subcapsular posterior del cristalino con una incidencia del 40 al 70% según el patrón hereditario.³²

Presión intraocular. Algunos autores encuentran una mayor incidencia de glaucoma en estos pacientes.^{37,98,99}

Oftalmoscopia. Aunque es característica de la RP, la triada de signos pigmentación en espículas óseas, atenuación arteriolar y palidez papilar no es suficiente para diagnosticar la enfermedad. Con frecuencia se observan lesiones en la retina central.

Tomografía de Coherencia Óptica (OCT). La OCT nos permite de una manera rápida e inocua evaluar las diferentes capas de la retina, además de haber demostrado ser una prueba reproducible para el diagnóstico en esta enfermedad.¹⁰⁰ Mediante la OCT de análisis macular, se puede observar la presencia de una disminución en el espesor retiniano, quistes maculares y edema de mácula, además de tracciones vítreas o membranas epirretinianas que pueden aparecer en estos pacientes. Diversos estudios han correlacionado las alteraciones encontradas en la OCT (integridad de la capa de elipsoides, antiguamente denominada línea IS/OS, espesor foveal central, etc.) de los pacientes con la agudeza visual.¹⁰¹ La OCT es, por lo tanto, una prueba que nos ayuda en el diagnóstico de

la enfermedad, monitorización y valoración de la respuesta a los tratamientos que se están probando en ensayos clínicos tanto en modelos animales como en pacientes.

Autofluorescencia (AF). Se ha visto que más de la mitad de los pacientes con RP presentan una imagen en “anillo” parafoveal, que representa la separación entre la retina funcional y disfuncional.¹⁰¹ Aunque el ERG sigue siendo el *gold estándar* para el diagnóstico, la autofluorescencia y la OCT son pruebas más accesibles en la consulta y permiten diferenciar la RP de otras condiciones que pueden ser similares en cuanto a los síntomas al inicio, como la ceguera nocturna estacionaria congénita (enfermedad de Oguchi).¹⁰²

Campimetría (CV). Inicialmente se desarrolla un escotoma anular entre 20 y 30 grados del campo visual, que se extiende lentamente hacia la periferia y hacia el centro del mismo. En fases avanzadas queda un “islote” de visión central que puede mantenerse intacto durante mucho tiempo o verse alterado por la existencia de catarata o maculopatía. La realización de CV periódicos es necesaria para comprobar la progresión y para aspectos medicolegales relativos a la incapacidad visual de estos pacientes.³¹

Test de colores. La percepción de los colores se altera en fases avanzadas y se relaciona con una agudeza visual igual o inferior a 5/10 en escala de Snellen. El defecto más común es la reducción del sistema dicromático (azul-amarillo).³¹

5.2.3. Estudio electrofisiológico

Las pruebas electrofisiológicas se empiezan a alterar en etapas preclínicas de la RP. El electrórretinograma (ERG) es una prueba necesaria y fundamental para el diagnóstico (es el *gold estándar* y la primera prueba en afectarse, incluso en ausencia de clínica). Como en la RP existe afectación de fotorreceptores, las respuestas eléctricas se alteran en fases muy precoces. El ERG-flash es la prueba neurofisiológica de mayor valor diagnóstico ante la sospecha de RP. Característicamente se observa una reducción de la amplitud de la respuesta y una latencia aumentada, inicialmente en condiciones escotópicas, que va empeorando conforme avanza el proceso (figura 16).¹⁰³

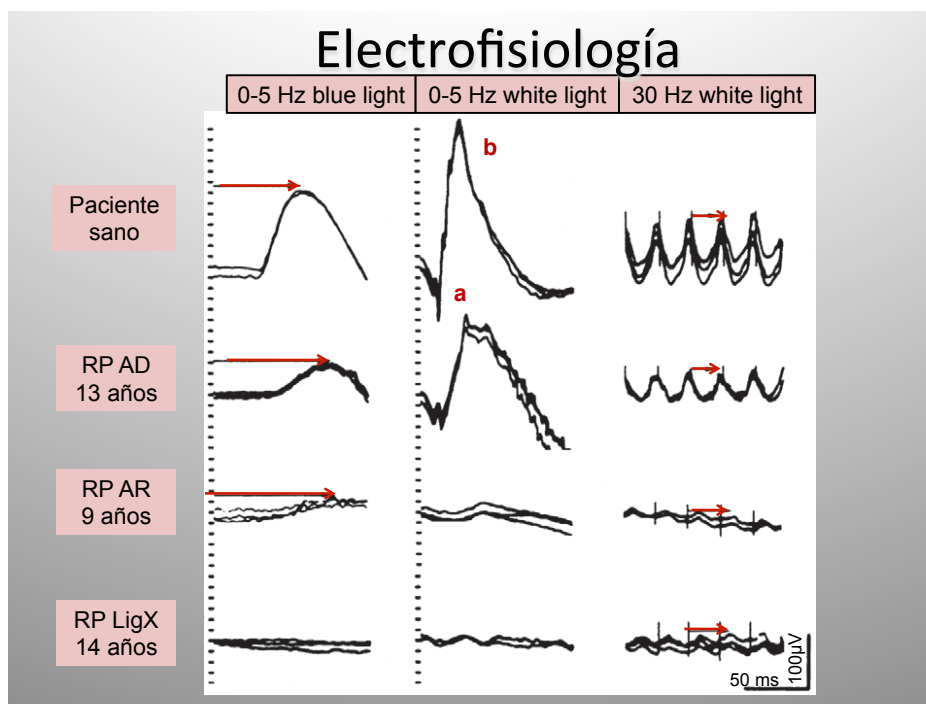


Figura 16. ERG en pacientes sano y en pacientes con RPAD, RPAR y RPLX. Tanto la amplitud como la latencia se ven alterados y son más acusados en RPLX.

6. Tratamiento de la RP

A día de hoy no existe un tratamiento aprobado para frenar la evolución y mejorar la visión de los pacientes con RP en estadios precoces de la enfermedad. Por lo tanto, el manejo actual de los pacientes se centra en el tratamiento de las complicaciones asociadas y ofrecer apoyo psicológico y ayudas de baja visión. Se recomienda seguir revisiones periódicas con el oftalmólogo para detectar y tratar cualquier complicación asociada como catarata, glaucoma y edema macular. Se recomienda el uso de gafas con filtros de absorción selectiva, los cuales mejoran el contraste, incrementan el confort, aumentan la resolución visual, eliminan el deslumbramiento y proporcionan una máxima protección contra los rayos ultravioletas y la luz azul.¹⁰⁴

El consejo genético es importante y los familiares de primer grado deberían ser examinados para descartar RP. Si se detecta la mutación responsable se puede ofrecer a los pacientes en edad reproductiva la posibilidad del diagnóstico genético preimplantacional (DGP). El oftalmólogo debe informar de la existencia de grupos de apoyo y asociaciones como Begisare (Asociación de afectados por la RP de Gipuzkoa, Alava y Vizcaya) e IBT-CRI (Centro de recursos para la inclusión del alumnado con discapacidad visual). En cuanto a los padres de niños con RP, si se conoce el tipo de herencia mediante el árbol genealógico o la mutación, podremos orientar el pronóstico de sus hijos en cuanto

a agudeza visual y rapidez de progresión de la disminución del campo visual. A pesar de que en algunos casos se desconozca el tipo de herencia o en los casos esporádicos se ha visto que la mayoría de niños tendrá visión útil para completar sus estudios, pudiendo orientar así a los padres sobre la educación de sus hijos. Durante el seguimiento de estos pacientes el oftalmólogo será muchas veces el encargado de la realización de informes para el registro en la ONCE e informes necesarios para diferentes grados de incapacidad en los casos que cumplan los criterios.

6.1. Tratamiento específico

Una vez hecho el diagnóstico de RP, deberíamos siempre descartar 3 formas de RP sindrómicas que se pueden beneficiar de tratamiento dietético específico:

Abetalipoproteinemia (Enfermedad de Bassen-Kornzweig): debido a la baja concentración en plasma de la apolipoproteína B los pacientes padecen de malabsorción de vitaminas liposolubles. Además de RP, los pacientes desarrollan, ataxia, esteatorrea y neuropatía periférica. El tratamiento con altas dosis de vitamina A y vitamina E puede restablecer la función retiniana en fases tempranas de la enfermedad.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

Enfermedad de Refsum (Déficit de ácido fitánico oxidasa): se asocia con defectos de conducción cardíaca, ataxia, polineuropatía, sordera, ictiosis, anosmia y retinosis pigmentaria. La reducción del ácido fitánico en la dieta puede enlentecer o frenar la progresión de la enfermedad.¹⁰⁸

Déficit familiar de vitamina E (déficit de proteína transportadora de α -tocoferol): puede causar ataxia en la edad adulta, disartria, disminución del tacto y propiocepción y retinosis pigmentaria. El tratamiento con vitamina E se ha visto que frena la progresión de la enfermedad.¹⁰⁹

6.2. Tratamientos en fase de desarrollo

Existen 4 líneas de tratamiento en fase de desarrollo.

6.2.1. Neuroprotección. Tratamiento farmacológico

El objetivo de la neuroprotección es ofrecer un ambiente protector para prolongar la viabilidad de los fotorreceptores ejerciendo su efecto en las vías bioquímicas secundarias. Se puede llevar a cabo por medio de factores de crecimiento neurotróficos, inhibiendo vías proapoptóticas, o por medio de factores de viabilidad como, por ejemplo, el factor de

viabilidad de conos derivado de los bastones (RdCVF).¹¹⁰ A continuación, mostramos algunos de los tratamientos farmacológicos a estudio:

Factor neurotrófico ciliar (CNTF) (Figura 17): en un ensayo clínico llevado a cabo para evaluar la seguridad y el efecto sobre la función visual del factor neurotrófico ciliar entregado a través de un implante intraocular de células encapsuladas para el tratamiento de la RP, no mostró beneficio terapéutico en ninguna de las variables de resultado primaria (Agudeza visual al año y cambio en la sensibilidad del CV al año).¹¹¹

Vitamina A: el grupo de Berson et al. en un estudio en el que trataron pacientes con altas dosis diaria de vitamina A (15.000U/d) concluyeron que se enlentecía la progresión de la RP alrededor de un 2% anual. Los efectos son modestos y hay que sopesar los riesgos de este tratamiento a largo plazo. Está contraindicado en mujeres en edad fértil por su efecto teratogénico, se debe medir regularmente la función hepática y la densidad ósea y no debe asociarse a suplementos de vitamina E al competir esta en su absorción.¹¹² En modelos animales con mutaciones en el gen ABCA4 la suplementación con vitamina A produce un incremento de lipofuscina en las células del EPR por una mala metabolización de los residuos de los fotorreceptores que, debido a estas mutaciones, producen metabolitos que el EPR no es capaz de eliminar. En este sentido, Radu et al.,¹¹³ demostraron un incremento de A2E y A2PE-H2 en ratones con mutación en ABCA4 tras dos meses de suplementación con vitamina A. En esta misma línea, un estudio reciente en un modelo de enfermedad de Stargardt (enfermedad debida a mutaciones en el citado gen ABCA4) en animales, mostró mejoría clínica y reducción del acúmulo de lipofuscina mediante el empleo de C20-D3-vitamin A que es un inhibidor de la dimerización de la vitamina A,¹¹⁴ pues, como ya se ha dicho, se sabe que esta enfermedad empeora con la suplementación de vitamina A.

Por todo ello, aconsejan que los pacientes con distrofias retinianas deberían ser estudiados genéticamente para descartar mutaciones en el gen ABCA4 antes de empezar tratamiento con suplementos de Vitamina A.¹¹⁵

Acetazolamida: en un porcentaje pequeño de pacientes con RP, el edema macular asociado puede responder a inhibidores de la anhidrasa carbónica, como la acetazolamida o sus análogos tópicos, con leve mejoría en la función visual.¹¹⁶⁻¹¹⁸

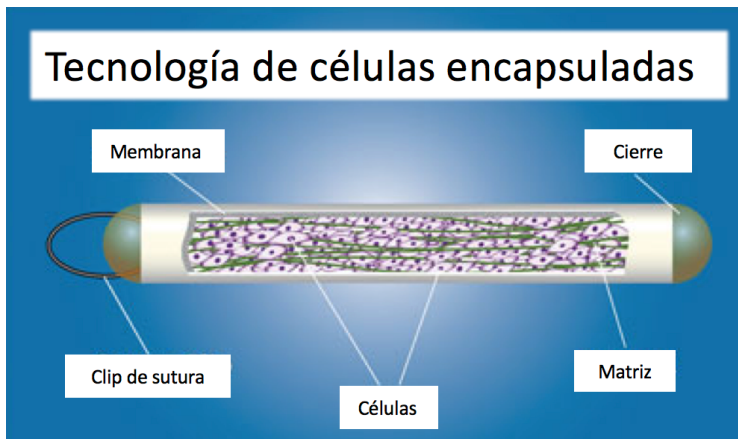


Figura 17. Factor neurotrófico ciliar (CNTF).

6.2.2. Terapia génica

El principio de la terapia génica es la transferencia de un gen sano mediante un vector de origen no-viral o viral que sea capaz de modificar las células oculares, en el caso de la RP, los fotorreceptores y/o las células del EPR, para un correcto funcionamiento celular y evitar su degeneración.

Las estrategias de terapia génica difieren dependiendo de si el gen exacto y tipo de mutación son conocidos, de ahí la importancia de un correcto genotipado de nuestros pacientes.

Los métodos para corregir los genes alterados se pueden clasificar en dos grupos:

a) Terapia de ganancia del gen (*gene augmentation*): inserción de un gen normal en el genoma para reemplazar genes mutados utilizando un vector como vehículo. Está indicada para las formas recesivas y las formas ligadas al cromosoma X, donde las mutaciones suelen conducir a una pérdida de función de la proteína codificada por ese gen. Este tratamiento se ha estudiado más extensamente en la amaurosis congénita de Leber (ACL) con la mutación RPE65, que interrumpe el correcto funcionamiento del ciclo visual.

b) Terapia silenciadora del gen: inhibición de la expresión del gen mutado usando ribozima o RNA de transferencia (siRNA). Este tipo de tratamiento está indicado en las formas dominantes de la enfermedad, causadas por aumento de la función tóxica debido a la mutación que resulta en una proteína mutada. La seguridad de estas técnicas debe ser demostrada en modelos animales y ensayos clínicos.^{119,120}

En los últimos años se han iniciado múltiples ensayos clínicos utilizando terapia génica en distintas distrofias retinianas, entre ellas, ACL, coroideremia, RP, retinosquiasis ligada al cromosoma X, acromatopsia congénita, enfermedad de Stargardt y Síndrome de Usher.¹¹⁵ A continuación, resumimos diferentes ensayos clínicos en marcha en RP.

Basados en la eficacia y la seguridad de la terapia génica en modelos animales de ACL (roedores¹²¹, caninos¹²²), en el 2007, en el *Children's Hospital* de Filadelfia se realizaron las primeras inyecciones subretinianas en humanos del virus AAV2.hRPE65v2 a 15 adultos jóvenes (19-26 años de edad) (figura 18). Jacobson et al. publicaron los resultados de este ensayo clínico, con resultados de seguridad y eficacia a 3 años. No detectaron efectos adversos oculares asociados a la técnica quirúrgica. La función visual mejoró en todos los pacientes en diferente grado; la mejoría se localizó en las áreas tratadas. Se vió que la técnica era más efectiva en la retina extrafoveal, puesto que no se observó beneficio y sí algún riesgo al tratar la fóvea. Concluyen que la terapia génica tiene el potencial de convertirse en el futuro próximo en un tratamiento de rutina en la práctica clínica. (Identificador Clinical Trials.gov: NCT00481546).¹²³ Se realizaron inyecciones en el ojo contralateral en un total de tres pacientes de la cohorte anterior, sin problemas de seguridad. En este estudio fue la primera vez en el que se realizó terapia génica en ambos ojos. Todos los pacientes inyectados mejoraron su sensibilidad retiniana, AV y CV.¹²⁴

Recientemente, ha concluido un ensayo clínico fase III (Identificador ClinicalTrials.gov identifier: NCT00999609). En este ensayo clínico, los pacientes con una mutación confirmada en RPE65 fueron aleatorizados y los del grupo de intervención sometidos a una vitrectomía, y un vector viral adeno-asociado que contenía RPE65 (voretigene neparvovec) fue suministrado subretinariamente en ambos ojos. Este virus sirvió como vehículo de liberación que permitía la producción de la proteína RPE65 en el RPE. Los 20 pacientes intervenidos mostraron una mejoría funcional en la visión con un nivel de luz específico en el test de movilidad bilateral al año. Más de un tercio de los pacientes en el grupo de tratamiento demostró una mejora de 15 letras en el primer ojo tratado al año de la intervención en comparación con ninguno en el grupo control. Trece de los 20 pacientes intervenidos fueron capaces de completar la prueba de movilidad al año a 1 lux, similar a una condición de poca luz en comparación con ninguno de los pacientes control. Los pacientes del grupo intervención también mostraron una mejora estadísticamente significativa en la prueba de umbral de sensibilidad a la luz de campo completo para la luz blanca en comparación con los pacientes del grupo control.¹²⁵ Dado el éxito de este ensayo controlado aleatorizado de Fase III, Spark *Therapeutics* (Filadelfia, PA) ha presentado una

solicitud para la aprobación de LUXTURNA™ (voretigene neparvovec) a la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) y, si se aprueba, será la primera terapia génica disponible a nivel mundial en RP.

En pacientes con coroideremia, actualmente hay registrados seis ensayos en Fase I o Fase I/II. Todos los estudios se llevan a cabo vehiculizando el gen CHM que codifica la proteína Rab-escort 1 (REP 1), con un virus adeno-asociado (AAV2), a través de una inyección subretiniana. En el ensayo clínico multicéntrico dirigido por el Dr. Robert MacLaren (NCT01461213), seis pacientes (edad 35-63 años) con coroideremia recibieron una inyección subfoveal. Tras la administración del vector, los dos pacientes con la coroideremia más avanzada tuvieron una mejora sustancial en la AV. Los otros cuatro pacientes que tenían AV casi normal al inicio del estudio recibieron el vector sin efectos perjudiciales significativos. Los ojos tratados mejoraron su sensibilidad retiniana, con respecto al grupo control.¹²⁶

Basado en la eficacia y seguridad de la terapia génica en modelos de rata,¹²⁷ se llevó a cabo un estudio en fase I donde se evaluaba la eficacia y seguridad de la inyección subretiniana de rAAV2-VMD2-hMERTK en pacientes con RP debida a mutaciones en el gen MERTK. En este ensayo clínico, seis pacientes recibieron una inyección subretiniana de rAAV2-VMD2-hMERTK en el ojo de peor visión. Tras dos años de seguimiento, no se observaron complicaciones que pudieran ser atribuibles con certeza a la administración del vector. Tres pacientes mostraron una mejoría en la AV del ojo tratado que desapareció en dos de ellos al cabo de dos años.¹²⁸

Basados en la eficacia y la seguridad de la terapia génica en modelos animales (macacos)¹²⁹ se están llevando a cabo dos ensayos en Fase I/II registrados en ClinicalTrial.gov donde se evalúa la seguridad y tolerabilidad de inyecciones subretinianas con dosis ascendentes de UshStat en pacientes con USH tipo 1B y mutaciones en el gen MYO7A (NCT01505062) y esos mismos objetivos en otro ensayo a largo plazo (NCT02065011).

TERAPIA GÉNICA RETINIANA

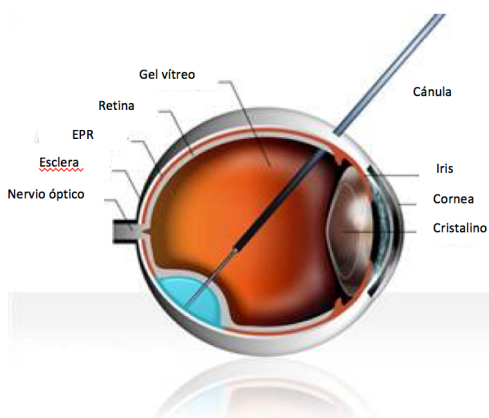
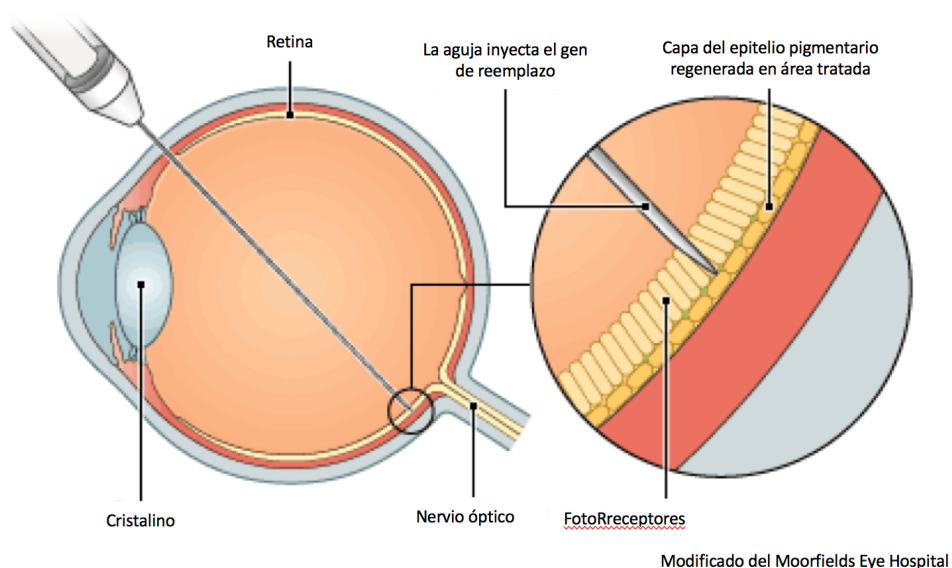


Figura 18. Terapia génica. Técnica quirúrgica de inyección del vector en el espacio subretiniano.

6.2.2.1. Optogenética

La restauración de la visión a través de la optogenética proporciona una interesante estrategia para restablecer la percepción visual en las retinas ciegas. Este enfoque terapéutico se basa en la entrega de un gen que codifica una proteína de canal sensible a la luz (opsinas microbianas, opsinas endógenas o canales iónicos sintéticos sensibles a la luz) para reactivar los conos inactivos o activar otras neuronas de la retina en las últimas etapas de la degeneración retiniana.¹³⁰

Las proteínas microbianas similares a la opsina tienen la ventaja de isomerizar de forma reversible un derivado de la vitamina A como el cromóforo.¹³¹ En respuesta a la luz, las opsinas microbianas pueden inducir de manera independiente cambios en el potencial de

membrana de una célula que permite que la señal eléctrica se propague al cerebro. El canal rhodopsina (CHR2) fue la primera opsina microbiana que se utilizó en la retina. CHR2 bombea los cationes tras la excitación por la luz y produce corrientes excitatorias. La expresión mediada por AAV de CHR2 a nivel de células bipolares ON¹³²⁻¹³⁶ y células ganglionares¹³⁷ en modelos de ratón de RP restableció con éxito potenciales evocados visuales en retinas tratadas. Aunque la transducción de células ganglionares y bipolares sigue siendo difícil en modelos animales grandes, se han publicado recientemente nuevos vectores y promotores con mejor afinidad para la retina interna.^{135,138,139} Además, se ha demostrado una buena preservación de estas células en pacientes con enfermedad avanzada de RP y ACL.¹²³ Otro enfoque consiste en reactivar fotorreceptores de conos no funcionales "adormecidos" utilizando halorhodopsinas, que producen corrientes inhibitorias.¹⁴⁰ Esta estrategia puede restaurar el procesamiento visual en todas las capas de la retina. Sin embargo, queda por determinar el paciente apropiado para este procedimiento ya que muchos pacientes de RP mantienen conos funcionales durante décadas y la remodelación de la red retiniana al perder los fotorreceptores podría hacer que este enfoque sea un desafío en los seres humanos.¹⁴¹ Además, los efectos a largo plazo de la despolarización/repolarización del potencial de membrana en los conos privados de nutrientes permanecen inexplorados.

6.2.2.2. CRISPR

Los CRISPR (en inglés: *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, en español: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) son *loci* de ADN que contienen repeticiones cortas de secuencias de bases. Tras cada repetición siguen segmentos cortos de "ADN espaciador" proveniente de exposiciones previas a un virus.¹⁴² Se encuentran en aproximadamente el 40% de los genomas bacterianos y en el 90% de los genomas secuenciados de las arqueas. Con frecuencia se hallan asociados con los genes *cas*, que codifican para proteínas nucleasas relacionadas con los CRISPR. El sistema CRISPR/Cas9 es un sistema inmune procariótico que confiere resistencia a agentes externos como plásmidos y fagos¹⁴³ y provee una forma de inmunidad adquirida. Los espaciadores de los CRISPR reconocen secuencias específicas y guían a las nucleasas *cas* para cortar y degradar esos elementos génicos exógenos de una manera análoga al RNAi en sistemas eucarióticos.¹⁴²

Desde 2013, el sistema CRISPR/Cas se ha utilizado para la edición de genes (agregando, interrumpiendo o cambiando las secuencias de genes específicos) y para la regulación

génica en varias especies.¹⁴⁴ Al administrar la proteína Cas9 y los RNA guía apropiados a una célula, el genoma de ésta puede cortarse en los lugares deseados, cuyas secuencias serán complementarias a las de los RNA guía utilizados. Esto permite la eliminación funcional de genes o la introducción de mutaciones (tras la reparación del corte realizado por la maquinaria celular de reparación del ADN) para estudiar sus efectos. Modificaciones recientes del sistema CRISPR/Cas9 permiten también actuar sobre la transcripción de los genes, modificando así sólo su nivel de funcionamiento, pero no la información genética.

Recientemente, el sistema de proteínas 9 (Cas9) asociado con CRISPR (CRISPR/Cas9) se ha desarrollado como una nueva herramienta de edición del genoma en muchos aspectos médicos incluyendo las enfermedades oculares (figura 19).¹⁴⁵

Las investigaciones más recientes han mostrado que CRISPR / Cas9 se ha aplicado en la generación de modelos animales así como en la terapia génica *in vivo* de la RP y la ACL. También se ha demostrado como un potencial avance para la clínica mediante la combinación con otras tecnologías como el virus adeno-asociado (AAV) y las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) (figura 20).¹⁴⁶

Latella et al.¹⁴⁷ informaron de una edición exitosa *in vivo* del gen mutante humano Rhodopsina, que es una causa común de RP, mediante la aplicación del sistema CRISPR / Cas9. Por lo tanto, la edición del genoma por el sistema CRISPR / Cas9 podría ser un gran método para generar deleciones genómicas y cambios en el marco de lectura (*frameshifts*) en la retina, que nos proporcionaría una nueva herramienta terapéutica para el tratamiento de las enfermedades degenerativas de la retina como RP.

El intento del sistema CRISPR / Cas9 para el tratamiento de la degeneración retiniana también se ha hecho en el 2015 con el modelo de rata S334ter-3.¹⁴⁸ Una única inyección subretiniana del plásmido gRNA / Cas9 en combinación con la electroporación consiguió la generación de una disrupción alelo-específica del alelo de rata S334ter, resultando en la prevención de la degeneración de la retina y la mejora de la función visual. En otro estudio, Suzuki et al.¹⁴⁹ idearon una estrategia de integración dirigida independiente de homología (HITI) a través de la tecnología CRISPR / Cas9, demostrando que la eficacia de esta estrategia mejoró la función visual en el modelo de RP de rata RCS, y demostró el potencial terapéutico de esta tecnología.

Recientemente en septiembre del 2017, el grupo español del Dr. Millán de Valencia y Dra. Ayuso de Madrid han publicado el primer artículo en edición génica mediante CRISPR en

el síndrome de Usher tipo II.¹⁵⁰ En este estudio, este método de edición de genes se utiliza para reparar la mutación c.2299delG en fibroblastos de un paciente de Usher portador de la mutación en homocigosis. Se demostró la reparación exitosa de mutaciones *in vitro* usando ribonucleoproteínas de RNA-Cas9 específicas de locus con posterior recombinación homóloga reparadora.

Otro uso potencial de la estrategia CRISPR/Cas9 puede ser la combinación con las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) para aplicaciones en terapia génica. Cereso et al.¹⁵¹ realizaron la terapia génica mediada por adenovirus (AAV2 / 5) a iPSCs derivadas de las células de un paciente con coroideremia. También se ha publicado la administración del uso combinado de CRISPR / Cas9 y AAV con éxito en hepatocitos de ratón.¹⁵² Con estos antecedentes, Zheng et al.¹⁵³ sugirió utilizar AAV-CRISPR para suministrar directa y localmente esta terapia en enfermedades retinianas. La edición del genoma mediante el sistema CRISPR / Cas9 también se utilizó para la corrección precisa de una mutación patógena de RP en iPSCs derivadas de pacientes.¹⁵⁴

A pesar de su potencial, es necesario seguir investigando en el uso combinado de estas nuevas tecnologías en sistemas *in vitro* o en modelos animales, para su eventual traslado a la clínica.

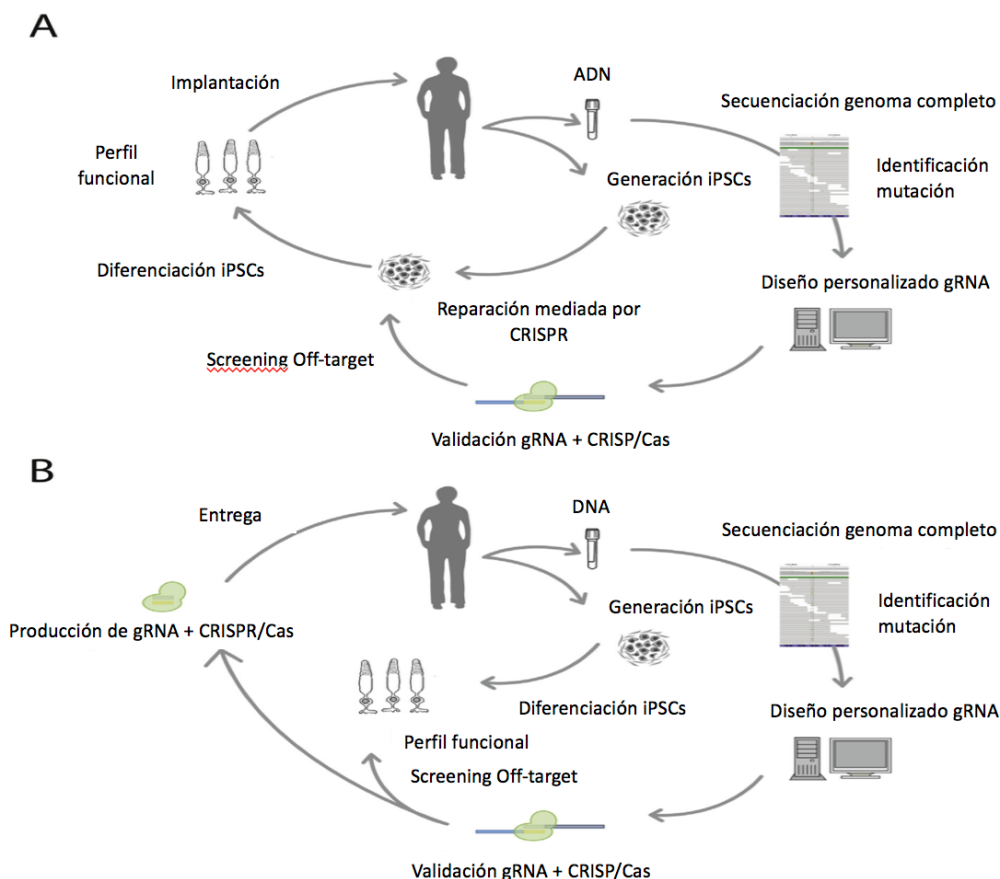


Figura 19: Incorporación de la edición mediada por CRISPR / Cas en la clínica. (A) Las células madre pluripotentes inducidas específicas del paciente (iPSCs), corregidas *in vitro*, podrían ser diferenciadas y reimplantadas, alternativamente, (B) CRISPR / Cas podría ser diseñado y entregado *in vivo* para la corrección directa de células somáticas. Independientemente de la técnica utilizada, un diseño de gRNA (RNA guía) individualizado basado en la secuencia del genoma del paciente será importante. Modificado de Hung et al.¹⁴⁵

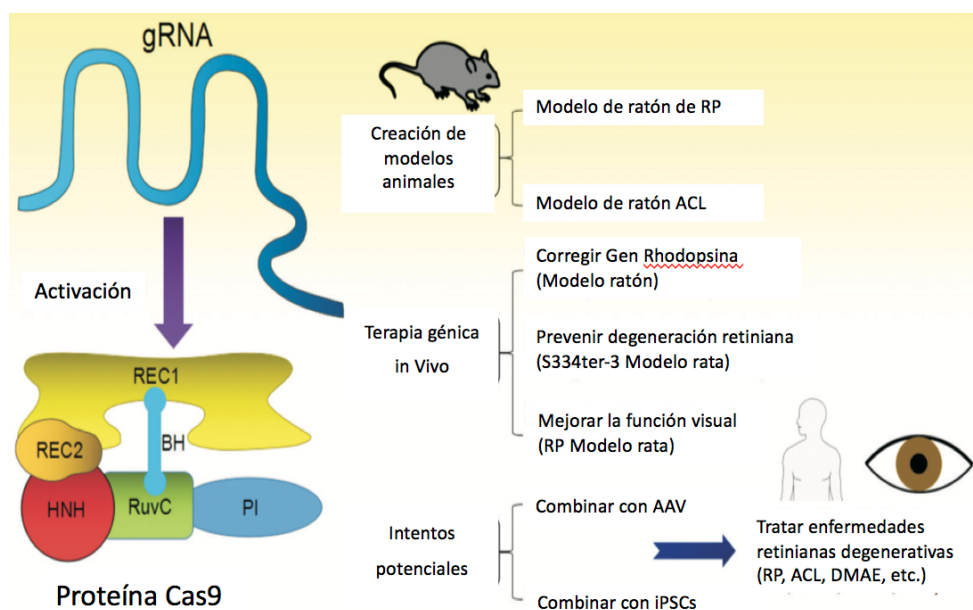


Figura 20. Estructura y aplicaciones de CRISPR/Cas9 en enfermedades degenerativas de la retina. BH: Helice puente; PI: interacción PAM. Modificado de Peng et al.¹⁴⁶

6.2.3. Prótesis retiniana

En las fases avanzadas de la enfermedad, cuando ya ha habido pérdida de fotorreceptores y para pacientes en los que no se conoce la mutación y no se podrían beneficiar de la terapia génica, las prótesis retinianas (retina artificial u ojo biónico) pueden ser una opción para recuperar la visión parcialmente. En el caso de la RP, los fotorreceptores están dañados pero las neuronas secundarias pueden mantenerse relativamente bien preservadas. En esta situación la prótesis electrónica puede reemplazar la función de los fotorreceptores, la cual estimularía esas neuronas secundarias e induciría una imagen visual (figura 21). Sin embargo, antes de plantear el uso del implante de visión artificial hay que comprobar que queda retina interna residual y capa de fibras nerviosas mediante el análisis estructural con OCT. Además, hay que medir el umbral capaz de producir fosfenos, con el fin de predecir si el implante de una prótesis retiniana puede tener éxito.¹¹⁵ Otro de los criterios para poder ofrecer este tratamiento es tener agudeza visual de percepción de luz o menor en el mejor de los ojos.

Se están estudiando diferentes implantes, incluyendo implantes corticales, así como implantes retinianos, estos últimos con localización epirretiniana, subretiniana o supracoroidea.¹⁵⁵

Existen tres prótesis retinianas aprobadas para su uso en pacientes, la prótesis epirretiniana Argus II ® (Second Sight Medical Products, CA, EEUU),¹⁵⁶⁻¹⁵⁸ el implante subretiniano Alpha-IMS® (Retina Implant AG, Alemania)¹⁵⁹ y el implante epirretiniano Iris ® (Pixium, Francia)(figura 22).¹⁶⁰ En la tabla 6 se muestran las diferencias entre los 3 tipos de implantes comercializados.

Respecto a los resultados de agudeza visual alcanzados con los implantes retinianos, todos los pacientes con un microchip artificial de silicona implantado quirúrgicamente en el espacio subretiniano o epirretiniano mostraron algún grado de mejoría postoperatoria en la percepción de su visión¹⁶¹⁻¹⁶³ y la mayoría de los pacientes con un implante epirretiniano (83%) en su función visual ($P < 0,01$) (la función visual fue evaluada mediante una serie de pruebas visuales realizadas con estímulos por ordenador o con estimulación basada en la información visual recibida a través de una videocámara).¹⁶⁴



Figura 21. Esquema de funcionamiento de las prótesis retinianas. Imágenes cedidas por Pixium.

Tecnología	<ul style="list-style-type: none"> IRIS II - <u>Epirretiniano</u> PRIMA - <u>Subretiniano</u> (pre clínico) 	<ul style="list-style-type: none"> ARGUS II - <u>Epirretiniano</u> ORION – <u>cortical</u> (pre clínico) 	<ul style="list-style-type: none"> ALPHA AMS - <u>Subretiniano</u>
Número de electrodos	<ul style="list-style-type: none"> IRIS : 150 PRIMA : Miles 	<ul style="list-style-type: none"> ARGUS II : 60 ORION : 3x10= 30 	<ul style="list-style-type: none"> ALPHA AMS – 1600
Técnica quirúrgica	<ul style="list-style-type: none"> IRIS : 2.5 - 3 <u>hs</u> PRIMA : sub 1h 	<ul style="list-style-type: none"> ARGUS II : hasta 4 <u>hs</u> ORION : no <u>conocido</u> 	<ul style="list-style-type: none"> ALPHA AMS – hasta 10 <u>hs</u>
+	<ul style="list-style-type: none"> IRIS : <u>Aprobado en Europa</u> <ul style="list-style-type: none"> - 150 <u>electrodos</u>(mayor <u>resolución</u>) - Sensor de imagen <u>biomimético ATIS</u> - <u>Diseño explantable patentado</u> PRIMA : <ul style="list-style-type: none"> - <u>Implante modular inalámbrico, puede ampliarse indicación a DMAE</u> - <u>Alta especificidad (cada electrodo tiene su retorno)</u> - <u>Potencial para anestesia local</u> 	<ul style="list-style-type: none"> ARGUS II : <ul style="list-style-type: none"> - <u>Experiencia</u> - <u>Aprobado en EU y EEUU</u> ORION : <ul style="list-style-type: none"> - <u>Estimulación corteza externa directa</u> - <u>Indicación más amplia</u> 	<ul style="list-style-type: none"> ALPHA AMS: <ul style="list-style-type: none"> - 1600 <u>electrodos</u> - <u>No gafas</u> - <u>Aprobado en Europa</u>
-	<ul style="list-style-type: none"> IRIS : <ul style="list-style-type: none"> - <u>Menos experiencia clínica</u> PRIMA : <ul style="list-style-type: none"> - <u>No datos en humanos</u> 	<ul style="list-style-type: none"> ARGUS II : <ul style="list-style-type: none"> - <u>Rendimiento clasificado por la FDA como "beneficio probable" para los pacientes.</u> ORION : <ul style="list-style-type: none"> - <u>No experiencia en humanos</u> - <u>Más invasivo</u> - <u>No claro donde y qué estimular en la corteza.</u> 	<ul style="list-style-type: none"> ALPHA IMS: <ul style="list-style-type: none"> - <u>Cirugía y anestesia más (8h-10h)</u> - <u>Resultados igual que epiretiniano y no explantable si falla.</u> - <u>Baja especificidad, los 1600 electrodos tienen un único electrodo de retorno.</u>

Tabla 6. Especificaciones técnicas y ventajas y desventajas de los 3 tipos de implantes comercializados. Tabla modificada de Pixium.

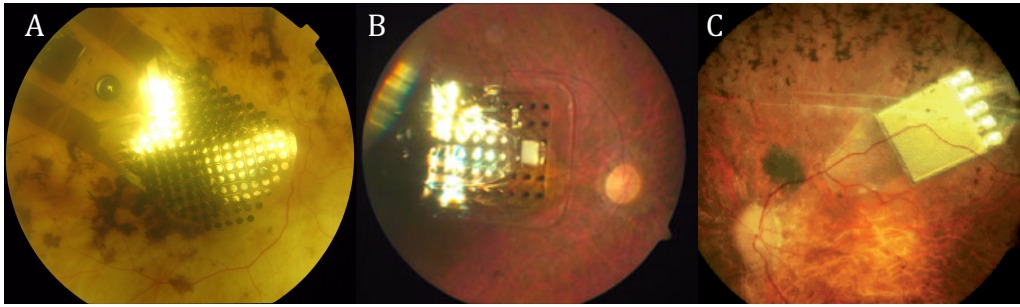


Figura 22: A: Implante Iris. B: Implante Argus II. C: Implante subretiniano Alpha.

6.2.4. Trasplante retiniano

El trasplante de retina es otra estrategia terapéutica para restablecer la visión en pacientes con enfermedad retiniana degenerativa avanzada y es un área de interés creciente en la investigación en retina. Se puede aplicar el mismo principio que el de las prótesis retinianas, pero en este caso serán células nuevas las que reemplazarán a los fotorreceptores en vez de los implantes electrónicos.

La retina es un buen sustrato para tratamientos con células madre, puesto que tiene la combinación óptima del fácil acceso quirúrgico, combinado con la posibilidad de evaluar las células trasplantadas directamente a través de los medios oculares transparentes.¹⁶⁵ Diferentes tejidos pueden ser la fuente de células que pueden utilizarse para trasplante: tejido fetal, células madre embrionarias, células madre neuronales, células somáticas, células madre inducidas pluripotentes (IPS) y epitelio pigmentario de la retina (EPR) (figura 23). Entre las limitaciones de estas técnicas se incluyen problemas derivados del espacio limitado en la retina receptora, problemas éticos al trabajar con células madres embrionarias, cómo diferenciar correctamente las células embrionarias a fotorreceptores y en el caso de células autólogas derivadas adultas se mantendría la mutación genética. Por lo tanto, el tratamiento futuro de la degeneración retiniana secundaria a pérdida de fotorreceptores requerirá tratamiento combinado de terapia celular y terapia génica.¹⁶⁶ Hasta el momento existen varias series de casos en los que se explora la viabilidad, efectividad y seguridad de los trasplantes de neurorretina fetal,¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ de fotorreceptores¹⁷¹, de células madre pluripotentes inducidas^{172,173} y de células madre del EPR.^{174,175} Pero todavía no existen ensayos clínicos en fase III/IV para este tipo de terapias.

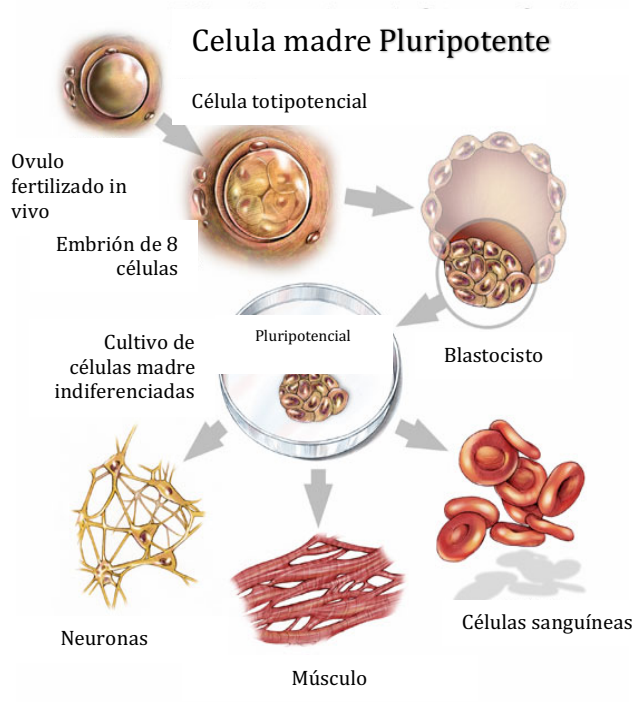


Figura 23. Esquema de diferenciación de células madre.

Hipótesis

En Gipuzkoa existe una serie de peculiaridades geográficas y condiciones que nos permitirán plantearnos nuestra hipótesis de trabajo y que son:

1. Las dimensiones físicas y demográficas de Gipuzkoa (712.801 habitantes en 1500Km²) (Eustat 2017), y las características sociológicas de la población autóctona, ligada al lugar de nacimiento o su cercanía a lo largo de generaciones, la hacen muy adecuada para estudios epidemiológicos de base poblacional.
2. Una organización, Begisare, que agrupa a los pacientes de Gipuzkoa.
3. Sistema público de Salud con cobertura universal y asistencia oftalmológica en toda la provincia con todas las herramientas para el diagnóstico clínico de la RP y manejo de sus complicaciones.
4. Registros de la ONCE donde se registran las causas de ceguera legal en cada provincia de España.
5. Biobanco que permite mantener las muestras de los pacientes para futuros estudios moleculares.

Las peculiaridades geográficas descritas, constituyen un escenario idóneo para el planteamiento de la siguiente hipótesis:

Existe una gran heterogeneidad genética dentro de la RP. Es posible que en un área geográfica con existencia documentada de alelos fundadores en alteraciones genéticas monogénicas muy prevalentes, como el País Vasco, pudiera haber una representación mas limitada del repertorio mutacional de la RP, lo que ayudaría a establecer correlaciones genotipo-fenotipo y facilitaría la caracterización genético molecular de nuestra muestra de pacientes afectados de RP.

Objetivos

Teniendo en cuenta las consideraciones expuestas en la introducción y el escenario referido en la hipótesis, en este proyecto nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Creación de un registro de RP de Gipuzkoa que permita completar los siguientes objetivos:
 - a) Conocer la prevalencia de la enfermedad en Gipuzkoa.
 - b) Conocer la distribución de las diferentes formas de herencia en nuestra población.
 - c) Caracterización genético-molecular de nuestros pacientes.
 - d) Mantener las muestras de nuestros pacientes para futuros estudios moleculares y conocer el diagnóstico molecular del resto de nuestra población.
 - e) Crear grupos de pacientes con mutaciones conocidas para que se puedan beneficiar de tratamientos y/o ensayos clínicos en terapia génica en un futuro.
2. Caracterización clínica de la RP en nuestra población.
3. Conocer las complicaciones secundarias de la RP en nuestra población.
4. Realizar correlaciones genotipo-fenotipo.

Material y Métodos

1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio observacional transversal. Los pacientes incluidos fueron derivados a la consulta del Hospital Donostia a través de las consultas de Oftalmología ambulatorias y a través de la asociación de afectados de Retinosis Pigmentaria de Gipuzkoa (Begisare), en un periodo comprendido entre Junio 2009 y Diciembre 2015.

Se realizó un estudio descriptivo general de las características clínicas, epidemiológicas y moleculares de los pacientes. Posteriormente se creó un registro de todos los pacientes afectados de RP en Gipuzkoa.

El estudio se llevó a cabo siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki y de confidencialidad en la recolección de datos. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Donostia.

2. Lugar de estudio

Los pacientes fueron estudiados en el Servicio de Oftalmología en el Hospital Universitario Donostia, el cual cuenta con una sección de retina con las pruebas complementarias necesarias para realizar el estudio en su momento.

La extracción de ADN se realizó en el Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Donostia y a partir del 2011 se centralizaron las extracciones en los centros de salud correspondientes a cada paciente. El procesamiento de las muestras se realizó en el Biobanco del Instituto Biodonostia y el análisis molecular lo realizó el Grupo de neurodegeneración sensorial del Departamento de Neurociencias del Instituto Biodonostia.

Parte del análisis molecular se realizó en colaboración con la Universidad de Washington, St Louis, EEUU, en colaboración con el Dr. Carlos Cruchaga.

3. Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión para el estudio de prevalencia

- Pacientes con diagnóstico clínico de RP que acuden al Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Donostia en el periodo comprendido entre Junio del 2009 y Diciembre del 2015.

Criterios de exclusión para el estudio de prevalencia

- Pacientes con diagnóstico de distrofia retiniana sin filiar.
- Pacientes con diagnóstico genético de RP sin presentar clínica en el momento del estudio.

Criterios de inclusión para el estudio epidemiológico molecular

- Pacientes con diagnóstico clínico de RP previo o de novo sin diagnóstico genético y familiares de primer grado, independiente de que sean sanos o afectados.
- Pacientes con diagnóstico genético previo de RP.
- El caso índice debe residir en Gipuzkoa en el momento del estudio.
- Pacientes y familiares de primer grado que tras explicarles las condiciones del estudio aceptaran participar.
- Pacientes y familiares de primer grado que accedieran a donar una muestra de ADN al Biobanco del Instituto Biodonostia para el estudio.

Criterios de exclusión para el estudio epidemiológico molecular

- Pacientes con diagnóstico de distrofia retiniana sin filiar.
- Pacientes y familiares que no aceptaran participar en el estudio.
- Pacientes y familiares incapaces de entender y firmar el consentimiento informado.

Criterios de inclusión para el estudio epidemiológico clínico

- Pacientes con diagnóstico clínico de RP previo o de novo que acuden al Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Donostia en el periodo comprendido entre Junio del 2009 y Diciembre del 2015.
- Pacientes que tras explicarles las condiciones del estudio aceptaran participar.
- Pacientes que pudieran acudir a consultas externas de Oftalmología para la realización de la exploración oftalmológica y pruebas complementarias.

Criterios de exclusión para el estudio epidemiológico clínico

- Pacientes con diagnóstico de distrofia retiniana sin filiar o pacientes con diagnóstico previo de RP que se descartara después del examen oftalmológico.
- Pacientes que no aceptaran participar en el estudio.
- Pacientes que no pudieran acudir al lugar de estudio, ya fuera por edad avanzada o patología concomitante que impidiera su desplazamiento.
- Pacientes incapaces de entender y firmar el consentimiento informado.

4. Creación del registro

La mayoría de pacientes fueron derivados a través de las consultas de oftalmología ambulatorias y a través de la asociación de afectados de Retinosis Pigmentaria de Gipuzkoa (Begisare). Se crea el registro en el 2009 mediante los datos obtenidos de la historia clínica que se recogían en un cuestionario en una hoja de Access (ver anexo) que se adjuntaba a la historia clínica.

Desde el 2012 se han digitalizado todas las historias clínicas y pruebas complementarias en el Osabide Global y los datos han sido obtenidos a través del Osabide Global.

5. Estudio clínico: Confirmación diagnóstica y obtención de los datos clínicos para los diferentes estudios.

5.1. Diagnóstico oftalmológico

5.1. 1. Estudio del caso índice

Se confirmó el diagnóstico tanto de los pacientes derivados de otros centros con diagnóstico previo de RP como de pacientes con sospecha de RP en el Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, Gipuzkoa, España. Los criterios diagnósticos fueron los siguientes:

1. Síntomas: ceguera nocturna, disminución de agudeza visual y/o pérdida del campo visual periférico.
2. Fondo de ojo: triada clásica: depósitos de pigmento en forma de espículas óseas en media periferia, atenuación arteriolar y palidez papilar.
3. Campimetría: reducción concéntrica del CV.
4. ERG: disminución de amplitud de las ondas a y b en el electroretinograma.²⁹
5. Genética: confirmación de mutación en aquellos pacientes con informes externos previos.

a) Datos de la historia clínica

En la entrevista clínica del paciente comenzamos con el año de inicio de síntomas y cuál fue el principal síntoma al diagnóstico y año de diagnóstico. Se recogen los antecedentes personales, haciendo especial hincapié en los síntomas de las formas de RP sindrómicas más frecuentes: sordera en el caso del Síndrome de Usher y polidactilia en el caso del Síndrome de Bardet Biedl.

b) Agudeza visual

Se usó el proyector de optotipos Topcon ACP-8 (de Corporación Topcon, Japón) para tomar las agudezas visuales a 6 metros del paciente. La AV se tomó con la mejor corrección con la que contara el paciente en ese momento en la escala ETDRS, y se registraron convertidas a LogMAR. Las agudezas visuales en los pacientes de baja visión equivalentes a “cuenta dedos a 1 metro” se registraron como 0,01 en escala Snellen (LogMAR= 2), las agudezas visuales de “movimiento de manos” se registraron como 0,001 en escala de Snellen (LogMAR = 3), las agudezas visuales de “percepción de luz” se registraron como 0,0001 (LogMAR=4)^{176,177} y amaurosis como 0 (LogMAR=5).

c) Refracción

Se usó el autorefractómetro KR-8800 (Topcon, Europa) para el cálculo del equivalente esférico de los pacientes.

d) Biomicroscopía de polo anterior

Se valoró la presencia de catarata subcapsular posterior, afaquia o pseudofaquia mediante la lámpara de hendidura Topcon IS-600 (Topcon, Europa).

e) Presión intraocular

Se midió la presión intraocular mediante el tonómetro de Goldmann.

f) Test de colores

Se realizó la prueba de visión de colores de forma binocular, con el test de Ishihara de 38 láminas a 75cm. Los pacientes fueron clasificados como normal, protanopia, deuteranopia o ceguera total al color; según las cartillas que fueran capaces de identificar en la prueba. Se excluyeron los pacientes que debido a la baja visión no fueron capaces de realizar la prueba.

g) Campimetría

Se realizó el campo visual Humprey 24/2 (Zeiss, Europa). Se excluyeron aquellos pacientes que debido a la baja visión no pudieron realizar la prueba. Aquellos pacientes con menos de 10º centrales, se les realizó la prueba 10/2. Se valoró la pérdida del CV concéntrica medida en grados.

h) Fundoscopia

Se exploró el fondo de ojo con la lámpara de hendidura Topcon IS-600 (Topcon, Europa) y la lente superfield de Volk. Se evaluó el vítreo, el polo posterior y retina periférica. Se anotó cualquier alteración vitreoretiniana y se valoró la presencia de la triada clásica de la RP: palidez papilar, espículas óseas en media periferia y atenuación arteriolar.

i) Retinografía y autofluorescencia (AF)

Se realizaron retinografías del polo posterior y media periferia. En algunos pacientes se realizó autofluorescencia con el retinógrafo Topcon TRC-50DX (Topcon, Europa) que emplea los filtros de Spaide con una longitud de onda para el filtro de excitación de 535-585nm y para el filtro de barrera de 605-715nm. En la autofluorescencia se describe el patrón de hiper/hipoautofluorescencia y se valoró la presencia de anillo hiperautofluorescente parafoveal. También se detectó la presencia de drusas del nervio óptico.^{101,102,178}

j) Tomografía de Coherencia Óptica

Se realizó la OCT macular y de capa de fibras nerviosas con la OCT Stratus y Cirrus (Zeiss) (dependiendo del año de exploración de los pacientes): se midió el grosor macular central y la presencia de membrana epirretiniana (MER) y edema macular quístico (EMQ), así como el grosor medio de la capa de fibras nerviosas.¹⁰⁰⁻¹⁰² En los pacientes estudiados con la OCT Cirrus, se valoró la zona de elipsoides (antigua línea IS/OS de fotorreceptores, línea de unión de los segmentos internos y externos de los fotorreceptores), su integridad y su longitud. Para valorar la integridad de la zona de elipsoides definimos 3 estadios en el corte horizontal de la OCT a nivel de la fovea:

- Estadio 1: zona de elipsoides no visible
- Estadio 2: zona de elipsoides alterada
- Estadio 3: zona de elipsoides normal.

La longitud de la zona de elipsoides se midió con el calibrador de la OCT en los pacientes con la zona de elipsoides íntegra, es decir, aquellos con estadio 3.

k) Electrofisiología

Se realizó electroretinograma en el servicio de neurología del Hospital Donostia a aquellos pacientes de diagnóstico de novo y a los pacientes sin electroretinograma previo. Se empleó el electroretinografo Viasys (Viasys Healthcare, UK, Ltd) y el *software* Synergy versión 15.0 (Medelec Synergy EP; Oxford Instruments Medical, Surrey, UK). Se realizó el electroretinograma flash con electrodo activo de hilo conjuntival y electrodo de referencia periorbitario de superficie. Se utilizó el estimulador externo Braintronics Flash-101. Con una frecuencia de estímulo de 0,5-2 Hz y 30 Hz para el flicker. Se realizaron registros en condiciones fotópicas, escotópicas y flicker. El tiempo de análisis del registro fue de 300msecs y una amplitud de 20-100 microvoltios con un promedio de 5-30 adquisiciones.

En la hoja de Access (Ver Anexo) se resumen los datos recogidos en la historia clínica.

5.1.2. Estudio clínico completo de las formas de RP sindrómicas

Los pacientes con fenotipos complejos en los que la enfermedad retiniana se acompañaba de síntomas extraoculares, se derivaron a medicina interna a la sección de enfermedades raras para la realización de un estudio completo para descartar toda posible afectación sistémica y diagnóstico correcto de la forma sindrómica. En los casos de sospecha de Síndrome de Usher se derivaron al servicio de Otorrinolaringología.

5.1.3. Estudio clínico de la familia:

En los casos de familias informativas se procede al estudio clínico de familiares de primer grado, siguiendo los mismos protocolos aplicados a los pacientes afectos.

5.2. Árbol genealógico y clasificación del tipo hereditario familiar

Se realizó el árbol genealógico en todas las familias, denominando caso índice al sujeto a estudio en cada familia. Se recabó información sobre la posibilidad de existencia de consanguinidad en la familia para orientar el estudio genético a las formas recesivas de la enfermedad. En los casos sin antecedentes familiares, se denominaron esporádicos (RPesp).

Criterios de clasificación genética de las familias:

Las familias se clasificaron genéticamente según los siguientes criterios utilizados por Ayuso et al., 1995,²² los cuales han sido modificados de Haim:¹⁷⁹

Herencia autosómica dominante (RPAD):

- Transmisión de varón a varón (no explicada por consanguinidad)
- Transmisión vertical en, al menos, 2 generaciones sucesivas con mujeres afectadas con la misma severidad que los hombres.

En caso de existir consanguinidad, la pseudo-dominancia se descartará si existen afectos fuera de la rama consanguínea.

Herencia autosómica recesiva (RPAR):

- Más de un hijo afecto de sexo femenino o de ambos sexos con padres sanos.

En caso de fratrías de sólo varones afectos, es necesario excluir herencia ligada al cromosoma X, mediante un cuidadoso examen oftalmológico de mujeres posibles portadoras (madre, hijas y hermanas de los afectos).

- Único afecto en la familia, hijos de padres sanos y consanguíneos.

Herencia ligada al cromosoma X (RPLX):

- Afectación severa de varones, emparentados entre sí a través de mujeres sanas o con signos de portadoras.
- Afectación severa de un varón con madre, hija o hermana con signos de ser portadora.

Tras el diagnóstico genético del caso índice se realizó estudio de segregación familiar y si se confirmaba la mutación, se realizaba el diagnóstico genético y se replanteaba el tipo de herencia deducido a través del árbol genealógico, clínica y consanguinidad. Para finalizar el estudio, se realizó el consejo genético al caso índice y familiares (ver figura 27).

6. Estudio genético

6.1. Colección de muestras humanas:

En cuanto al ADN de los pacientes y familiares, se obtuvieron 20cc de sangre periférica en tubos EDTA tras la obtención del consentimiento informado del paciente. El ADN se extrajo y almacenó en el Nodo de Donostia del biobanco de Euskadi, siguiendo los protocolos establecidos (www.bioef.org).

Se extrajo el ADN a partir de las muestras de sangre y se aisló de manera automatizada con el *AutoGenFlex Star instrument* (AutoGen, Holliston, MA) utilizando Flexigen DNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se midieron concentraciones de ADN en un espectrofotómetro Nanodrop (ND-1000, Thermo Scientific NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA) y todas las muestras de ADN se almacenaron a -80°C.

A continuación, se explica con detenimiento el desarrollo en la ejecución de la caracterización genético-molecular de los casos índice. Del 2009 al 2015 las técnicas y estrategias utilizadas para la caracterización molecular de los pacientes ha variado, esto ha sido debido al avance en las tecnologías que han supuesto un abaratamiento de los costes y un mayor rendimiento diagnóstico. La técnica utilizada ha variado en cuanto al número de sujetos estudiados dependiendo del momento del estudio. Además, varios de los pacientes han podido ser analizados utilizando distintas técnicas. Por consiguiente, no es posible realizar una comparación del rendimiento diagnóstico obtenido con los distintos abordajes experimentales empleados en el presente trabajo. No obstante, se realizará un análisis descriptivo de las mismas.

Al inicio del estudio se decidió desarrollar 2 estrategias de cribado (HRM y *arrays* de ADN) debido a su coste-efectividad.^{61,180} A partir del 2010 y 2011, comenzamos a utilizar técnicas de NGS, Illumina e Ion Torrent respectivamente.

6.2. Análisis de High Resolution Melting (HRM)

6.2.1. Selección de genes

Se seleccionaron los genes causales de tamaño medio (menos de 4 kb) de RP no sindrómica y sindrómica (síndromes de Bardet Biedl y Usher) con prevalencia media/alta. Se incluyeron en el estudio un total de 16 genes de RP que cumplen los siguientes criterios:

- 1) Tamaño: se seleccionaron genes con transcritos de menos de 4 kb, incluida la región UTR, excepto los genes CRB1; LRAT y PDE6A cuya extensa región UTR quedo excluída del análisis.
- 2) Número de exones: genes con menos de 22 exones.
- 3) Prevalencia: los genes representan, al menos, el 0,4% del total de casos de PR en todo el mundo^{31,181}(<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>).

Establecimos los siguientes grupos experimentales:

GRUPO I: genes de RP medianos analizados en 92 casos.

GRUPO II: genes prevalentes del síndrome Bardet Biedl analizados en 4 pacientes que cumplieron con el diagnóstico clínico del síndrome.

Una descripción de los genes seleccionados y los criterios utilizados se resumen en la Tabla 7.⁶¹ Además, se incluyeron regiones ricas en mutaciones patogénicas del gen ABCA4,

que por su elevado tamaño no pudo ser analizado de forma completa siguiendo esta metodología.

6.2.2. Diseño de primers

Para flanquear los exones de nuestros genes diana, incluyendo las secuencias intrónicas pequeñas (unos 50 bp), se diseñaron cebadores utilizando el *software Primer Express 3.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU). Se generaron así, amplicones de entre 250 y 330 pb de longitud. La especificidad teórica de los *primers* fue evaluada *in silico*, mediante la aplicación: (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr> y <http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/projects/e-pcr/>). Antes del ensayo de HRM, se llevó a cabo una PCR de punto final con una muestra de control para probar la especificidad, la eficacia y la posible existencia de dímeros de cebadores en una electroforesis en gel de agarosa al 3%. Los cebadores que no cumplían todas estas condiciones se rediseñaron.

6.2.3. Condiciones de ensayo HRM y PCR en tiempo real

La amplificación por PCR y la HRM se realizó en una sola ejecución en un sistema de PCR a tiempo real (7900HT) en placas de 384 pocillos (Applied Biosystems) que contenían muestras de 92 pacientes, dos controles de ADN negativos y un control negativo sin la muestra diana de ADN (NTC). Cada reacción de PCR se realizó por triplicado y contenía 0,5µl de ADN genómico a 20 ng/µl, 5 µM de cada cebador y MeltDoctor HRM MasterMix (Applied Biosystems) en un volumen total de 10µl por reacción. Para el análisis de cuatro pacientes con síndrome de Bardet Biedl clínicamente diagnosticados, se siguió una estrategia similar con la siguiente modificación: se analizaron simultáneamente hasta seis amplicones de genes asociados a Bardet Biedl en placas de 384 pocillos en una sola serie. Para cada amplicón se analizaron cuatro probandos, 10 controles negativos de ADN y una muestra de NTC por triplicado.

La condición de reacción incluye una etapa de activación enzimática a 95°C durante 10 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos (desnaturalización) más una bajada de temperatura de 95°C a 60°C durante 1 minuto (alineamiento/amplificación). La HRM se llevó a cabo con un paso de desnaturalización (95°C durante 10 sg) seguido de un intervalo de 60°C-95°C, a una velocidad de incremento de 1°C por minuto, mientras se realiza un registro continuo de la fluorescencia consistente en 30 capturas de señal fluorescente por grado centígrado.

De cara a poder determinar la sensibilidad de HRM como método de detección de mutaciones, se usaron muestras de ADN con mutaciones conocidas en los genes USH2A (mutación p. Cys759Phe) y RHO (mutaciones p.Gln28His y p.Pro347Gln) como controles positivos. Otra forma de validar el método de HRM consistió en comparar el rendimiento diagnóstico de éste con el secuenciado por Sanger. Para ello se secuenció toda la zona codificante del gen RHO en 10 de las muestras analizadas mediante HRM, correspondientes a pacientes con un árbol genealógico y/o diagnóstico compatible con RPAD.

6.2.4. Análisis HRM

El análisis de las curvas de HRM se llevó a cabo utilizando el *software* HRM v2.0.1 (Applied Biosystems). En la figura 24 se ilustra como las curvas generadas en el proceso de fusión de la hebra de ADN se normalizan con respecto a una muestra control, la cual no presenta ninguna mutación en la región analizada. Aquellas curvas que se desvían de manera significativa de la muestra control (en azul, verde y rojo en la gráfica), son marcadas de manera automática por el programa con un color diferente. Las diferencias se consideran significativas si las réplicas caen fuera del intervalo de confianza con respecto a la curva control.

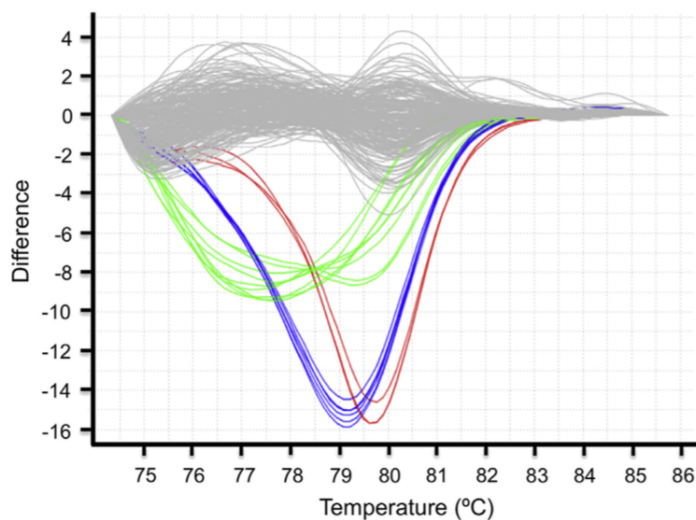


Figura 24. Análisis de HRM del gen PDE6A. Gráfico de diferencias obtenido a partir del análisis de HRM del gen PDE6A. Se representan tres variantes genéticas que difieren claramente de los controles (líneas grises). Mediante la secuenciación directa de las muestras identificamos 3 variantes genéticas diferentes en un fragmento de 233 pb: 1 mutación puntual de tipo intrónico I (A> G) en homocigosis en tres muestras (c.859-63A>G, en verde); una mutación puntual de tipo I (C> T) en una región de empalme del gen encontrado en 2 muestras (c.933+4C>T, en azul oscuro); y una variante de cambio de sentido de tipo I (A> G) en homocigosis, que se predice como probablemente patogénica en una muestra (p.Pro293Leu, en rojo).

	Gene	Inheritance	Associated diagnosis	aa	bp	bp*	# exons	Prevalence #	Synonyms	
I	RHO	ar/ad	RP	348	2592	1044	5	0.55/8.75	CSNBAD1, OPN2, RP4	
	PDE6A	ar	RP	860	5642	2580	22	1.93	RP43	
	PRPF31	ad	RP	499	2126	1497	14	1.75	PRP31, RP11	
	PRPF3	ad	RP	683	2433	2049	16	1.4	HPRP3, PRP3, RP18	
	CLRN1	ar	RP/Usher	232	2359	696	3	1.1	RP61, USH3, USH3A	
	LRAT	ar	RP	230	4928	690	3	0.55	LCA14	
	CRB1	ar	RP/LCA	674	9023	2022	6	0.55	LCA8, RP12	
	PRPH2	ad	RP/CORD/AMD	346	2974	1038	3	0.4	CACD2, RDS, RP7	
	ROM1	ad	RP	351	1878	1053	3	0.4	—	
	II	BBS1	ar	BBS	517	3423	1551	17	23	—
		BBS10	ar	BBS	723	3595	2169	2	20	FLJ23560
BBS2		ar	BBS	721	2963	2163	17	8	—	
BBS9		ar	BBS	887	4027	2661	23	6	PTHB1	
MKKS (BBS6)		ar	BBS	570	2663	1710	6	6	BBS6	
BBS12		ar	BBS	710	3431	2130	3	5	FLJ35630	
BBS4		ar	BBS	519	2490	1557	16	2	—	

Tabla 7. Descripción de los genes RP y BBS analizados. Los genes se dividen en los dos grupos experimentales analizados (I-II). Los asteriscos (*) indican el número de pares de bases sin región UTR. #: Porcentaje de la contribución de cada gen a casos de RP en todo el mundo,³¹ excepto para el grupo experimental II, donde la prevalencia se refiere al porcentaje de contribución de cada gen BBS al síndrome Bardet Biedl en todo el mundo.¹⁸² AMD: degeneración macular asociada a la edad; BBS: síndrome de Bardet Biedl; CORD: distrofia de conos y bastones; LCA: amaurosis congénita de Leber; RP: Retinosis pigmentaria. Tabla publicada en *Experimental Eye Research* por Anasagasti y cols.⁶¹

6.3. Arrays de ADN

Se analizaron 76 pacientes con *arrays* de ADN (*Axiom Exome Array Plates*, Affymetrix; catálogo n.º 902106). Éstos consisten en 96 *microarrays* idénticos, cada una conteniendo variantes raras de la región codificante del genoma humano, consistentes en variantes no sinónimas, mutaciones puntuales y pequeñas inserciones y/o deleciones. Su contenido genómico se alimenta de un conjunto de variantes novedosas descubiertas en más de 16 iniciativas principales de secuenciación del exoma humano, especialmente el *Exome Chip Design Consortium*, el *NHLBI Exome Project*, el *Genetics of Type 2 Diabetes Program (GoT2D)*, los *1000 Genomas Project*, *Cancer Genome Atlas Project*, *Sardinia exome study*, *Autism Exome Sequencing Study* y *UK10K project*, entre otros. Las variantes se determinaron mediante la secuenciación de 12.000 muestras étnicamente diversas de ancestros europeos, africanos, latinos y asiáticos con una cobertura de al menos 20 veces y que representan múltiples cohortes de enfermedades.

Los servicios de genotipado de Affymetrix fueron provistos por el Centro Nacional de Genotipado (CEGEN-ISCIH). Las muestras se distribuyeron en 2 placas de 96 *arrays*. El análisis inicial y una prueba de control de calidad de los datos brutos se realizaron utilizando el *software Genotyping Console 4.1.4* (Affymetrix).

6.3.1. Análisis de filtrado de datos

El primer paso consistió en la identificación y selección de las 5.044 variantes genéticas presentes en los genes de distrofias retinianas de las más de 300.000 variantes presentes en cada array. La información de los genes implicados en distrofias retinianas se obtuvo de la base de datos de Retnet, y se describe en la tabla suplementaria del artículo de nuestro grupo (Barandika et al., 2016: www.carger.com/doi/10.1159/000445690).¹⁸⁰

Usando los datos generados por Genotyping Console 4.1.4 (Affymetrix), seleccionamos los valores de cada variante de distrofias retinianas de la columna *Base Calls* de cada muestra. Al elegir esta columna, introdujimos un sesgo hacia los falsos positivos, con el objetivo de aumentar la sensibilidad de nuestro método y, por lo tanto, minimizar la pérdida de datos. Posteriormente utilizamos una estrategia simple de filtrado de datos basada en Microsoft Excel (versión 14.4.2, para Macintosh) con el fin de identificar las supuestas variantes patógenas en nuestra población. Para este fin, seleccionamos las variantes genéticas que coseguran con la enfermedad, es decir, las variantes genéticas en los genes recesivos se filtraron para que estuvieran presentes en homocigosis en individuos afectados de la misma familia y en heterocigosis o ausentes en individuos no afectados. Además, se utilizó un grupo de 30 individuos no afectados de nuestra cohorte como control, con el fin de validar las variantes detectadas utilizando una muestra más grande, con el mismo origen étnico. Este grupo control se seleccionó basándonos en la baja probabilidad de desarrollar la enfermedad considerando su edad avanzada (edad media \pm DE, 62,2 \pm 17,3 años), y fue especialmente útil como control para detectar variantes genéticas patógenas probables en aquellos pacientes sin o con pocos miembros de la familia disponibles. Un diagrama representativo del flujo de trabajo seguido en una de las familias estudiadas se resume en la figura 25 publicada por Barandika et al. en el 2016.¹⁸⁰

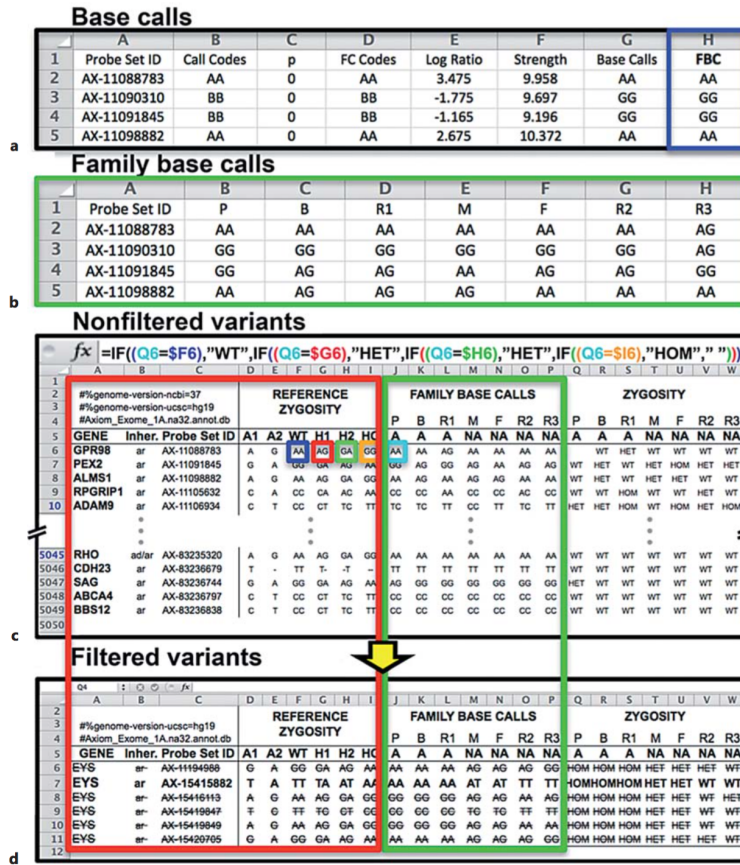


Figura 25. Diagrama de flujo del análisis de datos. El diagrama muestra un ejemplo del proceso de filtrado de datos. a El proceso comienza con la selección de las columnas *Base calls* (cuadrado azul oscuro) de cada miembro de la familia. b Posteriormente se agruparon las *Base calls* de todos los miembros de la familia. c Las *Base calls* familiares (por ejemplo, AA delimitadas por un cuadrado azul claro) se compararon con los valores de las columnas de cigosidad de referencia (por ejemplo, AA, AG, GA y GG contorneadas por cuadrados en azul oscuro, rojo, verde y naranja, respectivamente) para determinar la cigosidad de todas las variantes genéticas para cada miembro de la familia (columnas de cigosis). Para tal fin, se aplicó una fórmula lógica, utilizando el software de Excel (zona superior del recuadro: fx). d Finalmente se inició un proceso de filtrado de datos. Al aplicar un primer filtro, redujimos el número inicial de variantes aproximadamente 1.000 veces (de 5.000 a 6 en este ejemplo) excluyendo aquellas variantes que no cosegregaron con la enfermedad. Por último, se aplicó un segundo filtro consistente en la selección de aquellas variantes que (1) están presentes en un gen compatible con el fenotipo del paciente, y (2) son patógenas o tienen una predicción *in silico* de su participación en la enfermedad. En este caso, las variantes que no cumplieron el criterio 2 no se tuvieron en cuenta, y se representan tachadas con una marca.¹⁸⁰

6.4. Next Generation Sequencing (NGS)

6.4.1. Método de terminación reversible (Illumina)

Teniendo en cuenta que se había descrito que los genes RHO, USH2A y RPGR aglutinan aproximadamente un 30% de los casos de RP a nivel mundial,³¹ secuenciamos siguiendo esta técnica estos 3 genes y añadimos el gen PDE6B por ser el modelo de ratón que utiliza nuestro grupo para estudios en terapia en RP y el gen RPE65 por ser el gen que estaba en fase de ensayo clínico en terapia génica en ese momento. Se analizó una muestra de 96 pacientes, utilizando secuenciación masiva mediante terminación reversible, utilizando un abordaje experimental consistente en mezclar toda nuestra muestra de pacientes en un único *pool*, con el objetivo principal de abaratar los costes de manera muy significativa.

Se realizó una secuenciación de ADN en *pool*, como se describió previamente por Cruchaga et al.¹⁸³ En resumen, se mezclaron cantidades equimolares de muestras de ADN individuales medido de manera muy precisa usando el sistema *Quant-iT PicoGreen*. De esta manera se obtuvo un *pool* de 96 muestras que contenía 100ng de ADN por individuo. Los exones de codificación y las regiones flanqueantes (un mínimo de 50pb a cada lado) se amplificaron por PCR individualmente usando cebadores específicos y la polimerasa Pfu Ultra de alta fidelidad (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU.). Se utilizó un promedio de 20 genomas diploides (aproximadamente 0,14 ng de ADN) por individuo en un total de 4 reacciones de PCR que cubren 2008 bases del gen RHO. Una cobertura media de 30 veces por alelo por *pool* parece ser la cobertura mínima necesaria para obtener un valor predictivo positivo óptimo para el algoritmo de obtención de variantes (*variant call*).¹⁸⁴ Todos los amplicones estaban cubiertos al menos 30 veces por alelo y muestra. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Para detalles del procedimiento completo, ver Cruchaga et al.¹⁸³

6.4.2. Método de secuenciado mediante semi-conducción (ION Torrent Personal Genome Machine-PGM)

La tecnología de secuenciado masivo mediada por semiconducción, se empleó para analizar 31 genes de familias RPAD en 35 pacientes (ver tabla 8). Para ello, se diseñaron un total de 663 pares de *primers* y se agruparon en 2 *pooles* de *primers* de Ion AmpliSeq Primer para flanquear 31 genes de distrofias retinianas con una cobertura total del 98,37% utilizando el *software* Ion AmpliSeq Designer (www.ampliseq.com). Las regiones excluidas por el diseño representaron sólo el 1,63% del total. Aunque la mayoría de los genes estaban relacionados con RPAD, también se incluyeron genes representativos asociados con formas dominantes de amaurosis congénita de Leber y distrofias de conos y

bastones ya que los síntomas clínicos asociados con estos genes a menudo son difíciles de distinguir de los asociados con RP (RetNet; <https://sph.uth.edu/retnet/disease.htm>) (tabla 8). Se empleó el kit Ion AmpliSeq v2.0 (Life Technologies, Foster City, CA, EE. UU.) para construir una biblioteca de amplicones de regiones genómicas diana con una longitud de lectura máxima de unos 200 pares de bases (longitud media, 142 pb) para secuenciación en el PGM.

AIPL1, BEST1, CA4, CRX, FSCN2, GUCA1A, GUCA1B, GUCY2D, IMPDH1, KLHL7, NR2E3, NRL, OTX2, PITPNM3, PROM1, PRPF3, PRPF31, PRPF6, PRPF8, PRPH2, RDH12, RHO, RIMS1, ROM1, RP1, RP9, RPE65, SEMA4A, SNRNP200, TOPORS, UNC119.

Tabla 8. 31 genes de familias RPAD analizados mediante Ion Torrent (NGS), ver artículo del grupo de Ezquerria-Inchausti et al.¹⁸⁵

6.4.2.1. Análisis de Secuenciación

El secuenciado NGS se llevó a cabo siguiendo el protocolo del kit de Secuencia Ion PGM 200. El procesamiento de la señal y la obtención de variantes genéticas (*base calls*) para los datos generados durante las ejecuciones de PGM se realizaron utilizando el *software* de análisis específico de la plataforma *Ion Torrent Torrent Suite versión 4.0* para generar lecturas de secuencia. Las secuencias generadas se alinearon con el genoma humano GRCh37/hg19 para la detección de variantes genómicas en las muestras secuenciadas.

En la siguiente tabla se resume el número de casos analizados y los genes o variantes analizadas con cada técnica:

Técnica	Nº casos estudiados	Genes o variantes estudiadas
HRM	96	16 genes
Arrays de ADN	76	5044 variantes genéticas de 181 genes
NGS (Illumina)	96	RHO, USH2A, RPGR, PDE6B y RPE65
NGS (Ion Torrent)	35	Panel de 31 genes de RPAD

Tabla 9. Número de casos estudiados con cada técnica de secuenciado y genes o variantes analizadas con cada técnica.

6.5. Filtrado de variantes relevantes y valoración del grado de patogenicidad:

Para poder identificar aquellas variantes causantes de RP, se siguió la siguiente estrategia de filtrado, en función de los siguientes criterios (figura 26):

- 1) Variantes previamente descritas como patogénicas (Ensembl, <http://www.ensembl.org/>).
- 2) Variantes con una frecuencia del alelo minoritario (MAF) inferior a 0,003 para genes recesivos o inferior a 0,001 para genes dominantes obtenido por las bases de datos de *1000 Genomes and Exome Aggregation Consortium*.
- 3) Variantes noveles en regiones de *splicing* y variantes con pérdida de función como variantes sin sentido y variantes que produzcan un cambio en el marco de lectura, deleciones o inserciones.
- 4) Variantes con cambio de sentido descritas previamente como probablemente deletéreas.
- 5) Variantes con cambio de sentido nóveles con gran probabilidad de estar implicadas en la enfermedad. Dicha probabilidad fue valorada utilizando predictores de patogenicidad *in silico* como:

SIFT (<http://www.sift.bii.a-star.edu.sg>)¹⁸⁶

Polyphen-2 (<http://www.genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)¹⁸⁷

PROVEAN (http://provean.jcvi.org/seq_submit.php)¹⁸⁸

GVDG (agvgd.iarc.fr/agvgd_input_php)¹⁸⁹

MutationTaster (www.mutationtaster.org)¹⁹⁰

Las variantes seleccionadas deben pasar los criterios de al menos cuatro de los cinco predictores.

Una vez realizada esta primera selección, se realizó una búsqueda de dichas variantes en bases de datos con información de exomas procedentes de controles no afectados, entre las que se encuentran: la base de datos de exomas española (<http://csvs.babelomics.org>).¹⁹¹ Para las variantes dominantes, sólo se consideraron las variantes ausentes en esta base de datos. Con respecto a las variantes recesivas, sólo se consideraron las variantes con un MAF <0,003 y sólo presentes en heterocigosis.

Finalmente se realizó la correlación genotipo-fenotipo según la clínica del paciente y un análisis de co-segregación en el que se testó la presencia o ausencia de la variante candidata en todos los familiares afectados y no afectados disponibles, respectivamente. En los

casos con una correcta segregación, se consideró la variante como causante de la patología en esa familia (figura 26).

Estos criterios para la interpretación de variantes siguen las directrices recientemente delineadas por el American College of Medical Genetics.¹⁹²

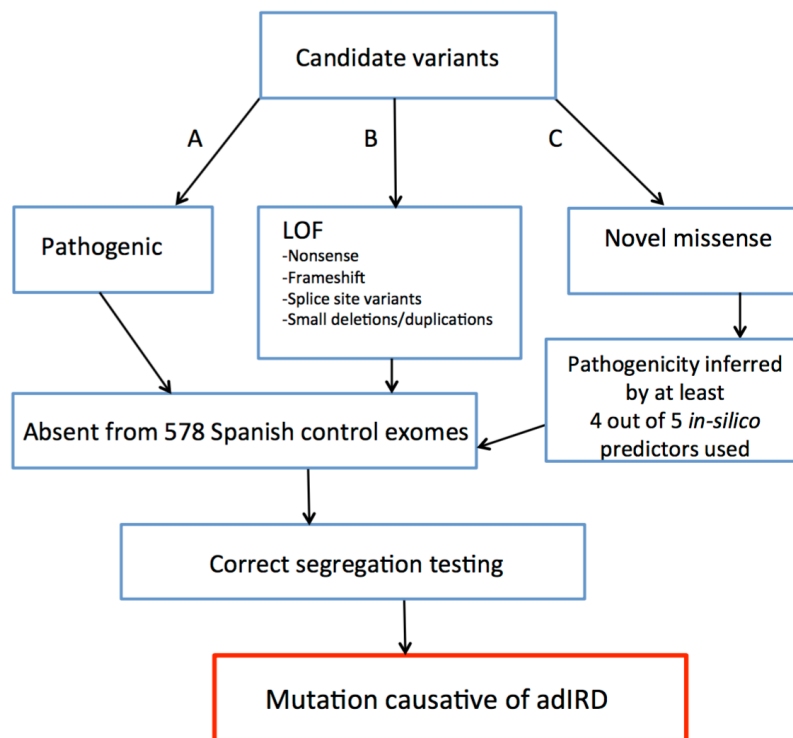


Figura 26. Algoritmo de filtrado de variantes relevantes y valoración del grado de patogenicidad. Algoritmo publicado para las formas dominantes, pero extensible a todos los tipos de herencia. adIRD: Distrofias retinianas AD. LOF: pérdida de función.¹⁸⁵

6.6. Método de Sanger o de terminación de cadena

Las variantes genéticas clínicamente relevantes detectadas se confirmaron con la secuenciación de Sanger en una plataforma *16-capillary ABI 3130xl (Applied Biosystems)*. El diseño de los cebadores y la secuenciación directa se realizaron siguiendo procedimientos estandarizados.⁶¹

6.7. Recursos de Web

Ensembl, <http://www.ensembl.org/>

NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Polyphen-2, <http://www.genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

RetNet, <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>

SIFT, <http://www.sift.bii.a-star.edu.sg/>

SNPnexus, <http://www.snp-nexus.org/>

The Human Genome Variation Society (HGVS), <http://www.hgvs.org/>

1000 Genomes, http://www.1000genomes.org/_ENREF_48

NHLBI Exome Sequencing Project (ESP), <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>

Babelomics, <http://csvs.babelomics.org>

ExacBrowse, <http://exac.broadinstitute.org/>

AmpliSeq Designer, www.ampliseq.com

e-PCR software <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/e-pcr/>

Exome Variant Server database (EVS) (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>)

In-Silico <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>

International HapMap Project, www.hapmap.org/

The Human Gene Mutation Database (HGMD), www.hgmd.cf.ac.uk/

7. Protocolo de estudio

Con el siguiente esquema resumimos el protocolo de estudio del caso índice, es decir, el primer paciente afecto de RP en cada familia que acude al Servicio de Oftalmología (figura 27).

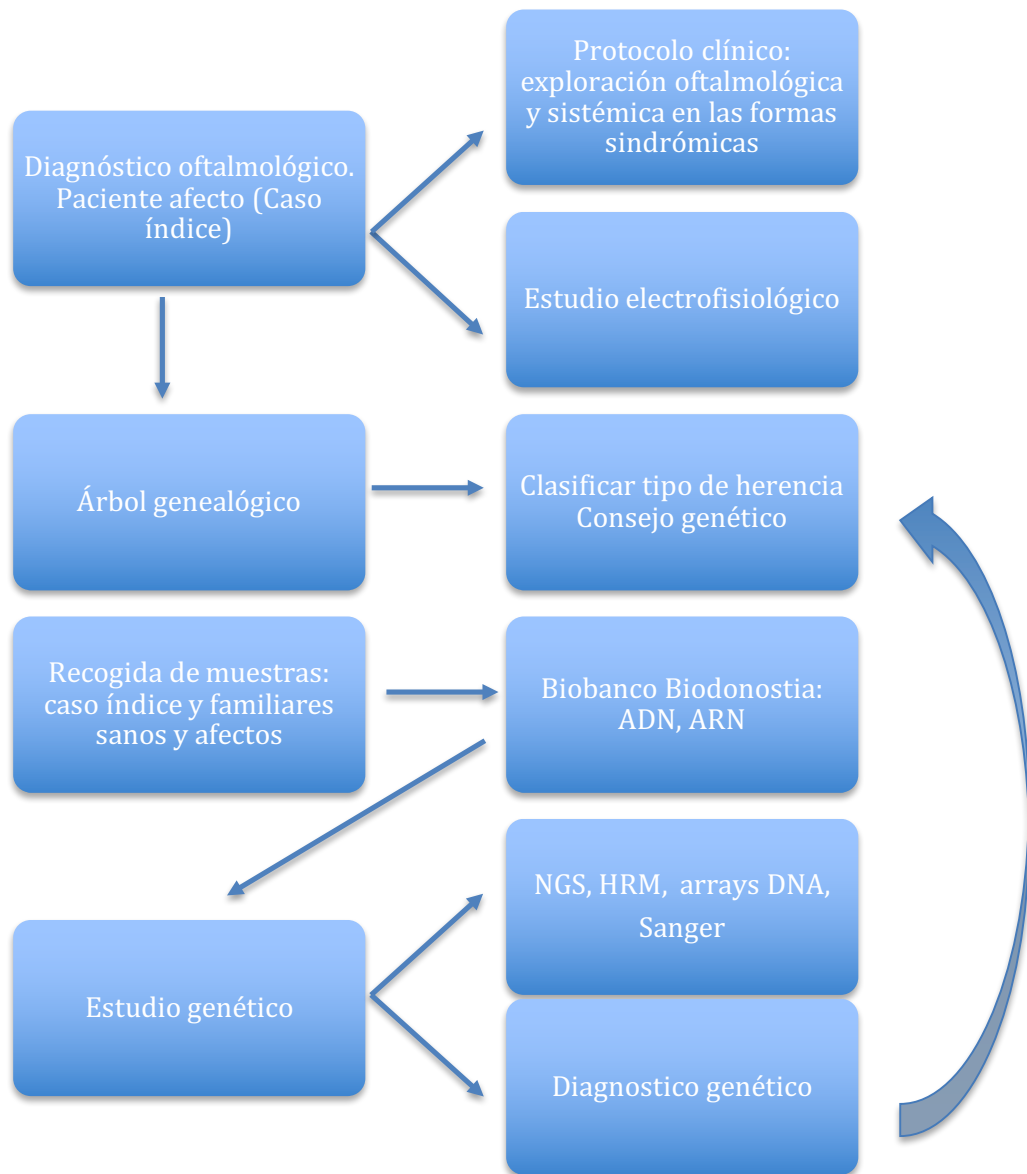


Figura 27. Protocolo de estudio: Paciente afecto de RP, caso índice.

8. Análisis estadístico

La prevalencia se calculó según los datos de población guipuzcoana del Eustat en 2017 y los casos de RP en Gipuzkoa confirmados mediante diagnóstico clínico.

Para el análisis descriptivo de variables cuantitativas se calcularon la media, mediana y desviación estándar.

Para la comparación entre variables cualitativas, se usó la prueba de chi cuadrado de Pearson. Para la comparación de variables continuas se utilizó el test de ANOVA. Para la correlación de variables continuas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson.

El análisis estadístico se ha realizado mediante el programa SPSS a partir de una base de datos excel con todas las variables definidas previamente. Se han considerado diferencias estadísticamente significativas a partir de una $p < 0,05$.

Resultados

1. Estudio de prevalencia de la RP en Gipuzkoa

Según los datos del Eustat a Enero del 2017 la población en Gipuzkoa era de 712.801 habitantes. En nuestra muestra tenemos 175 pacientes de 127 familias con diagnóstico genético de los cuales 7 pacientes sólo tienen diagnóstico genético (en el momento del estudio se encuentran asintomáticos y sin signos de RP), por lo tanto, la prevalencia de los pacientes con diagnóstico clínico (168 pacientes) es de 0,02356%, es decir, 1 paciente afecto de RP por cada 4244 personas en Gipuzkoa.

A continuación, mostramos en la tabla la prevalencia por grupos de edad:

Grupos de Edad	Población en Gipuzkoa	Pacientes con diagnóstico clínico	Prevalencia en Gipuzkoa
0-19 años	137.427 (19,3%)	8	0,00582 (1/17182)
20-64 años	421.496 (59,1%)	120	0,02847 (1/3512)
≥ 65 años	153.878 (21,6%)	40	0,02599 (1/3848)

Tabla 10. Prevalencia de RP en Gipuzkoa por grupos de edad.

La prevalencia de la RP no sindrómica en Gipuzkoa es de 139 pacientes en una población de 712.801 habitantes, es decir, una prevalencia de 0,0195% o de 1 paciente por cada 5128 personas en Gipuzkoa.

La prevalencia del Síndrome de Usher en Gipuzkoa es de 0,0021%, es decir, 1 paciente por 47.619 habitantes.

La prevalencia del Síndrome de Bardet Biedl es de 0,00084%, es decir, 1 paciente por 119.048 habitantes.

2. Características demográficas

Las características demográficas de los pacientes fueron las siguientes: el 47% de los pacientes eran varones y el 53% mujeres. La edad media de los pacientes sintomáticos estudiados es de 50 años (DE 16,4). La edad media de diagnóstico fue a los 29 años (DE

16,3), aunque el diagnóstico clínico varió desde el año de edad hasta los 70 años. A pesar de que los pacientes residían en Gipuzkoa en el momento del estudio, el origen de los pacientes difiere: el 34% de enfermos eran originarios de Gipuzkoa, seguidos del 12% de Navarra, 8,5% de Cáceres, 5,5% de Burgos y 4,3% de La Rioja. El resto de orígenes están detallados en los mapas de mutaciones.

3. Tipo de Herencia

A continuación, mostramos el porcentaje de los diferentes tipos de herencia según las 127 familias estudiadas (figura 28).

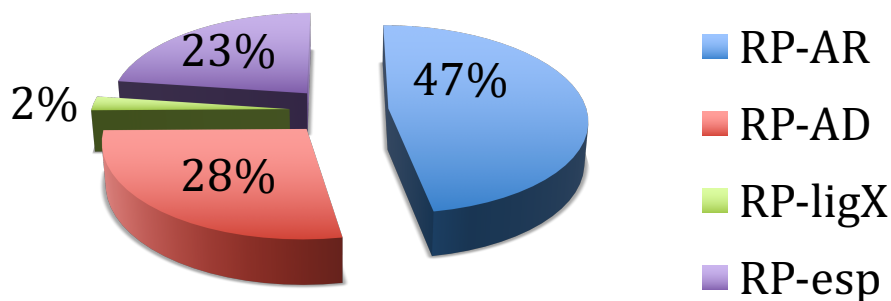


Figura 28. Porcentaje de tipo de herencia en las 127 familias estudiadas.

Si analizamos el tipo de herencia por pacientes, aumenta el porcentaje de pacientes con RPAD, debido a que en una misma familia hay más pacientes afectados (figura 29).

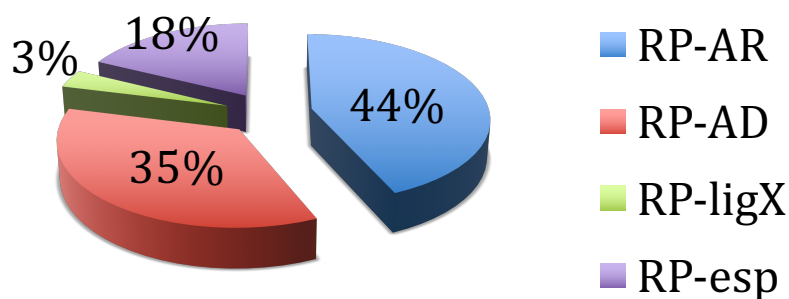


Figura 29. Porcentaje de tipo de herencia en los 175 pacientes estudiados.

3.1. Consanguinidad

De las 127 familias el 25,2% presentaba consanguinidad. Si dividimos por tipo de herencias:

- 43,3% de consanguinidad en RPAR.
- 14,2% de consanguinidad en RPAD
- 33,3% de consanguinidad en RPLX
- 0% de consanguinidad en RPesp

En los casos de RP Síndromica el 41,4% de las familias presentaba consanguinidad. De las 42 familias de origen guipuzcoano el 28,6% presentaban consanguinidad (12 familias).

3.2. RP síndromica

El porcentaje de RP síndromica de las 127 familias estudiadas ha sido del 18%. 29 pacientes presentaban RP síndromica divididos en 23 familias: 6 pacientes presentaban Sd. Usher tipo I, 9 pacientes Sd. Usher tipo II, 6 pacientes Sd. Bardet Biedl y 8 pacientes otros tipos de RP síndromica sin filiar. En el siguiente gráfico (figura 30) presentamos los diferentes tipos de RP síndromica hallados en nuestra muestra:

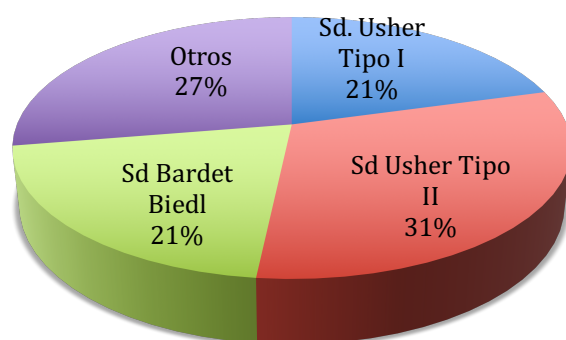


Figura 30. Porcentaje de las diferentes RP síndromicas en las formas síndromicas.

4. Resultados moleculares

De las 127 familias estudiadas, se han encontrado resultados moleculares en 58 familias (45,7% de las familias). En la siguiente tabla se muestra el número de familias que han obtenido resultado molecular con las diferentes técnicas empleadas dividido por grupos de tipo de herencia y las formas síndromicas (tabla 11). En algunas familias, diferentes técnicas han encontrado el mismo hallazgo molecular.

	RPAD	RPAR	RPLX	SD USHER	SD Bardet	TOTAL
	28	21	1	5 familias	Biedl	58
	familias	familias	familia		3 familias	familias
NGS (Ion Torrent e Illumina)	17	3	0	4	0	24 (41,4%)
HRM	8	9	1	1	3	22 (37,9%)
Arrays de ADN (Affymetrix)	2	5	0	2	0	9 (15,5%)
Informe externo	2	5	0	0	0	7 (12%)

Tabla 11. Resultados moleculares con las diferentes técnicas de secuenciado.

Los datos obtenidos mediante *arrays* de ADN se publicaron en la revista *Ophthalmic Research* en Mayo de 2016. Se muestran en la tabla 12 del artículo de nuestro grupo.¹⁸⁰

Patient No.	Gene	Disease	Change	ID	Inher.	Zygoty	MAF	Prediction	Reference
23, 31	AIP1	Cone-rod/LCA	p.Arg324Leu	rs150427474	ad/ar	Het.	0.01	Probably damaging	HGVS
4, 4B, 46	BBS1	BBS	p.Met390Arg	rs113624356	ar	Hom.	<0.01	Pathogenic	25
49	C8orf37	RP/cone-rod	p.Pro19Ala	rs36096184	ar	Hom.	0.03	Regulatory region	1,000 Gen.
32, 73	CERKL	RP/cone-rod	p.Arg283*	rs121909398	ar	Hom.	<0.01	Pathogenic	1,000 Gen.
61, 81, 82, 82M, 82S, 82SI	USH2A	Usher syndrome	p.Cys759Phe	rs80338902	ar	Hom.	<0.01	Pathogenic	24, 25

Tabla 12. Análisis realizado en 10 familias diagnosticadas de RP mediante *arrays* de ADN. Se detectaron variantes genéticas en 5 genes. ad = Autosómico dominante; ar = autosómico recesivo; Het. = heterocigoto; HGVS = Human Genome Variation Society; Hom. = homocigoto; ID = identificación de la variante por el número rs; Inher = herencia; LCA = amaurosis congénita de Leber; MAF = frecuencia del alelo menor; 1,000 Gen. = 1,000 Genomes Project.¹⁸⁰

Las mutaciones encontradas mediante HRM se publicaron en *Experimental Eye Research* en el 2013. Las variantes patogénicas se encuentran destacadas en negrita en la tabla del artículo (Tabla 13).⁶¹

Proband	Gene	Change	Id	Inheritance	Cigosity	MAF	Prediction	Reference
1	PDE6A	c.859-63A>G	rs11167487	ar	hom	0.330	Regulatory_region_variant	1000Genomes;HapMap
4	BBS1	p.Met390Arg	rs113624356	ar	hom	<-0.01	Pathogenic	Myktytn et al., 2002
4	MKKS	p.Gly532Val	rs1545	ar	het	0.170	Regulatory_region_variant	1000Genomes;HapMap
4	MKKS	p.Arg517Cys	rs1547	ar	het	na	Regulatory_region_variant	HGVS
4	MKKS		g.10393205T>A*	ar	het	na	Intronic variant	
7	PDE6A	c.1927-21C>G	rs75282782	ar	het	0.020	Intronic variant	HGVS
7	RHO	c.*43C>A	rs2071093	ad	het	0.080	UTR 3'	HGVS
7	RHO	c.937-23G>A	rs2071092	ad	het	0.100	Intronic variant	1000Genomes
8	PDE6A	c.2507-37T>A	rs10045293	ar	het	0.100	Regulatory_region_variant	1000Genomes;HapMap
8	PDE6A	c.859-63A>G	rs11167487	ar	hom	0.330	Regulatory_region_variant	1000Genomes;HapMap
8	PRPF31	c.322+115T>G	rs73062632	ad	het	0.090	Intronic variant	1000Genomes
9	RHO	c.937-1G>T	CS941542	ad	het	na	Splice region variant	Bell et al., 1994
9	RHO	c.*43C>A	rs2071093	ad	het	0.080	UTR 3'	HGVS
9	PRPF31	c.323-30C>G	rs35315983	ad	het	na	Intronic variant	HGVS
12	PDE6A	p.Asp123Tyr	rs147010346	ar	het	<-0.01	Probably damaging	1000Genomes
19	PRPH2	p.Gly266Asp	rs62645935	ad	het	na	Probably damaging	Schoeckel et al., 2001
20	PDE6A	c.-42C>T	rs113137904	ar	het	<-0.01	UTR 5'	HGVS
20	PRPF31	c.322+115T>G	rs73062632	ad	het	0.090	Intronic variant	HGVS
24	PDE6A	p.Tre418Met	g.149278949G>A*	ar	het	na	Probably damaging	SNPnexus
24	PRPF31	c.-39+14A>G	rs4806711	ad	het	0.210	Regulatory_region_variant	Rio Frio et al., 2009
24	PRPH2	c.*13C>T	rs361524	ad	het	na	UTR 3'	HGVS
25	CRB1	p.Thr126Met	rs28939720	ar	het	na	Pathogenic	Neveling et al., 2012
27	PDE6A	p.Gln492His	rs17711594	ar	het	0.010	Probably damaging	1000Genomes;HapMap
27	LRAT		g.155670099G>A*	ar	het	na	Intronic variant	
32	PDE6A		g.149247226T>C*	ar	het	na	Intronic variant	
32	PDE6A	c.2200-73G>A	rs72830272	ar	het	0.020	Intronic variant	dbSNP
38	BBS12	p.Ile39Thr	rs138036823	ar	het	<-0.01	Probably damaging	1000Genomes
38	BBS4	p.Ile354Thr	rs2277598	ar	het	0.450	Regulatory_region_variant	Hichri et al., 2005
39	USH3A	c.*1038G>A	rs201534956	ar	het	<-0.01	UTR 3'	HGVS
42	PRPF3	c.2877+25008T>C	rs150312839	ad	het	na	Intronic variant	HGVS
44	RHO	p.Gln28His	CM930649	ad	het	na	Pathogenic	Bunge et al., 1993
45	PDE6A	p.Ala262Thr	rs14898083	ar	het	<-0.01	Probably damaging	HGVS
45	RHO	p.Pro347Gln	rs29001566	ad	het	na	Pathogenic	Tam et al., 2004
45	RHO	c.*43C>A	rs2071093	ad	het	0.080	UTR 3'	HGVS
45	PRPH2	c.*13C>T	rs361524	ad	het	na	UTR 3'	HGVS
46	BBS1	Met390Arg	rs113624356	ar	hom	<-0.01	Pathogenic	Myktytn et al., 2002
46	BBS10	p.Pro539Leu	rs35676114	ad	het	0.040	Benign/tolerated	dbSNP
46	BBS9	p.Ala455Thr	rs11773504	ar	het	0.170	Benign/tolerated	HGVS
47	PDE6A	c.859-63A>G	rs11167487	ar	hom	0.330	Regulatory_region_variant	1000Genomes;HapMap
47	PDE6A	p.Hist655Tyr	rs78775072	ad	het	0.010	Benign/tolerated	HGVS
47	PRPF31	p.Met65Lys	rs145505952	ad	het	na	Benign/tolerated	HGVS
48	PRPF3		g.150316774G>C*	ad	het	na	Intronic variant	
54	PDE6A	p.Gln492His	rs17711594	ar	het	0.010	Probably damaging	1000Genomes;HapMap
54	PRPF3		g.150325383A>G*	ad	het	na	Intronic variant	
56	PDE6A	p.Val685Met	rs121909835	ar	hom	na	Probably damaging	Corton et al., 2010
56	PDE6A	p.Pro293Leu	rs114973968	ar	hom	<-0.01	Probably damaging	1000Genomes
57	PRPF3		g.150325383A>G*	ad	het	na	Intronic variant	
59	CRB1	c.820-8C>T	rs73071678	ar	het	0.010	Splice region variant	HGVS
59	ROM1	del2123C HET	g.62382123C>_*	ad	het	na	Frameshift/stop gain	SNPnexus
59	RHO	p.Ile321Leu	g.129252475A>C*	ad	het	na	Benign/Tolerated	SNPnexus
59	PDE6A	c.998+11C>T	rs75319698	ad	het	0.010	Intronic variant	HGVS
59	PDE6A	c.1066-57A>G	rs115072370	ar	het	0.030	Intronic variant	HGVS
61	MKKS	p.Gly532Val	rs1545	ar	het	0.170	Regulatory_region_variant	1000Genomes;HapMap
61	MKKS	p.Arg517Cys	rs1547	ar	het	na	Regulatory_region_variant	HGVS
61	MKKS		g.10393205T>A*	ar	het	na	Intronic variant	
61	BBS10	c.*769G>C	rs73383520	ar	het	0.090	UTR 3'	dbSNP
63	PDE6A	c.933-4C>T	rs12109444	ar	hom	0.010	Splice region variant	HGVS
63	PDE6A	c.859-63A>G	rs11167487	ar	het	0.330	Regulatory_region_variant	1000Genomes;HapMap
63	PDE6A	c.2136-17G>T	rs6864267	ad	het	0.090	Intronic variant	HGVS
64	BBS4	p.Ile354Thr	rs2277598	ar	het	0.450	Regulatory_region_variant	Hichri et al., 2005
64	BBS4	p.Lys46Arg	rs75295839	ar	het	<-0.01	Benign/Tolerated	HGVS
64	BBS9		g.33303848T>G*	ar	het	na	Intronic variant	
66	PDE6A	c.2507-37T>A	rs10045293	ar	het	0.100	Regulatory_region_variant	1000Genomes;HapMap
67	PRPF31	c.-39+14A>G	rs4806711	ad	hom	0.210	Regulatory_region_variant	Rio Frio et al., 2009
68	ROM1	del2123C HET	g.62382123C>_*	ad	het	na	Frameshift/stop gain	SNPnexus
68	PRPH2	c.-11A>C	rs114062933	ad	het	0.030	UTR 5'	HGVS
68	PRPF3	c.1760-12C>T	rs116427288	ad	het	na	Intronic variant	HGVS
68	PRPF3	c.*42C>T	rs77626125	ad	het	na	UTR 3'	HGVS
71	RHO	p.Val87Leu	g.129247835G>C*	ad	het	na	Probably damaging	SNPnexus
72	PDE6A	delCAGAGA	rs34656337	ar	hom	0.030	Probably damaging	HGVS
73	PRPF31	c.*231G>A	rs192573566	ad	het	<-0.01	UTR 3'	HGVS
76	BBS4	p.Ile354Thr	rs2277598	ar	het	0.450	Regulatory_region_variant	Hichri et al., 2005
76	BBS4	c.*608G>T	rs12898814	ar	het	0.120	UTR 3'	dbSNP
77	PRPF31	g.54619163G>T	ad	het	na	UTR 5'		
79	PDE6A	c.2507-37T>A	rs10045293	ar	het	0.100	Regulatory_region_variant	1000Genomes;HapMap
80	CRB1	p.Ile211Phe	g.197396943A>T*	ar	het	0.330	Benign/Tolerated	
80	USH3A		g.150690575->GACC*	ar	het	na	UTR 5'	
83	PDE6A	c.2507-37T>A	rs10045293	ar	het	0.100	Regulatory_region_variant	1000Genomes;HapMap
85	RHO	c.361+65C>T	rs192412661	ad	het	<-0.01	Intronic variant	HGVS
89	PRPF31	c.422-1G>A	CS044091	ad	het	na	Splice region variant	HGMD
92	PDE6A	c.933+4C>T	rs12109444	ar	het	0.010	Splice region variant	HGVS
92	PDE6A	c.859-63A>G	rs11167487	ar	het	0.330	Regulatory_region_variant	1000Genomes;HapMap
94	USH3A	c.-289G>A	rs55842922	ar	het	0.010	UTR 3'	HGVS
96	PRPF3		g.150325252->T*	ad	het	na	Intronic variant	
103	BBS12	p.Gly539Asp	g.123664663G>A*	ar	hom	na	Probably damaging	SNPnexus
103	BBS4	p.Ile354Thr	rs2277598	ar	hom	0.450	Regulatory_region_variant	Hichri et al., 2005
103	BBS4	c.1249-35G>C	rs117852179	ar	het	0.150	Intronic variant	HGVS
103	BBS2	p.Ile123Val	rs11373	ar	het	0.260	Benign/Tolerated	HGVS
105	PDE6A	c.-42C>T	rs113137904	ar	het	<-0.01	UTR 5'	HGVS
111	PDE6A	p.Gln492His	rs17711594	ar	het	0.010	Probably damaging	1000Genomes;HapMap
113	PRPH2	c.*13C>T	rs361524	ad	het	na	UTR 3'	HGVS

Tabla 13. Listado de variantes genéticas encontradas por análisis de HRM. Los asteriscos (*) indican nuevas variantes. En negrita están aquellas variantes probablemente implicadas en la patogénesis de la RP. Destacar que algunos casos tienen más de una variante. Sólo se muestran los cambios que afectan a las regiones de codificación. Abreviaturas: HapMap: International HapMap Project; HGVS: La Sociedad de Variación del Genoma Humano; HGMD: la base de datos de mutaciones génicas humanas; Id: identificación de la variante, por el número de rs cuando este es conocido o por la posición genómica cuando se desconoce; na: no disponible; MAF: frecuencia del alelo menor; 1000 genomas: el proyecto 1000 genomas.⁶¹

A continuación, se detallan los resultados moleculares según el tipo de herencia, en las formas sindrómicas y en los pacientes de origen guipuzcoano.

4.1. Resultados en familias RPAD

De las 35 familias que presentaban el árbol genealógico compatible con una herencia AD, se encontró la mutación en 28 familias, es decir, en un 80% de los casos. Las mutaciones en el gen RHO halladas en 9 familias han sido las más frecuentes, englobando el 36 % de las mutaciones encontradas en las pacientes con RPAD. El segundo gen en frecuencia ha sido el SNRP200, hallándose en 8 de las 28 familias (29%). Siete de las familias con mutaciones en el gen SNRP200 pertenecían a la misma población de origen (Torrecillas de la Tiesa), probablemente compartiendo un ancestro común. En el gen RHO 3 familias pertenecían a la misma población, Ziordia, y tras conocer la genética se vió que pertenecían a una misma familia. La tercera mutación más prevalente en nuestra muestra fue en el gen PRPF8 (10%), presentándose en 3 familias. El resto de mutaciones dominantes se encuentran en la figura 31 presentándose en 2 (7%), y una familia (3%) respectivamente. En la tabla 14 se muestra el tipo de mutación de cada gen, su frecuencia en las 28 familias de RPAD, la técnica empleada para su detección y la bibliografía correspondiente.

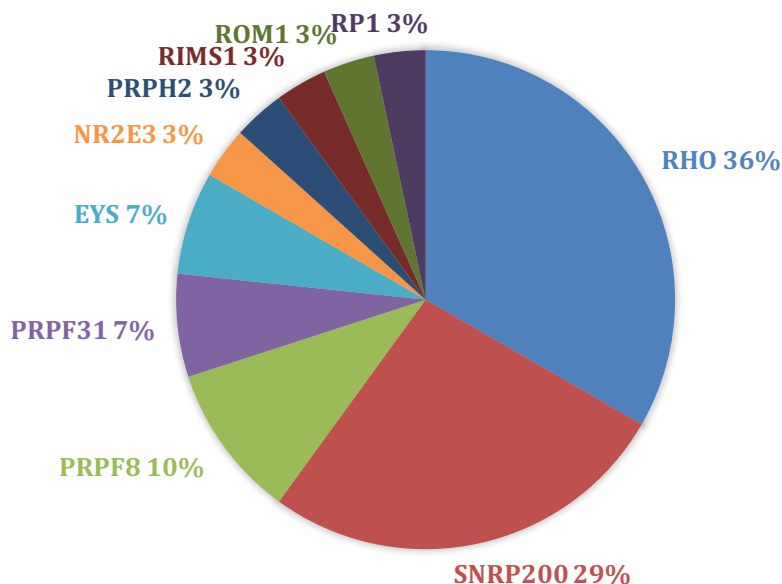


Figura 31. Porcentaje de genes mutados en las 28 familias con herencia dominante y mutación conocida.

Gen	Mutación	Tipo	Frecuencia(n=28)	Técnica	Referencia
RHO	NM_000539 c.937-1G>T	<i>Splice variant</i>	3 (10,7%)	HRM	Bell, C (1994) ¹⁹³
RHO	NM_000539 p.Gln28His c.84G>C	<i>Missense</i>	1 (3,6%)	HRM y NGS (Illumina)	Cooper, GM (2005) ¹⁹⁴
RHO	NM_000539 p.Pro347Gln c.1040C>A	<i>Missense</i>	1 (3,6%)	NGS (Illumina)	Corton, M (2010), Rio Frio, T (2009) ^{195,196}
RHO	NM_000539 p.Val87Leu c.259G>C	<i>Missense</i>	1 (3,6%)	HRM	Novel
RHO	NM_000539 p.Ter349Glu c.1045T>G	<i>Stop codon</i>	1 (3,6%)	NGS (Ion Torrent)	Hollingsworth, T (2013) ¹⁹⁷
RHO	NM_000539 p.Asp190Asn c.568G>A	<i>Missense</i>	1 (3,6%)	NGS (Ion Torrent)	Keen, T. J (1991) ¹⁹⁸
RHO*	NM_000539 p.Val104Asp c.311T>A	<i>Missense</i>	2 (7,1%)	NGS (Ion Torrent)	Novel
SNRNP 200	NM_014014 p.Ser1087Leu c.3260C>T	<i>Missense</i>	7 (25%)	NGS (Ion Torrent)	Zhao, C (2006), Zhao, C (2009) ^{199,200}
SNRNP 200	NM_014014 p.Thr654Asn c.1961C>A	<i>Missense</i>	1 (3,6%)	NGS (Ion Torrent)	Novel
PRPF8	NM_006445 p.Trp2279Gly c.6835T>G	<i>Missense</i>	1 (3,6%)	NGS (Ion Torrent)	Novel
PRPF8	NM_006445 p.Val2325_Glu2330del c.6974_6994del	<i>Deletion</i>	1 (3,6%)	NGS (Ion Torrent)	Novel
PRPF8	NM_006445 p.Leu2315Serfs*2336Aspext*21 c.6943delC	<i>Frameshift</i>	1 (3,6%)	NGS (Ion Torrent)	Novel
PRPF31	NM_015629 c.135-?_414+?dup	<i>Duplication</i>	1 (3,6%)	Externo (FJD)	de Castro-Miró, M (2016) ²⁰¹
PRPF31	NM_015629 c.422-1G>A	<i>Splice variant</i>	1 (3,6%)	HRM	Xia, K (2004) ²⁰²
EYS	NM_001142800 p.Ser2556Cys c.7666A>T	<i>Missense</i>	2 (7,1%)	Affymetrix	Audo, I (2010), Ayuso, C (2010) ^{203,204}
NR2E3**	NM_014249.3 p.Glu194Lys	<i>Missense</i>	1 (3,6%)	HRM	Habibi, I (2016) ²⁰⁵
PRPH2	NM_000322 p.Gly266Asp c.797G>A	<i>Missense</i>	1 (3,6%)	HRM	Sohocki, M (2001) ²⁰⁶
RIMS1	NM_014989 p.Phe1368Leu c.4555T>C	<i>Missense</i>	1 (3,6%)	NGS (Ion Torrent)	Robson, AG(2008) ²⁰⁷
ROM1	NM_000327 p.Gln290LysfsTer26 c.868delC	<i>Frameshift</i>	1 (3,6%)	HRM	Dryja, TP (1997), ²⁰⁸ Nishiguchi, Km (2012) ²⁰⁹
RP1	NM_006269 p.Gln686Ter c.2056C>T	<i>Stop codon</i>	1 (3,6%)	Externo (FJD)	Audo I, (2012) ²¹⁰

Tabla 14. Tipo de mutación de cada gen, su frecuencia en las 28 familias de RPAD, la técnica empleada para su detección y la bibliografía correspondiente.

* La mutación en el gen RHO p.Val104Asp se ha encontrado en 2 familias, en una de las cuales presentaba una segunda mutación patogénica en el gen RHO p.Asp190Asn.

** La mutación en el gen NR2E3 se ha encontrado en heterocigosis en una paciente con la mutación c.937-1G>T en el gen Rho. Este hallazgo puede explicar el inicio más precoz de la RP en este paciente respecto al resto de pacientes que sólo presentan la mutación c.937-1G>T.²¹¹

En cuanto al tipo de mutaciones encontrado en las familias RPAD, fue destacable el porcentaje elevado de mutaciones que afectan al corte y empalme o *splicing*,¹⁸⁵ que se encontró en un 57% de las familias (16 de 28 familias). Se encontraron principalmente mutaciones en genes que codifican para factores de la maquinaria del *splicing*, conocido como *spliceosoma* (SNRNP200, PRPF8 y PRPF31), pero también mutaciones en la región de *splicing* en el gen RHO (c.937-1G>T).

Todos los árboles genealógicos de los pacientes con mutaciones detectadas mediante NGS (Ion Torrent) se pueden consultar en el artículo de nuestro grupo de Ezquerria-Inchausti et al. en la información suplementaria.¹⁸⁵ A continuación, mostramos los árboles genealógicos de las dos familias con las mutaciones más prevalentes en los genes SNRNP200 y RHO (figura 32).

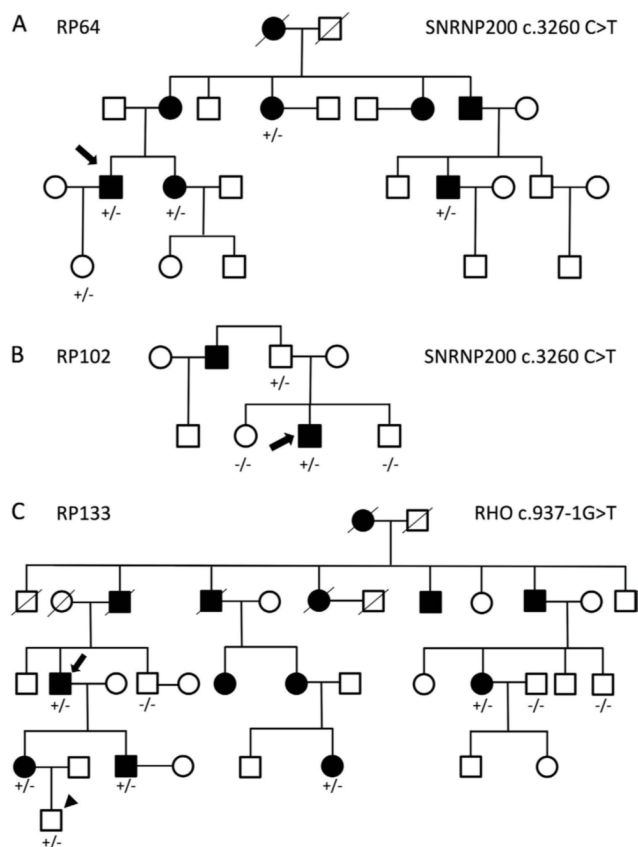


Figura 32. Árboles genealógicos representativos de las 2 mutaciones más prevalentes en los genes SNRNP200 y RHO. La mutación p.Ser1087Leu se encontró en las familias RP64 y RP102. La mutación c.937-1G>T en la región de *splicing* del gen RHO se encontró en 6 casos de la familia RP133, uno de los cuales se trata de un joven asintomático (punta de flecha). Los genotipos se han anotado como +/- (heterocigoto) o -/- (*wild type*). Las flechas indican los casos índices. Círculo indica mujer, cuadrado hombre y en negrita casos afectados.

4.2. Resultados en familias RPAR

De las 61 familias que se clasificaron como RPAR, se obtuvieron resultados moleculares en 29 familias (47,5%). La tabla 15 muestra el tipo de mutación y su frecuencia dentro de las mutaciones encontradas en las familias con RPAR, excluyendo las 8 familias con formas sindrómicas que se detallaran más adelante. Las mutaciones más frecuentes en la RPAR han sido en los genes CERKL (5 familias), USH2A (4 familias), PDE6A (2 familias) y CRB1 (2 familias).

La figura 33 muestra el porcentaje de los genes mutados hallados en las 21 familias con RPAR no sindrómica.

Gen	Mutación	Tipo	Frecuencia (n=21familias)	Técnica	REF
CERKL	NM_001030311 p.Arg283Ter c.847C>T	<i>Stop codon</i>	3 (14,3%)	Affymetrix	Coppieters, F (2014), ²¹² Tucson, M (2004) ²¹³
CERKL	NM_001030311 p. Arg257Ter c.769 C>T	<i>Stop codon</i>	2 (9,5%)	Externo (FJD)	Avila-Fernandez, A (2008), Tuson, M (2004) ^{213,214}
USH2A	NM_206933.2 p.Cys759Phe c.2276G>T	<i>Missense</i>	1,5(Heter comp) (7,1%)	NGS (Illumina) y AFFY	Bernal, S (2005), Rivolta, C (2000) ^{215,216}
USH2A	NM_206933.2 p.Tyr4031Ter c.12093C>T	<i>Stop codon</i>	0,5(Heter comp) (2,4%)	NGS (Illumina)	Yan, D (2009) ²¹⁷
USH2A	NM_206933.2 p.Tyr3747Ter c.11241T>C	<i>Stop codon</i>	0,5(Heter comp) (2,4%)	NGS (Illumina)	Nakanishi, H (2009), Baux, D (2014) ^{218,219}
USH2A	NM_206933.2 p.Asp1760Metfs*10 c.5278_5278delG	<i>Frameshift</i>	0,5(Heter comp)(2,4%)	NGS (Illumina)	Garcia-Garcia, G (2011) ⁹¹
USH2A	NM_206933.2 p.Glu767SerfsTer21 c.2299delG	<i>Frameshift</i>	0,5(Heter comp)(2,4%)	HRM	Aller, E (2010), Lenassi, E (2014) ^{220,221}
USH2A	NM_206933.2 p.Gln3587Ter c.10759C>T	<i>Stop codon</i>	0,5 (Heter comp)(2,4%)	Externo	Garci-Garcia, G (2011) ⁹¹
PDE6A	NM_000440 p.Val685Met c.2053G>A	<i>Missense</i>	0,5(Heter comp)(2,4%)	HRM	Corton, M (2010) ¹⁹⁵
PDE6A	NM_000440 p.Pro239Leu c.878C>T	<i>Missense</i>	0,5(Heter comp)(2,4%)	HRM	Corton, M (2010) ¹⁹⁵
PDE6A	NM_000440 c.1264-30_25delTCTCTG	<i>Deletion</i>	1 (4,8%)	HRM	Corton, M (2010) ¹⁹⁵

CRB1	NM_201253 p.Ther289Met c.866C>T	<i>Missense</i>	1 (4,8%)	Externo (FJD)	Vallespin, E (2007) ²²²
CRB1	NM_201253.2 p.Cys948Tyr c.2843G>A y p.Glu204del c.610_612del	<i>Missense y frameshift</i>	1 (4,8%)	Externo (EEUU)	Lotery, AJ (2001) ²²³
EYS	NM_001142800 p.Ser2556Cys c.7666A>T	<i>Missense</i>	1 (4,8%)	AFFY	Audo, I (2010), ²⁰³ Barragan, I (2010) ^{203,204}
NR2E3	NM_014249.3 p.Arg311Gln c.932G>A	<i>Missense</i>	1 (4,8%)	HRM	Gerber, S (2000), Sharon, D (2003), Escher, P (2009), Wright, AF (2004), Habibi, I (2016) ^{205,224- 227}
SEMA4A	NM_022367.3 p.Arg713Gln c.2138G>A	<i>Missense</i>	1 (4,8%)	HRM	Abid,A (2006) ²²⁸
RLBP1	NM_000326.4 p.Arg234Trp c.700C>T	<i>Missense</i>	1 (4,8%)	HRM	Burstedt, MS (1999) ²²⁹
RP1	NM_006269 p.Ser542Ter c.1625C>G	<i>Stop codon</i>	1 (4,8%)	Externo(FJD)	El Shamieh, S (2015) ²³⁰
ABCA4	NM_000350 p.Arg1108Cys c.3322C>T	<i>Missense</i>	1 (4,8%)	HRM	Fujinami, K (2013) ²³¹
TULP1	NM_003322 c.1495+1G>C	<i>Splice variant</i>	1 (4,8%)	HRM	Banerjee, P (1998) ²³²
ROM1	NM_000327 p.Gln290LysfsTer26 c.868delC	<i>Frameshift</i>	1 (4,8%)	HRM	Nishiguchi, KM (2012) ²⁰⁹

Tabla 15. Tipo de mutación de cada gen, su frecuencia en las 21 familias de RPAR, la técnica empleada para su detección y la bibliografía correspondiente.

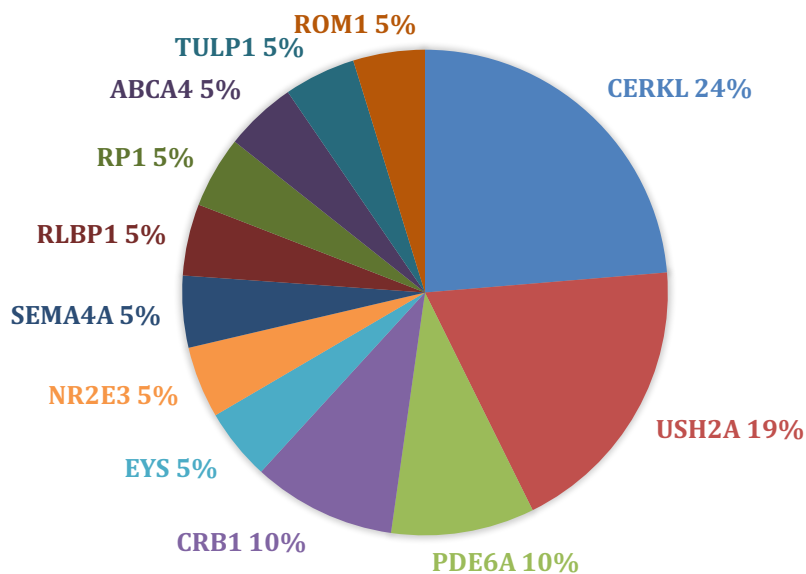


Figura 33. Porcentaje de genes mutados en las 21 familias con herencia recesiva y diagnóstico genético.

A continuación, mostramos el árbol de una de las familias con RPAR y mutación p.Arg283Ter en el gen CERKL. El gen mutado con más familias de RPAR en el presente estudio (Figura 34).

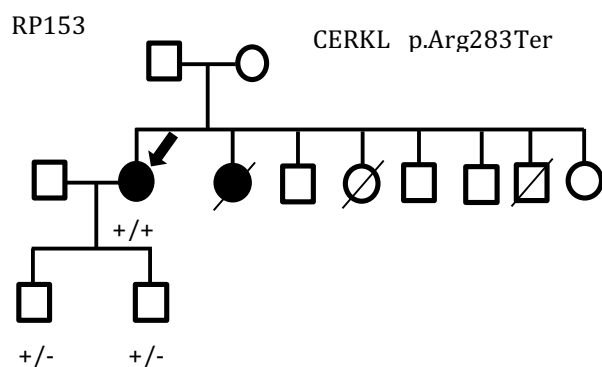


Figura 34: Árbol genealógico de la familia RP153, correspondiente a una de las familias RPAR con mutación p.Arg283Ter en el gen CERKL. Los círculos corresponden a mujeres y los cuadrados a hombres, en negro los casos afectados. La línea diagonal indica familiares fallecidos. Los genotipos se han anotado como +/- (heterocigoto) o +/+ (homocigoto). La flecha indica el caso índice.

4.3. Resultados en familias RPLX

En este estudio sólo 6 pacientes de 3 familias presentaron la forma de herencia recesiva ligada al cromosoma X (RPLX). Se detectó la mutación en una familia (33,3%), utilizando la técnica HRM. La mutación encontrada en el gen RP2 ha sido un cambio en hemicigosis: CS097280, c.1073-9T>A.²³³ En la figura 35 presentamos el árbol genealógico de esta familia.

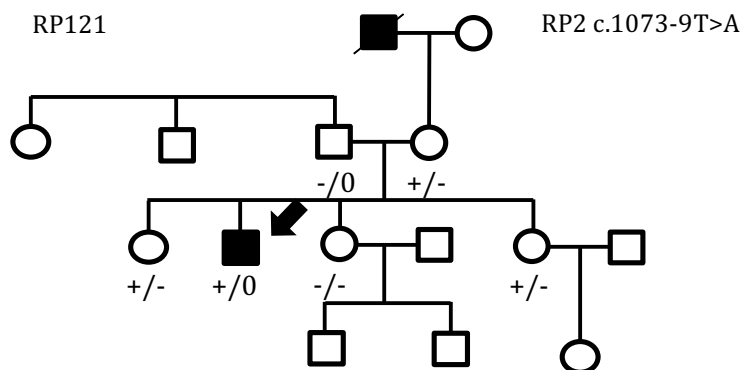


Figura 35. Árbol genealógico de familia con herencia recesiva ligada al cromosoma X (familia RP121 de nuestro estudio) con mutación en el gen RP2 (c.1073-9T>A). Los círculos corresponden a mujeres y los cuadrados a hombres, en negro los casos afectados. La flecha indica el caso índice. La línea diagonal indica los familiares fallecidos. Los genotipos se han anotado como +/- (heterocigoto), -/- (*wild type*) y +/0 (hemicigoto).

4.4. Resultados en familias RP esporádica

Treinta y un familias se clasificaron como casos esporádicos (casos de RP sin un patrón de transmisión genética evidente, a menudo como resultado de una nueva mutación). Estos pacientes no presentaban consanguinidad ni otros familiares afectados.

Sólo en una familia (3,2%) se ha encontrado la mutación responsable de la RP en el gen CERKL en homocigosis: p.Arg283Ter.^{213,214}

4.5. Resultados en RP sindrómica

4.5.1. Síndrome de Usher

De las 127 familias, 12 familias fueron diagnosticadas de Síndrome de Usher (9,5% de las familias). Seis pacientes de 5 familias (3,9% de las familias) fueron diagnosticados clínicamente de Sd. Usher tipo I y 9 pacientes de 7 familias (5,5% de las familias) de Sd. Usher tipo II. La prevalencia de Sd. Usher en Gipuzkoa es de 0,0021%, es decir 1 paciente por 47.619 habitantes.

De los 15 pacientes con diagnóstico clínico de Sd. Usher se encontró la mutación en 7 pacientes de 5 familias diferentes (el 41,6% de familias con Sd. Usher obtuvieron el diagnóstico genético). A continuación, mostramos las mutaciones encontradas en las 5 familias (tabla 16):

Gen mutado por familia	Mutación	Tipo	Técnica	REF
USH2A	NM_206933.2 p.Trp4464Ter c.13391G>A	<i>Stop codon</i>	NGS (Illumina)	Novel
USH2A	NM_206933.2 p.Cys759Phe c.2276G>T	<i>Missense</i>	NGS (Illumina) y Affy	Bernal, S (2005), Rivolta, C (2000) ^{215,216}
USH2A	NM_206933.2 p.Ala524Val c.1570G>A p.Cys3268Ter c.9804T>A	<i>Missense y Stop codon</i>	NGS (Illumina)	Novel
USH2A	NM_206933.2 p.Cys759Phe y p.Glu767SerfsTer21 c.2299delG	<i>Missense y frameshift</i>	NGS (Illumina) y Affy	Rivolta, C (2000) ²¹⁵
ROM1	NM_000327 p.Gln290LysfsTer26 c.868delC	<i>Frameshift</i>	HRM	Dryja, TP (1997) ²⁰⁸

Tabla 16. Tipo de mutación en las 5 familias de Sd. Usher, la técnica empleada para su detección y la bibliografía correspondiente.

En 2 pacientes se ha encontrado la mutación en heterocigosis compuesta y se ha demostrado la segregación familiar en cada caso.

También se han encontrado mutaciones en el gen USH2A en pacientes con RP sin pérdida auditiva en 4 familias (6,5% de familias RPAR), en 3 de ellas se ha encontrado la mutación p.Cys759Phe en heterocigosis compuesta. Tanto en EEUU como en España se ha observado esta mutación en un bajo porcentaje de familias con RPAR.²¹⁵ Sin embargo, aún queda por establecer si dicha mutación, al contrario que las demás encontradas en el gen

de la Usherina, provoca solamente RP sin afectación auditiva, o por el contrario los casos encontrados son en realidad Sd. Usher erróneamente diagnosticados como RP no sindrómicas.

De los 6 pacientes de 5 familias con diagnóstico clínico de Síndrome de Usher tipo I, se ha detectado una mutación en el gen ROM1 en 1 paciente.

En las siguientes tablas (tablas 17 y 18) mostramos las diferentes mutaciones encontradas en nuestra población en el gen USH2A y su frecuencia en las 4 familias con Sd. Usher y mutaciones en el gen USH2A y en las 8 familias con Sd. Usher y RPAR en su totalidad:

Mutación	Tipo	Cigosisidad	Frecuencia (n=4)
p.Trp4464Ter	<i>Stop codon</i>	Homocigosis	1 (25%)
p.Ala524Val	<i>Missense</i>	Heterocigosis comp	0,5 (12,5%)
p.Cys3268Ter	<i>Stop codon</i>	Heterocigosis comp	0,5 (12,5%)
p.Cys759Phe	<i>Missense</i>	Homoc(1), heter(1)	1,5 (37,5%)
p.Glu767SerfsTer21	<i>Frameshift</i>	Heterocigosis comp	0,5 (12,5%)

Tabla 17. Mutaciones encontradas en el gen USH2A en nuestra serie y su frecuencia en las 4 familias con Sd. Usher II.

Mutación	Tipo	Cigosisidad	Frecuencia (n=8)
p.Trp4464Ter	<i>Stop codon</i>	Homocigosis	1 (12,5%)
p.Ala524Val	<i>Missense</i>	Heterocigosis comp	0,5 (6,25%)
p.Cys3268Ter	<i>Stop codon</i>	Heterocigosis comp	0,5 (6,25%)
p.Tyr4031Ter	<i>Stop codon</i>	Heterocigosis comp	0,5 (6,25%)
p.Tyr3747Ter	<i>Stop codon</i>	Heterocigosis comp	0,5 (6,25%)
p.Cys759Phe	<i>Missense</i>	Homoc(2), heter(2)	3 (37,5%)
p.Asp1760Metfs*10	<i>Frameshift</i>	Heterocigosis comp	0,5 (6,25%)
p.Glu767SerfsTer21	<i>Frameshift</i>	Heterocigosis comp	1 (12,5%)
p.Gln3587Ter	<i>Stop codon</i>	Heterocigosis comp	0,5 (6,25%)

Tabla 18. Mutaciones encontradas en el gen USH2A en nuestra serie y su frecuencia en las 8 familias con RPAR y Sd. Usher II. En rosa, se marca la mutación más frecuente (p.Cys759Phe).

4.5.2. Síndrome de Bardet Biedl

Seis pacientes fueron diagnosticados de Síndrome de Bardet Biedl. La prevalencia de BBS en Gipuzkoa es de 0,00084%, es decir 1 paciente por 119.048 habitantes.

De los 6 pacientes con sospecha de Síndrome de Bardet Biedl, en 4 de ellos hemos conseguido identificar la mutación (el 66,6% de casos): 3 pacientes presentan la mutación en el gen BBS1 (p.Met390Arg), 2 de ellos eran hermanos y 1 paciente con la mutación en el gen BBS12 (p.Gly539Asp) (Tabla 19).

Gen	Mutación	Tipo	Frecuencia(n=3)	Técnica	REF
BBS1	NM_024649.4 p.Met390Arg c.1169T>G	Missense	2 (66,6%)	HRM	Mykytyn, K (2002) ²³⁴
BBS12	NM_001178007 p.Gly539Asp c.1616G>A	Missense	1 (33,3%)	HRM	Álvarez- Satta, M (2014) ²³⁵

Tabla 19. Tipo de mutación en las 3 familias de Sd. Bardet Biedl, la técnica empleada para su detección y la bibliografía correspondiente.

4.6. Resultados en familias de origen guipuzcoano

De las 127 familias estudiadas en Gipuzkoa, 42 familias tenían origen guipuzcoano (33% de las familias). Se ha encontrado la mutación causante de la enfermedad en 18 familias (43% de las familias guipuzcoanas). En la figura 36 se muestra la distribución del tipo de herencia en las 42 familias. De las 18 familias con resultado molecular positivo 14 familias presentaban un tipo de herencia recesiva y 4 familias presentaban una herencia dominante. Se detallan las mutaciones halladas en las familias guipuzcoanas en la siguiente tabla (tabla 20) y las gráficas muestran el porcentaje de cada mutación en las 18 familias y el porcentaje de cada mutación según el tipo de herencia (RPAR y RPAD) (figuras 37-39). No se encontraron mutaciones para el tipo de herencia recesivo ligado al cromosoma X. **Las mutaciones más frecuentes encontradas en nuestra región para las formas recesivas han sido mutaciones en los genes CERKL (29%), USH2A (22%) y CRB1 (14%). En las formas dominantes las mutaciones más frecuentes han sido en el gen PRPF8 (50%), RHO (25%) y PRPH2 (25%).** En las provincias adyacentes y por cercanía territorial, en Navarra, encontramos familias con mutaciones en el gen **RHO** (Ziordia, Goizueta y Pamplona), en Vizcaya (Sestao) una familia con la mutación en el gen

PRPF8 y 4 familias con mutaciones en el gen **USH2A** en Navarra (Echarri-Aranaz y Artajona), en Vizcaya (Sestao) y La Rioja (San Vicente de la Somosierra) respectivamente (Tabla 21).

Las formas de RP sindrómicas en familias de origen guipuzcoano corresponden a 3 familias con Síndrome de Usher, siendo la mutación **p.Cys759Phe** la más frecuente (también hallada en las familias con proximidad territorial de Sestao, Artajona y San Vicente de la Sonsierra). Dos familias presentaban el Síndrome de Bardet Biedl con mutaciones en el gen BBS1 y BBS12.

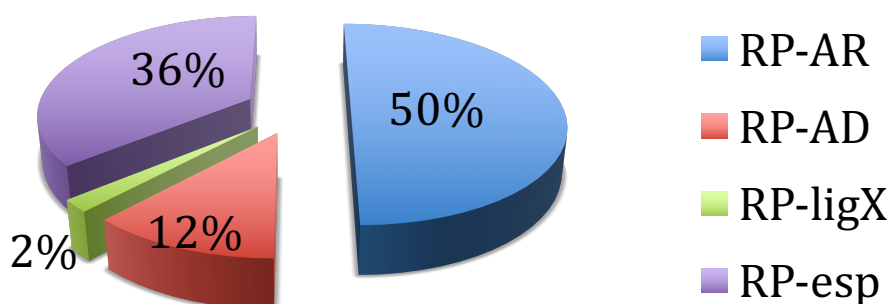


Figura 36. Porcentaje de tipo de herencia en las 42 familias de origen guipuzcoano.

Gen	Mutación	Tipo	Población	Herencia
CERKL	NM_001030311 p.Arg283Ter; c.847C>T	Stop codon	ALEGIA	RPAR
CERKL	NM_001030311 p.Arg283Ter; c.847C>T	Stop codon	ATAUN	RPAR
CERKL	NM_001030311 p. Arg257Ter; c.769 C>T	Stop codon	AYA	RPAR
CERKL	NM_001030311 p. Arg257Ter; c.769 C>T	Stop codon	LOIOLA	RPAR
UHS2A	NM_206933.2 p.Cys759Phe; c.2276G>T	Missense	LAZKAO	RPAR
USH2A	NM_206933.2 p.Cys759Phe; c.2276G>T y NM_206933.2 p.Asp1760Metfs*10; c.5278_5278delG	Missense y Frameshift	DONOSTIA	RPAR
UHS2A	NM_206933.2 p.Trp4464Ter: c.13391G>A	Stop codon	BERASTEGI	RPAR
PRPF8	NM_006445 p.Trp2279Gly; c.6835T>G	Missense	ELGOIBAR	RPAD
PRPF8	NM_006445 p.Val2325_Glu2330del; c.6974_6994del	Deletion	ERREZIL	RPAD
CRB1	NM_201253 p.Ther289Met; c.866C>T	Missense	LEGAZPIA	RPAR
CRB1	NM_201253.2 p.Cys948Tyr; c.2843G>A y p.Glu204del; c.610_612del	Missense y Frameshift	ELGOIBAR	RPAR
BBS1	NM_024649.4 p.Met390Arg; c.1169T>G	Missense	RENTERIA	RPAR
BBS12	NM_001178007 p.Gly539Asp; c.1616G>A	Missense	Zumaia	RPAR
RP1	NM_006269 p.Ser542Ter; c.1625C>G	Stop codon	ESKORIATZA	RPAR
TULP1	NM_003322 c.1495+1G>C	Splice variant	ZIZURKIL	RPAR
ABCA4	NM_000350 p.Arg1108Cys; c.3322C>T	Missense	ICIAR	RPAR
PRPH2	NM_000322 p.Gly266Asp; c.797G>A	Missense	ATAUN	RPAD
RHO	NM_000539 p.Val87Leu; c.259G>C	Missense	DONOSTIA	RPAD

Tabla 20. Mutaciones encontradas en las 18 familias de origen guipuzcoano y la población de origen de cada familia.

Gen	Mutación	Tipo	Población	Herencia
RHO,	NM_000539 C.937-1G>T	<i>Splice variant</i>	ZIORDIA (Navarra) 3familias	RPAD
RHO	NM_000539 p.Val104Asp; c.311T>A	<i>Missense</i>	GOIZUETA (Navarra)	RPAD
RHO	NM_000539 p.Val104Asp ; c.311T>A y p.Asp190Asn; c.568G>A	<i>Missense</i>	PAMPLONA (Navarra)	RPAD
PRPF8	NM_006445 p.Leu2315Serfs*2336Aspext*21 c.Val2325_Glu2330del	<i>Novel</i>	SESTAO	RPAD
USH2A	NM_206933.2 p.Cys759Phe; c.2276G>T y p.Glu767SerfsTer21; c.2299delG	<i>Missense y frameshift</i>	ARTAJONA (Navarra)	RPAR
USH2A	NM_206933.2 p.Cys759Phe; c.2276G>T y p.Glu767SerfsTer21; c.2299delG	<i>Missense y frameshift</i>	SAN VICENTE DE LA SONSIERRA (La Rioja)	RPAR
USH2A	NM_206933.2 p.Cys759Phe; c.2276G>T y p.Gln3587Ter; c.10759C>T	<i>Missense y Stop codon</i>	SESTAO (Vizcaya)	RPAR
USH2A	NM_206933.2 p.Ala524Val ; c.1570G>A y p.Cys3268Ter; c.9804T>A	<i>Missense y Stop codon</i>	ETXARRI-ARANAZ	RPAR

Tabla 21: Mutaciones en genes encontrados en los pacientes de origen guipuzcoano que coinciden por proximidad territorial en familiares no guipuzcoanos.

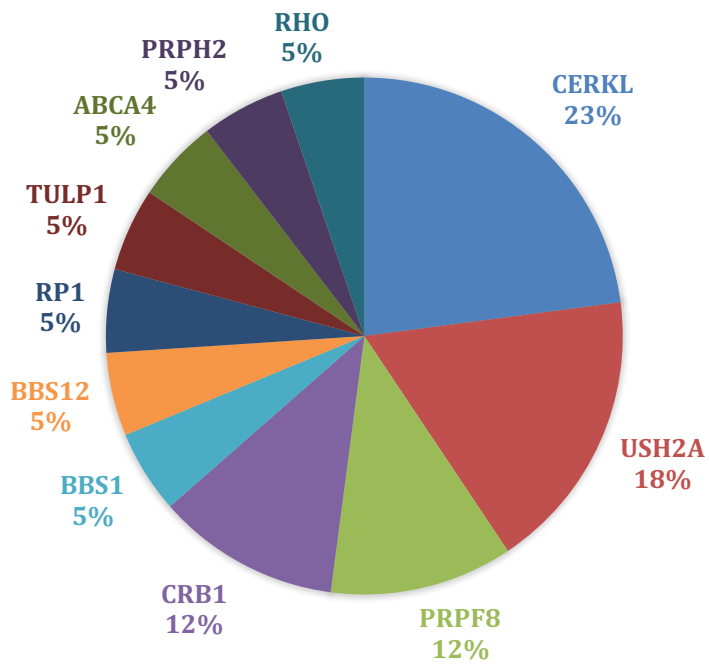


Figura 37. Porcentaje de mutaciones en las 18 familias guipuzcoanas con diagnóstico genético.

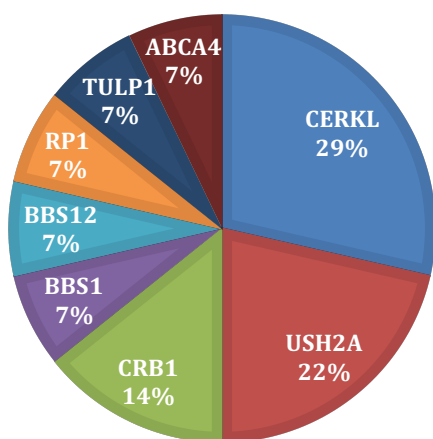


Figura 38. Porcentaje de genes mutados en las 14 familias de RPAR de origen guipuzcoano.

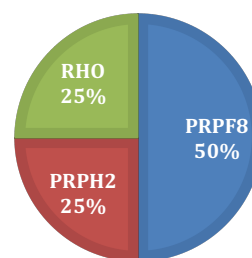


Figura 39. Porcentaje de genes mutados en las 4 familias de RPAD de origen guipuzcoano.

4.7. Mapa de mutaciones

A continuación, adjuntamos el mapa del origen de los genes mutados encontrados en nuestros pacientes. Observese que la mayoría de genes mutados procedían de España, siendo únicamente 3 familias de origen extranjero (figura 40).

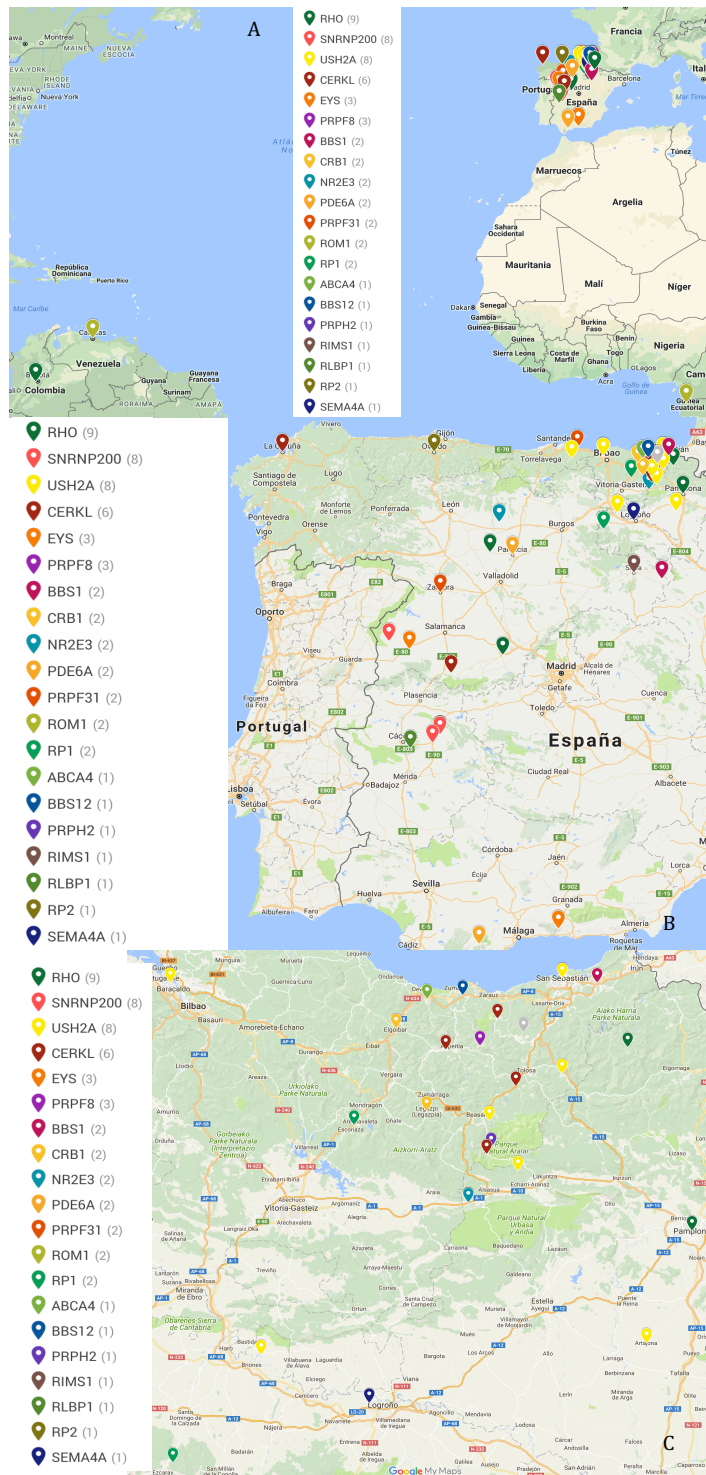


Figura 40. Mapa de origen de los genes mutados en nuestros pacientes. A: todos los genes mutados. B: genes asociados a familias españolas. C: genes asociados a familias gipuzcoanas y otras familias con proximidad geográfica.

5. Características clínicas de la RP en Gipuzkoa

De los 175 pacientes con diagnóstico genético, sólo 168 presentaron clínica y por lo tanto fueron diagnosticados de RP. Los 7 pacientes con diagnóstico exclusivamente genético puede que todavía no hayan desarrollado la enfermedad o que se trate de casos de penetrancia incompleta. De los 168 pacientes con diagnóstico clínico, 4 pacientes se excluyeron del estudio por no cumplir los criterios de inclusión al no poder asistir a la consulta o no acceder al estudio clínico. Por lo tanto, el estudio clínico esta basado en 164 pacientes.

5.1. Síntoma al diagnóstico y edad media de diagnóstico

El síntoma al diagnóstico más frecuente ha sido la nictalopía en un 50% de los pacientes, seguido de disminución de la agudeza visual en el 25% de pacientes y alteraciones en el campo visual en un 12% de los casos.

Es destacable que en el 7,3 % de los casos la enfermedad se diagnosticó de forma casual en consultas oftalmológicas rutinarias o tras realizar la consulta oftalmológica por otras razones, por ejemplo, el caso de un desprendimiento posterior de vítreo. Otro hallazgo interesante ha sido que un 2,4% de casos han sido diagnosticados tras el diagnóstico genético en el contexto del estudio genético del caso índice de la familia. En el estudio de las características clínicas no incluimos a los 7 pacientes (6,4% de la muestra) en los que el diagnóstico genético ha sido positivo pero no se ha podido realizar el diagnóstico clínico, debido a que todavía no han desarrollado la enfermedad o se trata de casos con penetrancia incompleta. Estos pacientes serán revisados rutinariamente en consulta de oftalmología para poder realizarles un diagnóstico precoz de RP.

La edad media al diagnóstico fue de 29 años, pero el rango de edad de diagnóstico fue desde 1 hasta los 70 años. Según el tipo de herencia la edad media al diagnóstico fue de 29 años en los pacientes con RPAD, 27 años en los pacientes con RPAR, 19 años en los pacientes con RPLX y 34 años en los pacientes con RPesp. Aunque se observa una tendencia al diagnóstico más precoz en las formas recesivas (RPAR y RPLX) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Buscando correlaciones con las mutaciones encontradas y la edad de inicio, hemos encontrado ciertos genes que se asocian a un **inicio más precoz** (diagnóstico <9 años): **CRB1, TUPL1, CERKL, RP1, RLBP1, PDE6A y BBS12**. Los genes asociados a **RP tardía** (diagnóstico >40años) han sido mutaciones en los genes **RHO, SNRP200 y RIMS1**, todas

ellas asociadas a formas dominantes. Tres pacientes con mutaciones en el gen RHO presentaban RP sectorial. Cabe destacar 2 pacientes con diagnóstico tardío y mutación en el gen USH2A p.Cys759Phe, la cual se asocia a fenotipos más leves de síndrome de Usher y a RPAR no sindrómica.

5.2. Agudeza visual y equivalente esférico

La agudeza visual (AV) media en LogMAR en el OD en los 164 pacientes fue de 1,18, puesto que la AV no sigue una distribución normal, se decidió calcular la mediana que fue de 0,3. Para el ojo izquierdo la media fue de 1,03 y la mediana de 0,4.

En la siguiente tabla distribuimos el porcentaje de pacientes en 3 diferentes grupos de AV en su totalidad y divididos según el tipo de herencia (tabla 22):

Agudeza visual (LogMAR)	% Total de pacientes (n=164)	% RPAD	% RPAR	% RPLX	%RP esp
≤ 0,3	57	77	43	33	61
0,31-0,99	16	6	19	17	26
≥ 1	27	17	38	50	13

Tabla 22. Agudeza visual. Porcentaje de AV por grupos de AV y por tipos de herencia.

Al correlacionar los grupos de AV con el tipo de herencia se han visto diferencias estadísticamente significativas (Chi-cuadrado de Pearson $p=0,001$). Los pacientes con RPAD mantienen buena agudeza visual a diferencia de los pacientes con RPLX y RPAR.

Para calcular el equivalente esférico en los pacientes se excluyeron los pacientes intervenidos de catarata. Se calculó la media del equivalente esférico en cada ojo en todos los pacientes y por grupos de herencia (tabla 23).

	Total de pacientes (n=164)	RPAD	RPAR	RPLX	RPesp
Equivalente esférico OD	-0,72	-0,05	-0,33	-4,6	-1,85
Equivalente esférico OI	-0,75	-0,25	-0,28	-5,04	-1,55

Tabla 23. Equivalente esférico medio en OD y OI en los pacientes estudiados y por tipos de herencia.

Con el test de ANOVA se han visto diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tipos de herencia. Existe una tendencia a la miopía leve en los grupos de RPAD, RPAR y RPes y miopía de -5EE en el grupo de RPLX.

Ciertas mutaciones han presentado una tendencia a la miopía como las mutaciones en el Sd. de Bardet Biedl, BBS1 y BBS12, la mutación en el gen SEMA4A y RP2.

También se ha detectado una tendencia a la miopía leve en los pacientes con mutaciones en el gen CERKL (EE medio de -1,0, rango de EE de 2,6 a -3,8 dioptrías y una mediana de -0,25 dioptrías) y en las familias con mutaciones en el gen SNRP200 (EE medio de -1,56 dioptrías). El gen CRB1 y PRPF8 se han asociado a hipermetropía aunque sólo se ha encontrado la mutación en 2 y 3 familias respectivamente.

5.3. Ceguera legal: CV y AV

El término ceguera sirve para definir la condición de deficiente visual. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la ceguera se da cuando la agudeza visual de ambos ojos, una vez corregidos, es igual o inferior a 0,3 (6/18 en la Escala de Wecker) o cuando se sobrepasa esa agudeza visual pero el campo visual es inferior a 20 grados (Koestler, 1976).²³⁶ En España, se considera ceguera si el índice de agudeza visual es de 0,1 (1/10 en la Escala de Wecker) o el campo visual es inferior a 10 grados.

En España, se reconocen como personas subsidiarias de prestaciones económicas y servicios educativos especiales (Orden de 8 de mayo 1979) a las personas ciegas, aquellas que tienen una agudeza visual de lejos menor de 20/200 (García Viso, 1992).²³⁷

La amplitud del campo visual para esta misma condición, tanto en España como en otros muchos países ha de ser igual o inferior a 10 grados.

Cualquier persona con nacionalidad española que tenga una **agudeza visual de lejos con corrección de 0,1 (1/10 en la Escala de Wecker), en el ojo de mejor visión, o un campo visual reducido a 10 grados o menos, puede afiliarse a la Organización Nacional de Ciegos Españoles, ONCE** según el artículo 8º, uno, de los Estatutos de la ONCE, aprobados según Resolución del 23 de noviembre de 1992 (BOE, de 25 de noviembre).

En nuestra muestra el 62% de pacientes a los que se les realizó el CV (86 pacientes) presentaban un $CV \leq 10^\circ$. Según el tipo de herencia, el porcentaje de $CV \leq 10^\circ$ fue el siguiente:

- RPAD: 52%
- RPAR: 71%
- RPLX: 100%
- RPesp: 56%

El porcentaje de pacientes con **ceguera legal** ($AV \geq 1$ y/o $CV \leq 10^\circ$) fue del **58%** (95 de los 164 pacientes). Según el tipo de herencia el porcentaje de ceguera legal fue (figura 41):

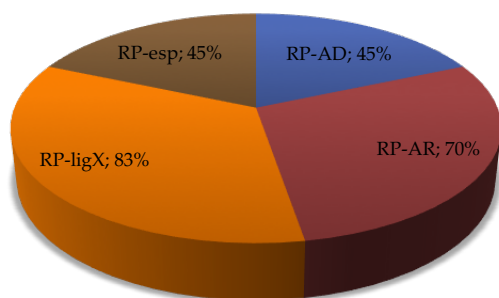


Figura 41. Porcentaje de ceguera legal según tipo de herencia.

De los 95 pacientes con ceguera legal el 25% corresponde a RP-AD, el 55% a RP-AR, el 5% a RP-ligX y el 15% a RP-esp. Siendo las diferencias estadísticamente significativas por la prueba de Chi-cuadrado de Pearson ($p=0,008$) (figura 42).

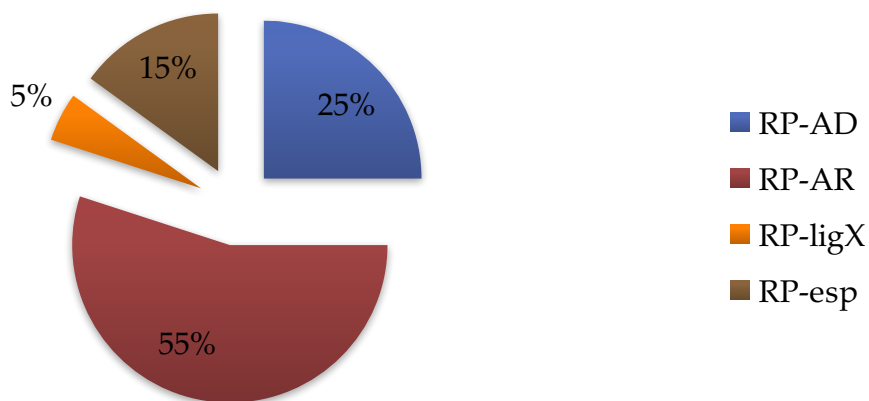


Figura 42. Porcentaje de tipos de herencia dentro de los pacientes con ceguera legal (95 pacientes).

5.4. Triada clásica

La triada clásica definida por palidez papilar, atenuación arteriolar y pigmento en forma de espículas óseas en media periferia se observó en 137 pacientes (83,5%). En 17 pacientes no se encontraron atenuación arteriolar ni palidez papilar (10,4%) y en 18 pacientes no se observaron espículas óseas en media periferia (10,9%).

5.5. RP sectorial

Nueve pacientes presentaron RP sectorial, 5 pacientes presentaron espículas óseas aisladas en la periferia nasal y 4 pacientes en la periferia inferior. En cuanto a las mutaciones encontradas, en 5 pacientes se hallaron mutaciones en el gen RHO, en 1 paciente en el gen SNRNP200 y 1 paciente presentó una mutación novel en el gen PRPF8. En 2 pacientes no se encontraron mutaciones. El 78% de nuestros pacientes con RP sectorial han sido diagnosticados genéticamente.

5.6. Complicaciones oculares

5.6.1. Catarata

El 62% de pacientes ha presentado catarata o estaba intervenido de catarata siendo pseudofáquicos o afáquicos. El 38% de pacientes presentaba cristalino transparente en el momento del estudio, lo cual no significa que no lo desarrollarán a lo largo de la enfermedad.

En la siguiente figura se muestran los porcentajes de catarata según el tipo de herencia. Las formas recesivas y esporádicas presentaban mayor porcentaje de catarata, pero el resultado no ha sido estadísticamente significativo (Chi-cuadrado de Pearson $p=0,13$) (figura 43).

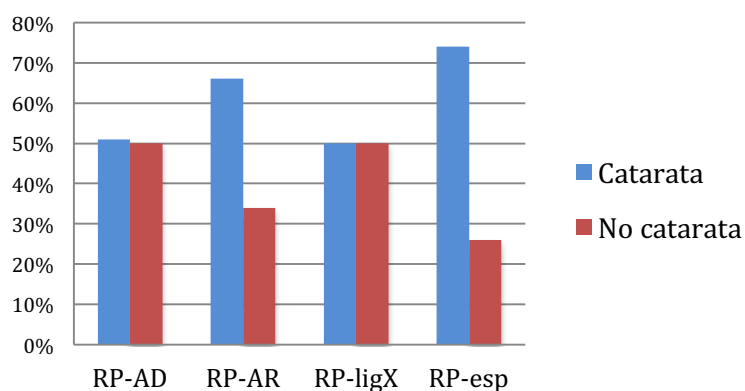


Figura 43. Porcentaje de catarata según tipo de herencia.

Ajustando los casos de catarata por grupos de edad (figura 44):

De 0 a 19 años ningún paciente presentó catarata, en el grupo de RPLX no tenemos pacientes para este grupo de edad.

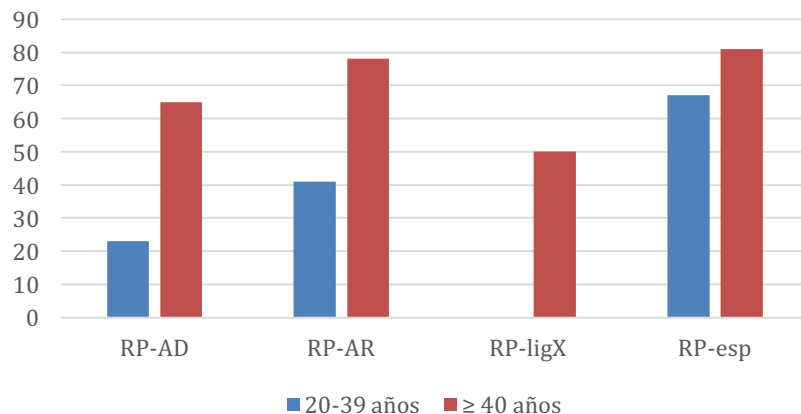


Figura 44. Porcentaje de catarata según la edad estratificado por tipo de herencia.

Según grupos de edad las diferencias han sido estadísticamente significativas como cabría esperar, excepto en el grupo de RPLX debido probablemente al tamaño muestral, sólo hay un paciente en el grupo de edad de 20-39 años. Se observa que la probabilidad de padecer catarata aumenta con la edad y en las herencias recesivas y esporádicas es más frecuente. A partir de los 40 años en todos los tipos de herencia se produce catarata en al menos el 50% de pacientes.

5.6.2. Presión intraocular y OCT CFN

La PIO media en ambos ojos fue de 14,9 mmHg. Nueve pacientes estaban en tratamiento antiglaucomatoso (5,5%).

El grosor de capas de fibras nerviosas mediante OCT se obtuvo en 99 pacientes (60%) para el OD y en 94 pacientes (57%) para el OI. En 57 pacientes se utilizó la OCT Stratus y en 44 pacientes la OCT Cirrus. En muchos pacientes con dificultades de fijación no se pudieron obtener medidas. El grosor medio de la capa de fibras nerviosas en AO medido con la OCT Stratus fue de 95,3 μm (OD: 94,6 μm y OI: 95,9 μm) y el grosor medio en AO con la OCT Cirrus fue de 92,3 μm (OD: 93,3 μm y OI: 91,3 μm).

5.6.3 Patología macular: MER, EM, OCT, Anillo hiperautofluorescencia.

De los 158 pacientes a los que se pudo realizar la OCT el 27,8% presentó **membrana epirretiniana (MER)** objetivada en la OCT en uno de los ojos, de los cuales el 27,3% correspondía a pacientes con RPAD, el 47,7% a RPAR, el 4,5% a RPLX y el 20,5% a RPesp.

Según el tipo de herencia el porcentaje de MER en cada grupo fue el siguiente:

- RP-AD: 23,5%
- RP-AR: 30%
- RP-ligX: 33,3%
- RP-esp: 29%

Las diferencias no han sido estadísticamente significativas calculado mediante la prueba de Chi-cuadrado de Pearson ($p=0,862$).

El 25,3% de pacientes estudiados presentaron **edema macular quístico (EMQ)** en uno de los ojos, de los cuales el 32,5% correspondía a RP-AD, el 35% RP-AR, el 5% a RPLX y el 27,5% a RPesp.

Según el tipo de herencia el porcentaje de EMQ en cada grupo fue el siguiente:

- RP-AD: 31,8%
- RP-AR: 44,6%
- RP-ligX: 3,8%
- RP-esp: 19,7%

Las diferencias no han sido estadísticamente significativas por la prueba de Chi-cuadrado de Pearson ($p=0,400$).

El 60% de pacientes con EMQ también presentó MER.

Al analizar por mutaciones, las siguientes mutaciones se asociaron a EMQ:

- RHO, SNRP200, RP1, USH2A (3 pacientes cada uno)
- PRPF8, PRPH2 (2 pacientes cada uno)
- CERKL, PRPF31, CRB1 (1 paciente cada uno)

El **grosor macular** medido por **OCT** lo dividimos en 2 grupos, dependiendo del tipo de OCT utilizada debido a cambios en la tecnología a lo largo del estudio, en algunos pacientes obtuvimos medidas con ambas tecnologías.

Con la OCT de dominio tiempo (OCT Stratus) se midió el grosor macular en 88 ojos: el grosor medio fue de 170,81 μm para el OD y 224,39 μm para el OI. La media de ambos ojos (AO) fue de 199,43 μm .

Con la OCT de dominio espectral (OCT Cirrus) se midió el grosor macular en 121 ojos: el grosor medio fue de 242,5 μm para el OD y 249,46 μm para el OI. La media de AO fue de 246 μm .

Por último, analizamos la **zona de elipsoides** de los 121 ojos estudiados con la OCT Cirrus y la dividimos en 3 estadios (Figura 45):

1. Estadio 1: zona de elipsoides no visible
2. Estadio 2: zona de elipsoides alterada
3. Estadio 3: zona de elipsoides normal

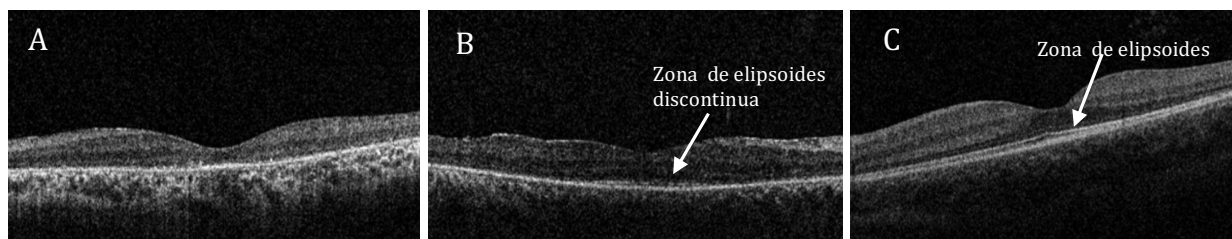


Figura 45. OCT en pacientes con RP. Estadios de zona de elipsoides. A: Estadio 1: zona de elipsoides no visible. B: Estadio 2: zona de elipsoides alterada. C: Estadio 3: zona de elipsoides normal.

En los pacientes con zona de elipsoides íntegra (estadio 3) se midió la longitud de ésta. Estudiamos la correlación entre la AV o el grosor macular y el estadio de la zona de elipsoides observado en OCT de dominio espectral (OCT Cirrus). También se estudió la correlación entre la longitud de la zona de elipsoides y la AV.

La zona de elipsoides no se detectó (estadio 1) en 37 ojos (30,6%), estaba alterada (estadio 2) en 22 ojos (18,18%) y fue normal (estadio 3) en 62 ojos (51,2%) (Tabla 24). La edad media y los grosores maculares medios en cada estadio de zona de elipsoides se recogen en la tabla 24.

Estadio	Número de ojos (%)	Edad (años)	AV (logMAR)	Grosor macular central (μm)
1	37 (30,6%)	51	1,3	189,9
2	22 (18,18%)	45	0,33	260,1
3	62 (51,2%)	41	0,13	274,4

Tabla 24. Número de ojos, edad, AV y grosor macular central en los subgrupos de zona de elipsoides.

Al comparar la edad con los estadios de la zona de elipsoides con el test de ANOVA las diferencias no fueron estadísticamente significativa ($p=0,1$). Al comparar la AV con los estadios de la zona de elipsoides se vieron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,001$, test ANOVA), es decir a mayor integridad de la zona de elipsoides mejor AV. El grosor macular central también varió entre los grupos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p<0,001$, test ANOVA), a mayor grosor macular mejor integridad de la zona de elipsoides.

La longitud media de la zona de elipsoides medida en el estadio 3 fue de 3,98mm y la zona de elipsoides se detectó en el *scan* completo en 19 ojos (15,7%) de los 121 ojos analizados. La correlación entre la longitud de la zona de elipsoides y la AV no resultó estadísticamente significativa ($r=-0,07$; $p=0,6$, test de correlación de Pearson) (figura 46).

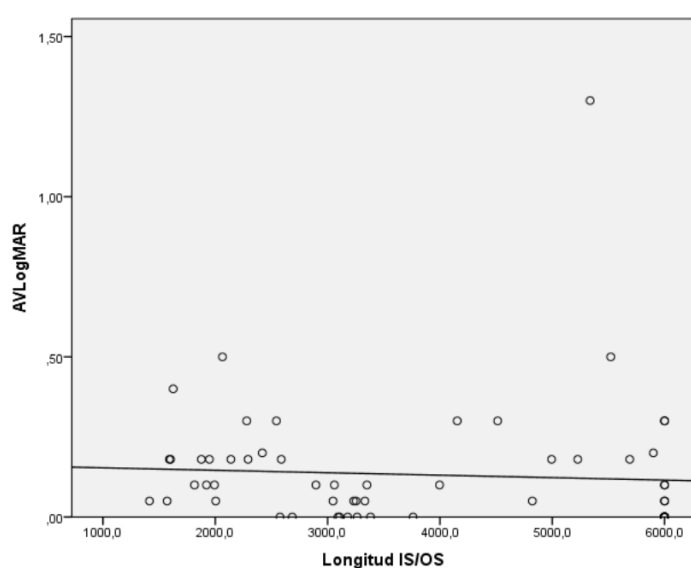


Figura 46. Gráfica de correlación entre la longitud de la línea IS/OS o zona de elipsoides y la agudeza visual en LogMAR (AVLogMAR). La correlación entre la longitud de la línea IS/OS y la agudeza visual no es estadísticamente significativa ($r=-0,07$; $p=0,6$, test de correlación de Pearson). La línea representa la regresión lineal.

Setenta y ocho pacientes accedieron a la realización de **autofluorescencia**. La presencia del anillo de hiperautofluorescencia descrito en pacientes con RP mediante autofluorescencia se objetivó en el 61,5% de los pacientes. En los pacientes con EMQ y/o MER (28 pacientes) el anillo de hiperautofluorescencia se encontró en el 75% de pacientes.

Según el tipo de herencia el anillo de hiperautofluorescencia se encontró en:

- RP-AD: 73,5% (25/34)
- RP-AR: 58,3% (14/24)
- RP-ligX: 100% (1/1)
- RP-esp: 42,1% (8/19)

Las diferencias no han sido estadísticamente significativas por la prueba de Chi-cuadrado de Pearson ($p=0,076$).

Las mutaciones asociadas al anillo de hiperautofluorescencia han sido las siguientes:

- ✚ RPAD: RHO (8 pacientes), SNRP200 (10 pacientes), PRPH2 (3 pacientes), PRPF31 (1 paciente), PRPF8 (1 paciente) y ROM1 (1 paciente).
- ✚ RPAR: USH2A (5 pacientes), CERKL (1 paciente), PDE6A (1 paciente), CRB1 (1 paciente) y BBS12 (1 paciente).
- ✚ RPLX: RP2 (1 paciente).

Los pacientes con el anillo de hiperautofluorescencia macular presentaban una AV media en LogMAR en ambos ojos de 0,3 y una mediana de 0,2.

5.6.4. Drusas papilares

Siete pacientes presentaron drusas papilares, un 4,3% del total de pacientes (figura 47). Según el tipo de herencia un 3,2% de los pacientes RPAD presentaron drusas del nervio óptico, un 2,6% en RPAR y un 9,7% en RPesp. No se encontraron drusas papilares en ningún paciente con RPLX. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tipos de herencia, probablemente debido al insuficiente tamaño muestral.

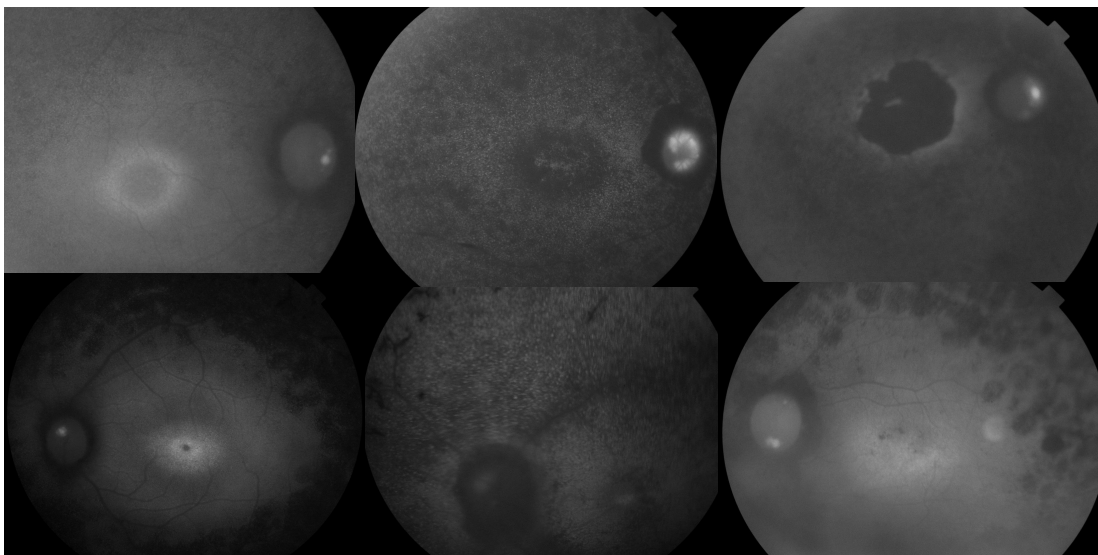


Figura 47. Drusas papilares en la autofluorescencia en 6 pacientes del estudio.

5.6.5. Test de colores

El test de colores se realizó a 111 pacientes (debido a la baja AV, muchos pacientes no realizaron la prueba), de ellos 20 presentaron alteración en el test de colores de Ishihara. Por tipos de herencia un paciente presentaba RPLX, 4 pacientes RPAD, 7 pacientes RPesp y 8 pacientes RPAR. Debido al pequeño tamaño muestral las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Se aprecia una tendencia a un mejor resultado en el test de colores en las formas dominantes.

En la tabla 25 se resumen las características clínicas de los pacientes con RP según los diferentes tipos de herencia.

	RPAD (53 pacientes)	RPAR (74 pacientes)	RPLX (6 pacientes)	RPesp (31 pacientes)	TOTAL (164 pacientes)
Edad media diagnóstico (años)	29	27	19	34	29
AV media OD LogMAR	0,64	1,49	2,12	1,11	1,18
Equivalente esférico OD	-0,05	-0,33	-4,60	-1,85	-0,72
Ceguera legal (%)	45%	70%	83%	45%	58%
Espículas óseas	94,3%	87,8%	83,3%	90,3%	89,1%
Palidez papilar	83%	94,6%	100%	93,5%	89,6%
Atenuación arteriolar	79,2%	95,9%	100%	96,8%	89,6%
Catarata/Afaquia/Pseudofaquia (%)	51%	66%	50%	74%	62%
PIO media AO (mmHg)	15,06	15	16,33	14,72	14,96
Presencia de MER (%)	27,3%	47,7%	4,5%	20,5%	27,8%
Presencia EMQ (%)	32,5%	35%	5%	27,5%	25,5%
Anillo hiperautofluorescente macular (%)	73,5%	58,3%	100%	42,1%	61,5%
Drusas papilares(%)	2,9%	8,3%	0%	15,8%	7,6%

Tabla 25. Características clínicas oftalmológicas de los pacientes según tipo de herencia y en total.

5.6.6. Otra patología ocular

En la siguiente tabla se recogen los porcentajes de otra patología ocular registrada en nuestros pacientes (Tabla 26).

Número de pacientes y %	OTRA PATOLOGIA OCULAR
19 (11,6%)	Atrofia macular
9 (5,5%)	Glaucoma
8 (4,8%)	Nistagmus
6 (3,6%)	Vitritis
5 (3%)	Atrofia peripapilar
5 (3%)	Miopia magna
3 (1,8%)	Catarata polar anterior
3 (1,8%)	Atrofia parcheada del polo posterior
2 (1,2%)	Drusas polo posterior
2 (1,2%)	Síndrome de tracción vitreomacular
2 (1,2%)	Vasos nasales exangües
2 (1,2%)	Ambliopia
2 (1,2%)	Pigmento en grumos
2 (1,2%)	Espículas óseas paravasculares
2 (1,2%)	Estafiloma posterior
1 (0,6%)	Foseta óptica
1 (0,6%)	Hialoides posterior engrosada
1 (0,6%)	Agujero macular
1 (0,6%)	Fibras de mielina
1 (0,6%)	Exotropia
1 (0,6%)	Sinquisis centelleante
1 (0,6%)	Telangiectasias en papila
1 (0,6%)	Esquisis foveal
1 (0,6%)	Desgarro retiniano
1 (0,6%)	Queratopatía bullosa
1 (0,6%)	Uveítis anterior aguda
1 (0,6%)	Cuerpo extraño intraocular
1 (0,6%)	Vitrectomía por EMQ
1 (0,6%)	Vitrectomía por MER
1 (0,6%)	Vitrectomía por desprendimiento de retina

Tabla 26. Otra patología ocular.

La patología ocular más frecuente descartando las cataratas y alteraciones maculares han sido la atrofia macular, el glaucoma y el nistagmus.

Los pacientes en los que se ha documentado **atrofia macular** presentaban las siguientes mutaciones: 5 pacientes mutaciones en el gen **CERKL**, 2 pacientes mutaciones en **EYS**, y un paciente para las mutaciones en los genes **RLBP1**, **TULP1**, **BBS1**, **ROM1**, **PRPF31**, **PDE6A**, **ABCA4** y **RP2**.

6. Correlaciones genotipo-fenotipo

Debido a la amplia heterogeneidad de la muestra en cuanto a mutaciones, se han realizado correlaciones genotipo-fenotipo de las mutaciones más frecuentes encontradas en las formas recesivas y dominantes y de aquellas mutaciones donde ya existen correlaciones previamente descritas y mutaciones que se asocian a fenotipos específicos y en las formas sindrómicas de RP.

6.1. Correlación genotipo-fenotipo RPAD: mutaciones en el gen RHO

Se han encontrado 9 familias y 17 pacientes con mutaciones en el gen **RHO**. Todos presentaban fenotipo leve, con edad de diagnóstico en la edad adulta y ninguno presentó ceguera legal excepto dos pacientes:

- Un paciente con la mutación **NR2E3** en heterocigosis además de la mutación **RHO** donde se adelantó la edad de inicio de la enfermedad a los 17 años, presentaba una **AV** menor que la mayoría de pacientes (0,18 y 1,3LogMAR respectivamente) y disminución concéntrica del **CV** respetando menos de 10° centrales.
- Un paciente con la mutación **p.Ter349Glu** presentó edad de inicio a los 12 años y **AVLogMAR** de 2 y 3 respectivamente.

En otro caso donde se han encontrado 2 mutaciones en el gen **RHO** (**p.Val104Asp** y **p.Asp190Asn**) y podría esperarse una forma más avanzada de la enfermedad, el fenotipo fue leve, con una forma de **RP sectorial**.

Cuatro pacientes presentaron **RP sectorial** (figura 48). Tres niños menores de 10 años fueron diagnosticados sólo genéticamente al realizar el estudio familiar. Habrá que realizar seguimiento en estos pacientes para un diagnóstico clínico precoz.

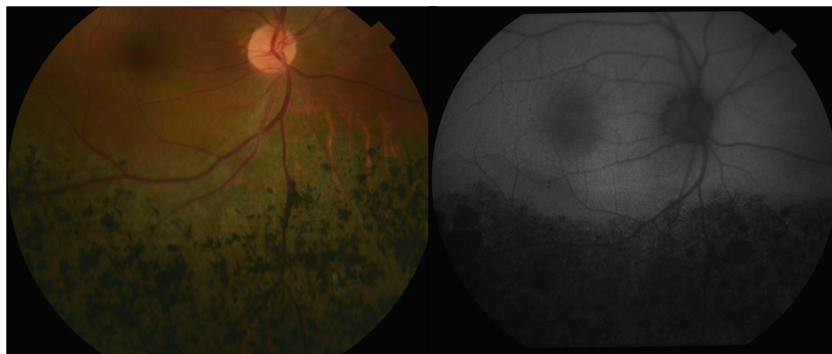


Figura 48. Retinografía y autofluorescencia en paciente con RP sectorial y mutación en gen RHO.

6.2. Correlación genotipo–fenotipo RPAR y RPesp: mutaciones en el gen CERKL

Se han encontrado 6 pacientes de 6 familias diferentes con mutaciones en el gen CERKL: 4 pacientes presentaban la mutación p.Arg283Ter y 2 pacientes la mutación p.Arg257Ter. Todos los pacientes presentaban un fenotipo característico con baja agudeza visual, atrofia macular, atrofia coriorretiniana parcheada y pigmento en media periferia en grumos (figura 49 y 50). La edad media, así como la mediana de edad al diagnóstico fue de 17 años. El síntoma al diagnóstico fue la disminución de AV en el 50% de los pacientes, seguido de nictalopía en el 33% de pacientes. El rango de AV de los pacientes comprendía desde bultos a amaurosis, dos pacientes presentaban nistagmus. En todos los pacientes se describió la atrofia macular en la retinografía y en la OCT (figura 49).

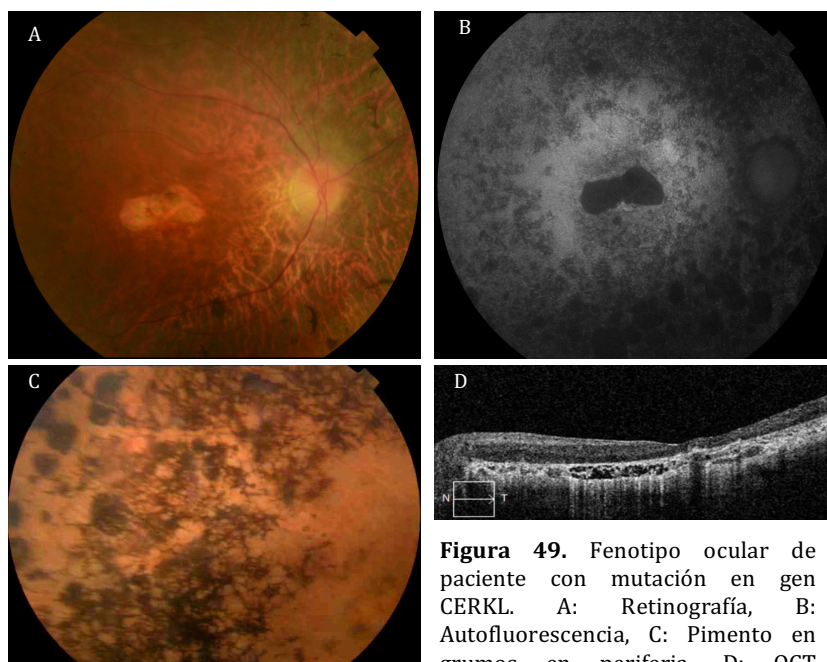


Figura 49. Fenotipo ocular de paciente con mutación en gen CERKL. A: Retinografía, B: Autofluorescencia, C: Pimento en grumos en periferia. D: OCT macular: atrofia retiniana.

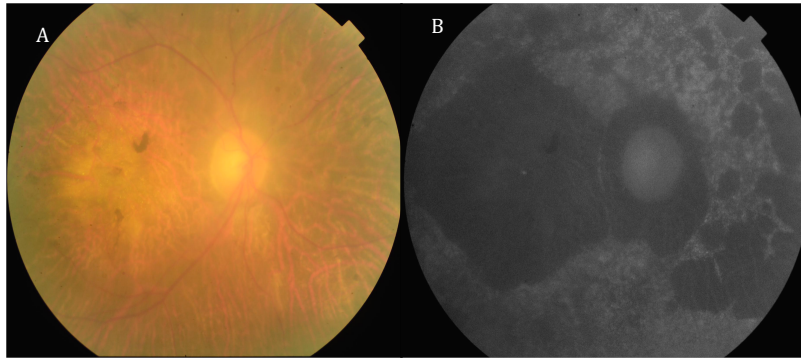


Figura 50. A: Retinografía de paciente con mutaciones en gen CERKL.
B: Autofluorescencia del mismo paciente, hipoautofluorescencia macular e hipoautofluorescencia parcheada en media periferia y peripapilar.

6.3. Correlación genotipo- fenotipo RPAR: mutaciones en el gen CRB1

Sólo se han encontrado 2 pacientes con mutaciones en el gen CRB1. Una paciente presentaba una forma precoz de RP (ACL) y su diagnóstico se realizó a los 5 años de edad. La segunda paciente se trata de una paciente con RPAR y diagnóstico a los 27 años. En cuanto al fondo de ojo presentaban la triada clásica y la paciente con el diagnóstico más tardío y mejor AV presentaba anillo de hiperautofluorescencia macular (figura 51).

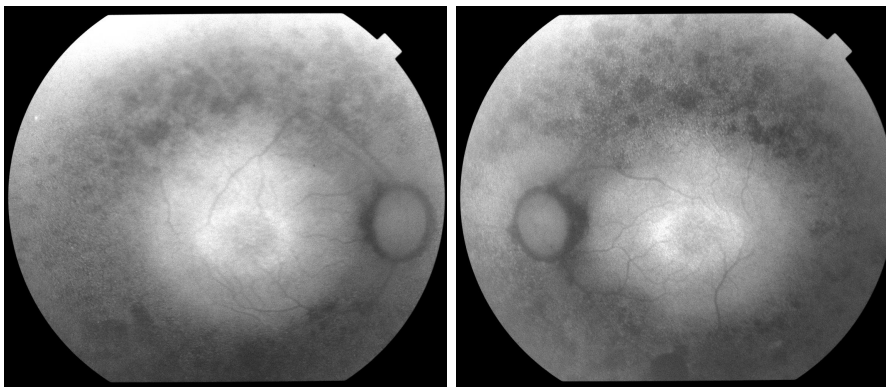


Figura 51. Autofluorescencia de paciente con mutación en el gen CRB1.
Anillo de hiperautofluorescencia macular e hipoautofluorescencia parcheada en media periferia.

6.4. Correlación genotipo-fenotipo RPAR: mutaciones en el gen TULP1

Un paciente presentaba la mutación en el gen TULP1. El paciente presentaba una forma precoz de RP con inicio a los 9 años y baja AV (AV de 3LogMAR). En el fondo de ojo se apreciaba la triada clásica de RP y atrofia macular (figura 52).

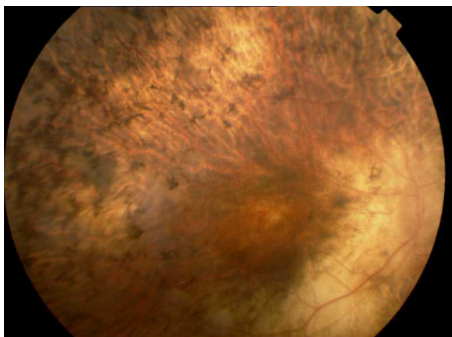


Figura 52. Retinografía en paciente con mutación en gen TULP1.

6.5. Correlación genotipo-fenotipo RPAR: mutaciones en el gen ABCA4

Un paciente presentaba la mutación en el gen ABCA4. La paciente tuvo un inicio de la enfermedad a los 17 años y baja AV en el momento del estudio (AV de 3LogMAR). En el fondo de ojo se apreciaba la triada clásica de RP y atrofia macular.

6.6. Correlación genotipo-fenotipo RPAR: mutaciones en el gen RLBP1

Un paciente presentaba la mutación p.Arg234Trp en el gen RLBP1, la cual se ha asociado a la distrofia de Bothnia. El paciente estudiado a los 65 años, se diagnosticó precozmente a los 3 años por disminución de AV. Su AV en el momento del estudio era de MM y PL respectivamente. En el fondo de ojo se apreciaba atrofia macular y atrofia parcheada paracentral y en periferia con pigmento en forma de espículas óseas y estrechamiento arteriolar (figura 53). No presentaba catarata subcapsular posterior.

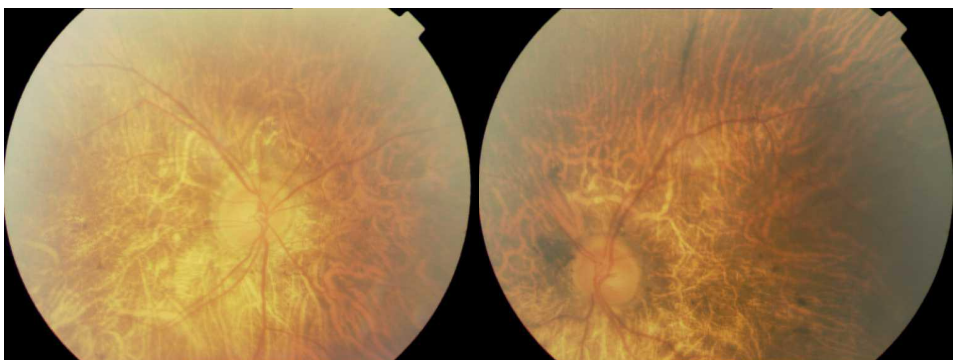


Figura 53. Retinografía de paciente con Síndrome de Bothnia.

6.7. Correlación genotipo-fenotipo RPLX: mutación en el gen RP2

Un único paciente presentó una mutación en el gen RP2 en hemicigosis (CS097280, c.1073-9T>A). La edad de diagnóstico del paciente fue a los 32 años, por nictalopía. El paciente presentaba ceguera legal y baja AV (AV LogMAR=1,0). Miopía de -8,5D. En el fondo de ojo destacaba una atrofia retiniana y visualización de los vasos coroideos (similar a la coroideremia), atrofia peripapilar y atrofia macular. En la AF se mostraba el anillo hiperautofluorescente macular (figura 54).

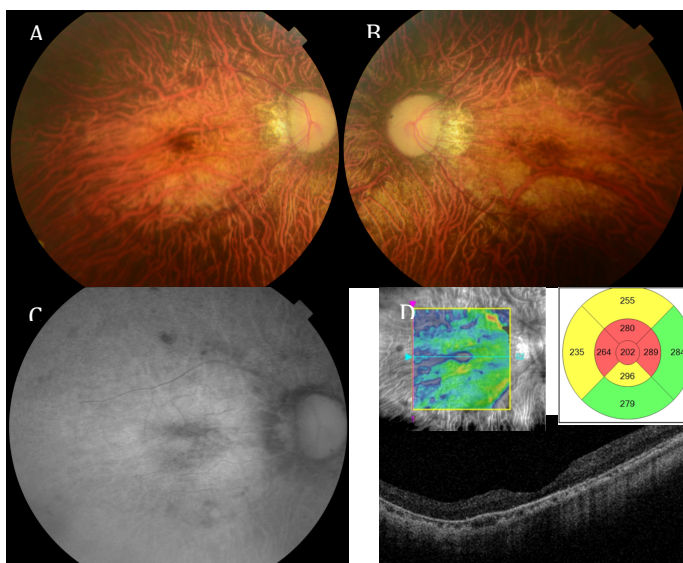


Figura 54. Fenotipo mutación RP2. A y B: retinografía con fondo de ojo con atrofia retiniana. C: autofluorescencia con hiperautofluorescencia macular. D: Atrofia macular en OCT.

6.8. Correlación genotipo-fenotipo Síndrome de Usher

En las siguientes tablas se resumen las características clínicas de los pacientes con Sd. Usher en nuestro estudio, tanto los 6 pacientes con Sd. Usher tipo I como los 9 pacientes con Sd. Usher tipo II (tabla 27-30).

	Media
Edad de inicio	12,5
AVLogMAR OD	1,97
AVLogMAR OI	1,01
Equivalente Esférico OD	-1,65
Equivalente Esférico OI	-1,84
Presión intraocular	14,33

Tabla 27. Resultados oftalmológicos en pacientes afectados de Síndrome de Usher Tipo I. Medias.

Porcentaje (%)	
Ceguera legal	100
Catarata SCP o PF	66,66 (4/6)
Triada clásica	100
Membrana epirretiniana	33,33 (2/6)
Edema macular	0
Discromatopsia	16,66 (1/6)
Audiometria alterada	100
Consanguinidad	16,66 (1/6)
Anillo Hiperautofluo macular	0 (0/1)
Drusas Nervio Optico	0

Tabla 28. Resultados oftalmológicos en pacientes afectados de Síndrome de Usher Tipo I. Porcentajes.

Media	
Edad de inicio	26,1
AVLogMAR OD	0,37
AVLogMAR OI	0,68
Equivalente Esférico OD	-0,82
Equivalente Esférico OI	-1,44
Presión intraocular (mmHg)	13,94

Tabla 29. Resultados oftalmológicos en pacientes afectados de Síndrome de Usher Tipo II. Medias.

Porcentaje (%)	
Ceguera legal	100 (9/9)
Catarata SCP o PF	55,55 (5/9)
Triada clásica	100 (9/9)
Membrana epirretiniana	28,57 (2/7)
Edema macular	28,57 (2/7)
Discromatopsia	33,33 (3/9)
Audiometria alterada	100 (9/9)
Consanguinidad	55,55 (5/9)
Anillo Hiperautofluo macular	60 (3/5)
Drusas Nervio Optico	0

Tabla 30. Resultados oftalmológicos en pacientes afectados de Síndrome de Usher Tipo II. Porcentajes.

En nuestro estudio debido al pequeño tamaño muestral de los pacientes con Síndrome de Usher no hemos podido encontrar diferencias estadísticamente significativas entre las características clínicas de los pacientes con Síndrome de Usher tipo I (USH1) y tipo II (USH2), a excepción de la edad de inicio de la enfermedad donde los pacientes con USH1 presentan un inicio más precoz. Existe una tendencia a una peor agudeza visual en los pacientes con USH1. Cabe destacar que el **100%** de los pacientes cumplen los criterios de **ceguera legal**.

La mutación más prevalente en el gen USH2A ha sido la mutación p.Cys759Phe hallada en 2 familias (2 pacientes) con Sd. Usher tipo II (en homocigosis y heterocigosis compuesta respectivamente) y en 3 familias (4 pacientes) con RPAR no sindrómica (en heterocigosis compuesta). En la tabla 31 se muestran las características oftalmológicas de los pacientes con la mutación p.Cys759Phe. No se encuentran diferencias entre el grupo de Sd.Usher II y RPAR. Tampoco existen diferencias con respecto al total de los pacientes con el Sd. Usher tipo II, aunque sí una tendencia a una edad de inicio más tardía en los pacientes con la mutación p.Cys759Phe.

	2 familias Sd. Usher II	3 familias RPAR
Edad de inicio (años)	39,5	40
AVLogMAR OD	0,2	0,2
AVLogMAR OI	0,2	0,3
Equivalente Esférico OD	0	-0,5
Equivalente Esférico OI	0	0
Presión intraocular (mmHg)	13	15
Ceguera legal	SI	75%
Catarata SCP o PF	SI	50%
Triada clásica	SI	75%
Membrana epirretiniana	50%	50%
Edema macular	50%	50%
Discromatopsia	50%	0%
Audiometría alterada	100%	0%
Consanguinidad	NO	NO
Anillo Hiperautofluo macular	NO, hiperautofluo macular.	25%
Drusas Nervio Optico	NO	NO

Tabla 31. Resultados oftalmológicos en pacientes afectados de Síndrome de Usher Tipo II y RPAR con la mutación p.Cys759Phe.

6.9. Correlación genotipo-fenotipo Síndrome de Bardet Biedl

Debido al pequeño tamaño muestral es difícil realizar correlaciones genotipo-fenotipo. Describimos los hallazgos clínicos de los pacientes a estudio en las siguientes tablas (tablas 32-34).

Signo clínico	Total de afectos (6)	BBS1 (3 pacientes)	BBS12 (1 paciente)
Distrofia retiniana	6	3	1
Obesidad	5	2	1
Polidactilia	6	3	1
Hipogonadismo	2	1	1
Retraso mental	5	2	1
Alteraciones renales	2	1	1
Consanguinidad	4	1	1

Tabla 32. Resultados clínicos en los pacientes afectados de Síndrome de Bardet-Biedl (BBS).

	Media	BBS1 (3 pacientes)	BBS12 (1 paciente)
Edad de inicio	26	28	2
Edad en el momento del estudio	35	39	24
AVLogMAR OD	0,83	1,26	1
AVLogMAR OI	0,83	1,26	1
Equivalente Esférico OD	-1,55	-2,6	-2,75
Equivalente Esférico OI	-2,12	-4	-1,87
Presión intraocular (mmHg)	16	16	16

Tabla 33. Resultados oftalmológicos en pacientes afectados de Síndrome de Bardet-Biedl (BBS). Medias.

	Porcentaje (%) del total de pacientes	BBS1 (3 pacientes)	BBS12 (1 paciente)
Ceguera legal	50 (3/6)	2/3	SI
Catarata SCP o PF	66,6 (4/6)	2/3	NO
Triada clásica	50 (3/6)	0/3	SI
Membrana epirretiniana	33,3 (2/6)	0/3	SI
Edema macular	16,6 (1/6)	NO	NO
Discromatopsia	25 (1/4)	1/2	No por baja vision
Audiometria alterada	16,6 (1/6)	0/3	NO
Consanguinidad	66,6 (4/6)	1/3	SI
Anillo Hiperautofluo macular	33,3 (1/3)	0/2	SI
Drusas Nervio Optico	16,6 (1/6)	0/3	SI

Tabla 34. Resultados oftalmológicos en pacientes afectos de Síndrome de Bardet-Biedl (BBS). Porcentajes.

En cuanto a la aparición de los primeros síntomas, en la gran mayoría de casos se registró una pérdida temprana de agudeza y campo visual, además de ceguera nocturna. El rango de edad para la aparición de esos síntomas fue de 2 a 34 años.

En los 6 pacientes diagnosticados de Sd. Bardet Biedl, la **distrofia retiniana y polidactilia** fueron los caracteres con mayor prevalencia, presentándose en el **100%** de los sujetos a estudio.

La triada clásica sólo se vió en la mitad de los casos, la mayoría de pacientes presentaban palidez papilar, atenuación arteriolar y alteración del EPR macular, sin espículas óseas (figura 55). La mitad de los pacientes cumple los criterios de ceguera legal y el 66% de pacientes presentó catarata en el momento del estudio. La paciente con la mutación en el gen BBS12 presentaba retraso mental más severo que los pacientes con mutaciones en el gen BBS1 y el síndrome completo. Además, es la única paciente que presentaba espículas óseas en el fondo de ojo y anillo de hiperautofluorescencia macular y drusas del nervio óptico. La edad de diagnóstico ha sido más precoz en la paciente con la mutación en el gen BBS12, en comparación con el grupo BBS1. No ha habido diferencias en cuanto a agudeza visual ni equivalente esférico entre ambos grupos. Ningún paciente presentó edema macular, y la paciente con la mutación en el gen BBS12 presentó membrana epirretiniana.

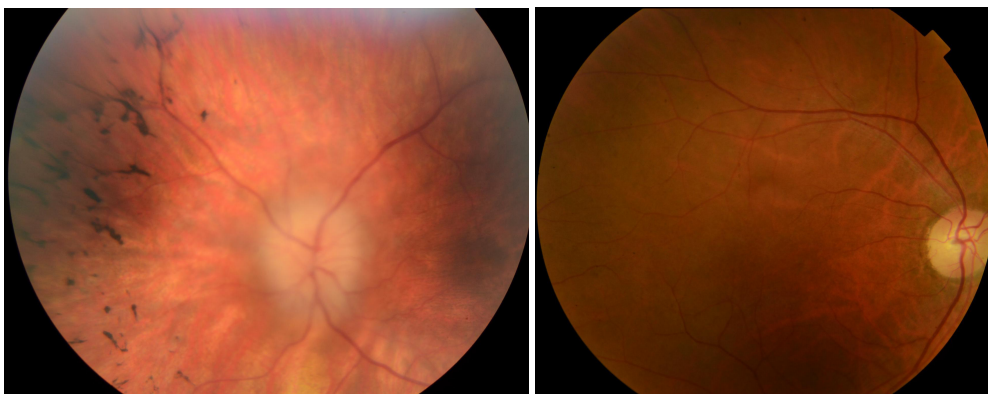


Figura 55. Retinografía en 2 pacientes con Sd. Bardet Biedl. La imagen izquierda corresponde a la paciente con la mutación en el gen BBS12, se aprecia la triada clásica de RP (atenuación arteriolar, palidez papilar y espículas óseas en media periferia). En la imagen derecha se observa atrofia retiniana con visualización de vasos coroideos, el paciente presenta la mutación en el gen BBS1.

7. Creación del registro

Al inicio del estudio se planteó como objetivo crear un registro de pacientes afectados de RP en Gipuzkoa mediante los datos obtenidos de la historia clínica a través de la hoja de Access y posteriormente a través de la historia clínica electrónica (Osabide Global). Se han trabajado todos los datos mediante el programa excel donde se han incluido los hallazgos moleculares. Así, hemos creado un registro en el Instituto Biodonostia en el programa Excel.

Pero en el año 2015 Osakidetza creó el registro de enfermedades raras, dentro de las cuales se encuentra la RP, y gracias a esta aplicación hemos podido integrar nuestros datos al registro general de Osakidetza de enfermedades raras.

Así, podemos encontrar los datos clínicos y moleculares de los pacientes estudiados mediante:

- La búsqueda en el Osabide Global por número de historia y/o nombre y apellidos del paciente.
- El registro de enfermedades raras de Osakidetza.

Los datos clínicos los encontraremos en los evolutivos del paciente. Los resultados de genética, pruebas complementarias y hoja de access se encuentran escaneados en el apartado de últimas actividades del Osabide Global.

Discusión

1. Prevalencia de la RP en Gipuzkoa

El presente trabajo se trata del primer estudio epidemiológico clínico y molecular de la RP en Gipuzkoa y ha sido de especial importancia para crear un registro de pacientes. Para el estudio de prevalencia del total de 175 pacientes con diagnóstico genético y/o clínico, se excluyeron aquellos pacientes que sólo presentaban diagnóstico genético sin confirmación clínica. Debido a la edad de los pacientes puede ser que todavía no hayan desarrollado signos de la enfermedad o que exista penetrancia incompleta y no desarrollen la enfermedad en el futuro. La prevalencia ha sido de 1/4244 personas en Gipuzkoa, la cual se asemeja a diferentes estudios de diferentes poblaciones (tabla 35):

Población (ref)	Prevalencia RP Total
Ciudad de Birmingham ²⁰	1/4.869
China ^{4,12}	1/3.784 y 1/4.000
Sur de India ^{8*}	1/930 y 1/372
Slovenia ¹⁸	1/6.023
Maine (EEUU) ²	1/4.756
Dinamarca ²⁵	1/3.454
Korea ²³⁸	1/9.000
Gipuzkoa (presente estudio)	1/4244

Tabla 35. Prevalencia de RP en diferentes poblaciones. *Población con alta frecuencia de matrimonios consanguíneos.

En nuestro estudio encontramos una prevalencia de 1/5.128 en los pacientes con RP no sindrómica. La prevalencia de RP no sindrómica en otros estudios es similar a la encontrada en otras poblaciones, excepto la población judía donde la prevalencia es mayor (tabla 36).

Población (ref)	Prevalencia RP no sintomática
Jerusalem ²³⁹	1/2.086 (Arabes musulmanes 1/1.798 y Judíos 1/2.230)
Noruega ⁵	1/4.440
Maine (EEUU) ²	1/5.193
Dinamarca ²⁵	1/6.477
Gipuzkoa (2017)	1/5.128

Tabla 36. Prevalencia de RP no sintomática en diferentes poblaciones.

La prevalencia total puede estar sesgada al fijarnos en la prevalencia por grupos de edad. Vemos que la prevalencia en el grupo de edad de 0 a 19 años es significativamente más baja, esto será debido a que la RP muchas veces se diagnostica a edades más avanzadas y todavía ese grupo de edad no la ha desarrollado. Lo mismo ocurre con la prevalencia a partir de los 65 años, esta disminución menos acusada de la prevalencia puede ser debido a que los pacientes no han sido registrados debido a que no acuden al oftalmólogo y es más fácil que se hayan perdido en el reclutamiento de pacientes. Por lo tanto, la prevalencia en el grupo de edad más numeroso nos da la prevalencia más exacta. En nuestro estudio el grupo más numeroso se encuentra en la edad comprendida entre los 20 y 64 años y muestra una prevalencia de 1/3512. Esta misma tendencia la observaron Bunday et al.²⁰ en el estudio de prevalencia llevado a cabo en la ciudad de Birmingham.

La prevalencia total también se asemeja a la prevalencia en China. En China en 1979 se estableció la sección de genética oftalmológica por la Sociedad de Genética China. Desde entonces, han investigado la prevalencia de las distrofias retinianas. En 1987 publicaron los datos de prevalencia a partir de una muestra de 700.000 chinos.⁴ Más adelante, se realizó un estudio poblacional en China de 692.323 personas (The Beijing Eye Public Health Care Project), diseñado para realizar el cribado de todos los habitantes de 55-85 años de medios rurales del municipio de Beijing.¹² Tras una formación, 2.500 técnicos en oftalmología fueron a todas las casas de los pueblos y entrevistaron y tomaron la agudeza visual de los habitantes. Se derivó a todos los pacientes con agudezas visuales <0,3 en un ojo a su centro de atención primaria donde se les realizaron retinografías y posteriormente fueron evaluadas en centros de referencia. Los resultados de este estudio de prevalencia son importantes debido al tamaño muestral, pero pueden estar subestimados algunos casos puesto que se excluyen aquellos pacientes con AV > de 0,3 y los pacientes menores de 55 años. En un estudio previo de Grover et al. (1999),¹⁷⁶ 256 (44,8%) de los 572 pacientes con RP y mayores de 55 años tenían agudezas visuales \geq

20/40. En nuestro estudio 103 (61,3%) pacientes eran menores de 55 años y 82 (48,8%) pacientes presentaban agudezas visuales > de 0,3. En el estudio de Bunday et al. destacan la importancia de la confirmación diagnóstica de RP, puesto que el 17,5% de pacientes referidos para el estudio, padecían otra enfermedad oftalmológica distinta a RP.²⁰ Por eso, creen que para los estudios de prevalencia se debería examinar a los pacientes con una exploración oftalmológica completa como en nuestro estudio y no basarse sólo en cuestionarios. En nuestro estudio se excluyeron pacientes que no cumplieran los criterios de inclusión, así, se excluyeron pacientes con diagnóstico erróneo de RP.

La prevalencia de la RP no sindrómica en el estudio de Jerusalem mostró una diferencia entre los musulmanes y judíos, debido a una mayor tendencia a los matrimonios consanguíneos en la población árabe musulmana.²³⁹

Na et al. han publicado recientemente en el 2017 el primer estudio epidemiológico nacional sobre RP englobando a la población entera coreana de todas las edades.²³⁸ La prevalencia es de 1/9000 para la población total y de 1/6000 para los mayores de 40 años. Utilizaron los datos del registro nacional de enfermedades raras comprendidos entre el año 2011 y 2014, que incluye información sobre todos los pacientes diagnosticados de RP basados en unos criterios diagnósticos predefinidos. En 2006 el gobierno coreano introdujo el registro de enfermedades raras, los criterios diagnósticos fueron nictalopía, disminución del campo visual, hallazgos típicos en el fondo de ojo (triada clásica) y disfunción de fotorreceptores evidenciado mediante ERG. La prevalencia en este estudio puede estar subestimada porque puede que no se hayan detectado los pacientes asintomáticos o aquellos que no tienen acceso al sistema sanitario. Comparándolo con otros estudios, la mayoría incluyen prevalencias basadas en muestras de menos de 100.00 personas.^{8,11,12} En estos estudios al incluir 1 o 2 pacientes más puede cambiar substancialmente la prevalencia, lo que dificulta la precisión de la estimación. El estudio de Corea esta basado en una población de 50 millones de personas, la población más amplia estudiada en RP a día de hoy, por lo tanto, el riesgo de sesgo será menor. Una de las limitaciones del estudio fue que no obtuvieron datos sobre información genética y no se pudieron realizar análisis basados en el tipo de herencia.

2. Características demográficas

En nuestro estudio el 47% de pacientes eran varones y el 53% mujeres, según diferentes autores cabría esperar un mayor porcentaje de varones debido a la forma de herencia

recesiva ligada al sexo,^{13,17} pero en nuestra serie debido a que sólo hay 6 pacientes con RPLX, no hemos visto esa diferencia entre sexos.

Respecto a la edad media de diagnóstico, en nuestro estudio fue de 29 años, el cual dista mucho de la edad media encontrada en la población coreana de 44,8 años.²³⁸ Esto puede ser debido a que en Gipuzkoa existe una cobertura universal de la sanidad y no es necesario acudir a centros terciarios para ser examinados por oftalmólogos. Esto puede que haya influido en la obtención de un diagnóstico más precoz en nuestra población.

3. Tipo de herencia

La clasificación genética de la RP puede ser difícil, puesto que hay un elevado número de casos esporádicos, penetrancia incompleta y una variabilidad considerable en la expresión. Otro de los problemas es el elevado número de mujeres portadoras afectas en la herencia recesiva ligada al cromosoma X.¹⁷⁹ Además, la forma de clasificar el tipo de herencia también puede variar los resultados en diferentes estudios.¹⁷⁹ En nuestro estudio, se decidió utilizar la clasificación del grupo español liderado por la Dra. Carmen Ayuso.²²

Respecto al tipo de herencia, si estudiamos las 127 familias, las formas recesivas (RPAR) son las más numerosas (47%), seguidas de las formas dominantes (28%) y casos esporádicos (23%). Sólo un 2% de familias presentaban las formas recesivas ligadas al cromosoma X (RPLX). Como cabe esperar, al analizar el tipo de herencia por pacientes, aumenta el porcentaje de pacientes con RPAR (35%), debido a que en una misma familia hay más pacientes afectados. El porcentaje no varía mucho respecto a los casos recesivos (44%), probablemente porque hoy en día las familias son menos numerosas y no se ven tantos casos dominantes afectados en una misma familia.

El alto porcentaje de casos esporádicos puede ser debido a que muchos casos dominantes pueden tener penetrancia incompleta y son clasificados como esporádicos,²⁴⁰ este porcentaje disminuye al volver a clasificar las familias tras el estudio genético. Lo mismo ocurre con el porcentaje de herencia recesiva presentada en los diferentes estudios; en todas las poblaciones probablemente esté infraestimado, puesto que los casos esporádicos constituyen un amplio grupo en todos los estudios y lo más probable es que representen herencias recesivas o ligadas al cromosoma X que no se han clasificado por no tener el estudio genético completado. Una vez el gen causal es identificado en estos casos, la

proporción se inclina a un mayor número de casos recesivos como en el estudio en Jerusalem de Sharon et al.²³⁹ De ahí la importancia de un estudio genético a todos los pacientes para poder reclasificar el tipo de herencia y realizar un adecuado consejo genético.

En un estudio llevado a cabo en el País Vasco en 1998 por Alvarez et al. obtuvieron un alto porcentaje de casos esporádicos. Este estudio se realizó sólo con los árboles genealógicos y no se reviso el tipo de herencia tras el estudio genético.²⁴¹

En la siguiente tabla y gráfico se muestran el porcentaje de los diferentes tipos de herencia en diferentes estudios poblacionales (tabla 37 y figura 56).

PAÍS (AUTORES)	Nº FAMILIAS	AD (%)	AR (%)	LIGX (%)	ESP (%)	NC (%)
China (Hu, 1982) ^{4,242}	151	11	33	8	48	
Sudáfrica (Greenberg et al, 1993) ²⁴³	125	23	27	3	40	8
Maine, EEUU (Bunker et al, 1984) ²	85	19	19	8	46	8
EEUU (Boughman et al, 1980) ¹⁹	380	10	84	6		
EEUU (Boughman et al, 1983) ²⁴⁰	300	22	16	9	50	3
EEUU (Fishman, 1978) ²⁴⁴	124	9	19	8	52	2
Noruega (Grondahl, 1987) ⁵	71	15	47	2	36	
Dinamarca (Haim 1993) ¹⁷⁹	366	6	17	6	54	17
Gran Bretaña (Bundey, 1984) ²⁰		24	12	16	44	4
Gran Bretaña (Jay, 1982) ²⁴⁵	426	25	13	16	41	5
Francia (Kaplan et al, 1990) ²⁴⁶	116	20	22	13	42	3
España (Ayuso et al. 1995) ^{22,247}	592	12	39	4	41	4
Gipuzkoa (Presente estudio 2017)	127	28	47	2	23	
Valencia (Najera et al, 1995) ²⁴⁷	132	14,4	31,8	1,5	39,9	
Jerusalem (Sharon et al., 2015) ²³⁹	183	8	49	7	36	
Francia (Bocquet et al., 2013) ²¹	649	20	15	7	43	15
Slovenia (Peterlin et al., 1992) ¹⁸	63	27	21	1,5	47,5	3
País Vasco (Alvarez et al., 1998) ²⁴¹	75	20	17,3		60	2,6

Tabla 37. Distribución geográfica de los diferentes tipos de herencia en RP.

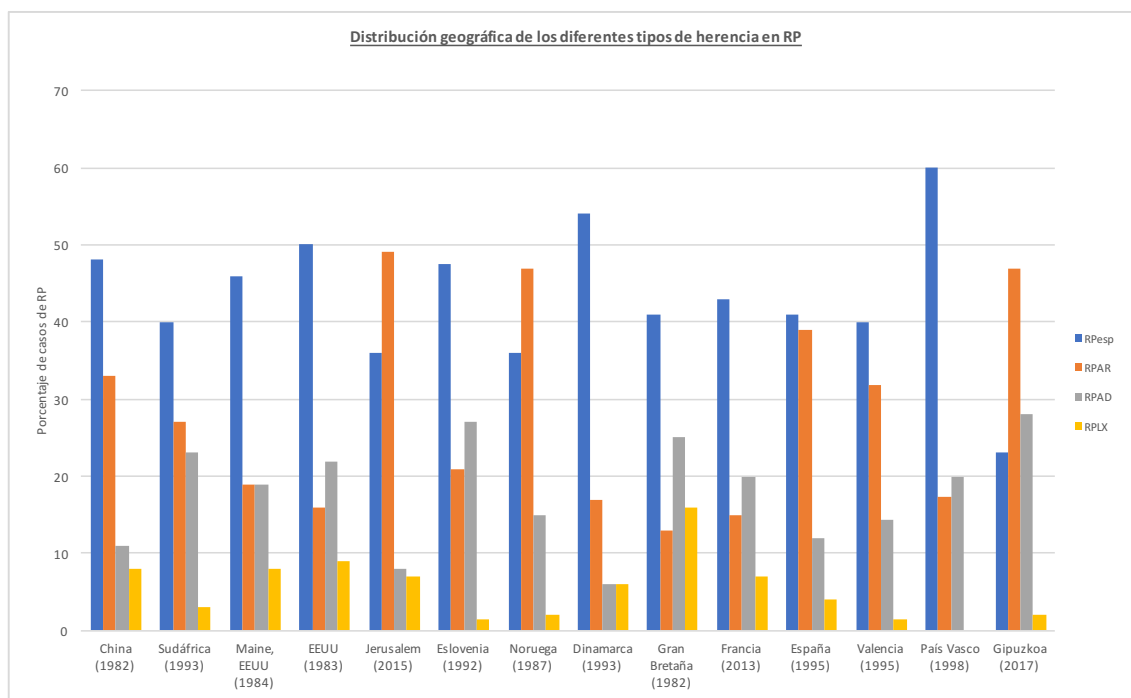


Figura 56. Distribución geográfica de los diferentes tipos de herencia en RP.

3.1. Consanguinidad

La consanguinidad juega un papel importante en las enfermedades raras. En el caso de la RP es frecuente encontrar consanguinidad alta en las series publicadas, en las herencias RPAR, RPLX y en los casos sindrómicos. Diferentes estudios difieren en el porcentaje de consanguinidad y en poblaciones donde se han detectado altos porcentajes de matrimonios consanguíneos se ha visto que la prevalencia de RP es mayor.¹⁶ Estas poblaciones con alta tasa de consanguinidad han ayudado a identificar y caracterizar muchos genes en los que mutaciones fundadoras causan enfermedades hereditarias en estos grupos étnicos. Así, en estudios genéticos en familias de judíos asquenazis han conseguido identificar mutaciones en el Síndrome de Usher^{248,249} y diferentes genes que causan RPAR.²⁵⁰⁻²⁵² También en la población Beduina, debido a su estructura tribal, exhiben una alta tasa de consanguinidad. El estudio de la genética de las familias de beduinos israelíes ha sido clave para descubrir muchos genes causantes de enfermedad, incluyendo aquellos causantes del Sd. de Bardet-Biedl (BBS1, BBS2, ARL6 y TRIM32).²⁵³ En nuestro estudio el 25% de las familias presentaba consanguinidad y como cabría esperar la consanguinidad ha sido mayor en las formas de RPAR (43%), RP sindrómica (41%) y RPLX (33%). Otro de los objetivos del estudio era encontrar mutaciones fundadoras en nuestra población, más adelante se discutirá este apartado en los resultados moleculares en familias guipuzcoanas.

4. Resultados moleculares

En el 45,7% de las familias estudiadas se ha encontrado la mutación causante de la enfermedad. En un estudio reciente donde se utiliza la tecnología NGS se ha encontrado la mutación en el 51% de los pacientes.⁴² Y dados los avances en las técnicas de secuenciación masiva (NGS), este porcentaje se puede ver incrementado en un futuro.

El desarrollo en la tecnología de secuenciación de ADN ha permitido la transición de ensayos de diagnóstico de mutación de gen único y conocido, a estudios exhaustivos de variación dentro de todos los genes que causan fenotipos de enfermedad. Esto ha desplazado el cuello de botella de los diagnósticos de la detección de la variante que causa la enfermedad a la interpretación clínica de la gran cantidad de variantes genéticas identificadas.⁴²

En nuestro estudio ha sido importante poder realizar la correlación genotipo-fenotipo al explorar oftalmológicamente a todos los pacientes ya que se ha demostrado que el fenotipado clínico detallado en complemento al análisis genómico descubre y acelera los diagnósticos en la clínica.^{254,255} Pero todavía tenemos otras técnicas cuando el resultado ha sido negativo como son la aplicación de técnicas de secuenciación del exoma completo (WES) o secuenciación del genoma completo (WGS) a individuos sin un diagnóstico molecular. Estas técnicas han identificado variantes en otros genes como causa de enfermedad, por ejemplo, mutaciones en IQCB1 identificadas a través de WES.²⁵⁶

Por otra parte, la detección de variantes genéticas en el diagnóstico clínico requiere de técnicas de bioinformática validadas clínicamente. Tales técnicas han evolucionado debido a la demanda clínica por parte de los servicios de diagnóstico. La validación de técnicas bioinformáticas para detectar eventos complejos de inserción y deleción, por ejemplo, *Pindel*,^{257,258} y deleciones y duplicaciones completas de exones, por ejemplo, *ExomeDepth*,²⁵⁸ sin duda aumentará el rendimiento diagnóstico en este tipo de estudios.

En el presente estudio se han utilizado diferentes métodos de secuenciación. El 41% de las familias con diagnóstico molecular, el diagnóstico se realizó mediante técnicas de NGS. A pesar de que no se puede comparar el número de hallazgos genéticos atendiendo a la tecnología empleada, porque se han empleado distintas muestras y se han analizado diferentes genes con cada técnica, nuestro estudio parece indicar que la metodología de NGS es la que mayor rendimiento diagnóstico ha ofrecido y a día de hoy se ha establecido como la técnica más ampliamente extendida para el diagnóstico de distrofias retinianas en la mayoría de clínicas y laboratorios de investigación.

Hoy en día, el grupo de neurodegeneración sensorial está utilizando un panel de 316 genes asociados a distrofias retinianas siguiendo un método de secuenciado y genotipado de alto rendimiento en *pool* de 4 grupos de 64 pacientes (16 pacientes por *pool*) desarrollado por nuestro grupo.²⁵⁹ En aquellos casos sin hallazgos genéticos, se está empleando una técnica de análisis del número de copias y/o de secuenciado del exoma.

4.1. Resultados en familias RPAD

Ha mejorado mucho la detección de mutaciones en la RPAD en las últimas 2 décadas, en la figura 6 se puede ver la lista de genes en los cuales se han detectado mutaciones causantes de RPAD.⁵² La base de datos HGMD (*The Human Gene Mutation Database*) alberga más de 1000 mutaciones en estos genes, aunque no todas son dominantes y no todas son patogénicas. Hasta ahora, las mutaciones en los genes causantes de RPAD son responsables del 50-75% de los casos, dependiendo de los test utilizados para el diagnóstico y la población estudiada. A pesar de esta alta rentabilidad del estudio de mutaciones en las familias dominantes, sigue habiendo problemas aún sin resolver. Así, existen genes que pueden causar formas recesivas o dominantes de RP: por ejemplo, mutaciones en el gen RPE65⁵⁷ y RDH12²⁶⁰ generalmente asociados a RPAD también pueden causar RPAD. Otras veces el diagnóstico inicial de RP puede llevar a dudas, debido a la gran heterogeneidad clínica de la enfermedad. Por ejemplo, familias afectas de RPLX y sus mujeres portadoras pueden confundirse con formas de RPAD.²⁶¹ Además, un porcentaje no desdeñable de casos son esporádicos, sin familiares afectos conocidos, y la forma de herencia está aún por determinar.

Más allá de estas complicaciones, está el problema generalizado de las variantes de significado incierto (VUS), esto es, variantes raras potencialmente patogénicas en genes de RPAD conocidos para los cuales la evidencia es incierta. Este es un problema fundamental en genética médica, dado el extenso historial de variantes raras y aparentemente patogénicas en la población humana.²⁶² El análisis de segregación en estos pacientes a veces puede ser difícil en casos de enfermedad de inicio tardío y penetrancia incompleta. Así, un miembro de la familia asintomático puede ser portador del alelo patogénico, porque todavía no ha desarrollado la enfermedad o porque se trata de un caso de penetrancia incompleta. Un ejemplo de esta situación son las mutaciones en el gen PRPF31 donde la penetrancia incompleta puede llegar hasta el 20% de los casos.²⁶³ Sin embargo, la penetrancia incompleta no es frecuente en la mayoría de genes de RPAD. Al contrario, la ausencia de mutación en un miembro de la familia afecto descarta con casi seguridad el carácter patogénico de esa mutación.

En nuestro estudio hemos tenido una alta rentabilidad diagnóstica, hemos encontrado la mutación en el 80% de los casos de RPAD (la mayoría con la técnica NGS, 17 de las 28 familias).

Las mutaciones en el gen RHO han sido las más frecuentes, englobando al 36% de mutaciones encontradas en las pacientes con RPAD. Se asemeja al 30,7% registrado en 270 familias americanas⁵² y al 21% encontrado por Carmen Ayuso et al. en un estudio con 200 familias españolas con RPAD.²⁶⁴ Este porcentaje es superior al encontrado en otras poblaciones europeas (Italia, Alemania y Francia alrededor del 16%).²⁶⁵⁻²⁶⁷ La mutación más prevalente en nuestro estudio ha sido la **mutación c.937-1G>T** que no se ha correspondido con la mutación más prevalente en el estudio de 200 familias españolas, donde la mutación más prevalente ha sido la mutación p.Pro347Leu²⁶⁴, la cual no ha sido encontrada en nuestra población. Pero, sí hemos encontrado una familia con una mutación que comparte el rs (*reference SNP*) con la mutación p.Pro347Leu en una familia de nuestro estudio con un cambio de prolina a glutamina en vez de leucina (p.Pro347Gln), que también es considerada patogénica. Una familia ha presentado 2 mutaciones diferentes en el gen RHO p.Val104Asp y p.Asp190Asn pero comparándola con la familia que sólo presentaba la mutación p.Val104Asp, el fenotipo no era más grave. Por el contrario, sí que hemos encontrado un caso donde un paciente dentro de una familia con mutación en el gen RHO presentaba mutación en el gen NR2E3 y se ha adelantado en su caso el inicio de la enfermedad, pudiendo ser un caso todavía no descrito de herencia digénica²⁶⁸ o un caso de *double hit*.²¹¹

La segunda mutación en frecuencia ha sido la mutación en el gen SNRP200, pero tras analizar bien los árboles genealógicos se vió que 7 de las 8 familias pertenecían a la misma población (Torrecillas de la Tiesa, Cáceres, 1.122 habitantes) y la octava familia pertenecía a una población cercana a 22km de distancia (Trujillo). Por lo tanto, está mutación podría concluirse que se ha encontrado en 2 familias en nuestro estudio, encontrándose en tercer lugar junto con las mutaciones en el gen PRPF31 y EYS. El segundo gen mutado en frecuencia sería el gen PRPF8 (10%) encontrado en 3 familias. Cabe destacar que mutaciones en el gen PRPF31 son las segundas más frecuentes en la población americana con un 8,9% de prevalencia⁵² y en España suponen el 7,6% de las mutaciones en RPAD según un reciente estudio publicado en el 2017 por el grupo de la Dra. Carmen Ayuso.²⁶⁹ Respecto a la mutación hallada en 2 familias en el gen EYS, en las bases de datos de predicción de patogenicidad en el 2014 la variante descrita en EYS era "*probable damaging*" por los predictores de patogenicidad. Además, esta mutación segregaba bien en

las dos familias. Pero a día de hoy, la mutación está catalogada como tolerada. Podría tratarse de una variante de significado incierto (VUS).

En cuanto al tipo de mutación uno de los hallazgos más destacables encontrados por nuestro grupo fue el alto porcentaje de mutaciones que afectan al proceso de *splicing* (corte y empalme) del RNA mensajero. Más de la mitad de las familias presentaban mutaciones en genes que codifican para factores del *spliceosoma* (SNRNP200, PRPF8 y PRPF31), pero también mutaciones en la región de *splicing* en el gen RHO (c.937-1G>T). Este hallazgo ha sido recientemente publicado por nuestro.¹⁸⁵

Diferentes mutaciones en genes de RPAD se han asociado al proceso de *splicing*, por ejemplo, las mutaciones en genes que codifican proteínas del spliceosoma, como los factores de *splicing pre-RNA* (PRPF3, PRPF4, PRPF6, PRPF8, PRPF31, RP9) o RNA helicasas (SNRNP200).²⁷⁰ Sin embargo, dado que estos genes se expresan de manera ubicua en todos los tejidos y están altamente conservados en todos los eucariotas, no está claro por qué las mutaciones en estos genes se asocian exclusivamente a RPAD. Los estudios realizados en retina de roedores mostraron que los niveles de expresión de PRPF3, PRPF31, PRPF8 son más altos en la retina que en otros tejidos en ratones adultos normales, lo que sugiere que la retina puede tener una mayor demanda de corte y empalme que otros tejidos, dado que es uno de los tejidos metabólicamente más activos en el cuerpo.^{270,271}

Creemos que es importante este hallazgo porque la modulación del *splicing* se ha propuesto como un enfoque terapéutico para varias enfermedades, incluyendo las distrofias retinianas. Dos de las líneas de investigación más avanzadas en este sentido se basan en el uso de oligonucleótidos antisentido modificados (ASO) para fijar secuencias específicas de RNA y redirigir el *splicing*, y moléculas pequeñas como moduladores de este proceso. Un ejemplo representativo de este tipo de estrategias es la omisión del exón (*exon skipping*) para la distrofia muscular de Duchenne (DMD), donde la proteína muscular distrofina se trunca prematuramente por mutaciones que alteran el marco de lectura, lo que conduce a una proteína no funcional. La omisión del exón crea una proteína más corta que la proteína nativa, parcialmente funcional, lo que conduce a un fenotipo mucho menos severo en modelos animales de DMD. Con respecto a las estrategias basadas en moléculas pequeñas y péptidos, se ha demostrado que varios moduladores del *splicing* son efectivos en la distrofia miotónica y el cáncer.^{272,273}

En cuanto a las distrofias retinianas, los enfoques terapéuticos más avanzados relacionados con fallos en el *splicing* están dirigidos a corregir el *splicing* de RNA de los genes RPGR y RHO. El primero de ellos se basa en el uso de modificaciones de las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP). Las snRNP son complejos formados por unas diez proteínas más una pequeña molécula de RNA, rica en uracilo (U), que es la encargada de reconocer al intrón mediante apareamiento complementario de bases. Las snRNP que forman el spliceosoma se denominan U1, U2, U4, U5 y U6; y participan en diversas interacciones RNA-RNA y RNA-proteína. Las snRNP reconocen la secuencia consenso GU (Guanina-Uracilo) del extremo 5' y AG (Adenina-Guanina) del extremo 3' del intrón. En concreto se utilizó una modificación del snRNP U1 de tal manera que contenían un región adaptada a la secuencia mutada de la región donadora de *splicing* del exón 10 del gen RPGR.²⁷⁴ Otro de los abordajes consistió en el uso de una variante del *splicing* conocida como *trans-splicing* en el gen RHO. A diferencia de la forma *canónica* del *splicing* (en *cis*), donde se procesa una sola molécula, en el *trans-splicing* se genera un RNA único a partir de múltiples pre-mRNA.²⁷⁵ Ambos enfoques se basan en modelos celulares y animales y han proporcionado resultados alentadores. Cabe esperar que una vez en la clínica, estos abordajes prometedores podrían generalizarse y aplicarse a otros genes con mutaciones del sitio donador de empalme y a todos los genes RPAD y no únicamente a los genes RPGR y RHO, respectivamente.^{274,275}

Para concluir con los resultados moleculares en familias dominantes, tras los buenos resultados obtenidos en la detección de las formas dominantes, podemos recomendar el empleo de técnicas de NGS para evaluar a los pacientes con RPAD, pero con ciertas limitaciones:

1. El análisis realizado no permite descartar la presencia de variantes en regiones de baja cobertura.
2. La tecnología NGS se basa en lecturas cortas, presenta una alta sensibilidad y especificidad (>99%) para cambios de nucleótido único y pequeñas inserciones/deleciones de hasta 9 nucleótidos. Las variantes de tipo estructural que afectan a un exón completo (deleciones, inserciones), así como cualquier tipo de inversión, pueden no ser detectadas.
3. Este estudio no permite la detección de variantes del número de copias, así como detectar grandes deleciones o duplicaciones, ni mutaciones en promotores o regiones intrónicas alejadas más de 20 pb de los exones.

Así, grandes deleciones en el gen PRPF31 que suponen un 2,5% de los casos de RPAD y los casos de elementos repetitivos de la región ORF15 del gen RPGR de la RPLX se quedarían fuera del alcance de este tipo de técnicas.^{42,269} En nuestro estudio, estas zonas se volvieron a analizar mediante secuenciado directo de Sanger y/o HRM, a pesar de lo cual no se detectó ninguna mutación causal en estas regiones repetitivas.

4.1.1. Correlación genotipo-fenotipo RPAD: mutaciones en gen RHO

La rodopsina es un fotopigmento transmembrana ubicado en los discos de los segmentos externos de los bastones. La rodopsina es responsable de la absorción de la luz y el inicio de la cascada de fototransducción visual. Se han identificado más de 100 mutaciones en el gen de la rodopsina (RHO) relacionadas con la RP, que forman más del 30% de los casos de RPAD.²⁷⁶⁻²⁷⁸ La rodopsina, un componente estructural transmembrana clave, constituye aproximadamente el 85% del contenido proteico de los segmentos externos de los bastones.²⁷⁹ Tiene tres dominios, el intradiscal, el transmembrana y el dominio citoplásmico. Se han identificado mutaciones en cada uno de los tres dominios. Sandberg et al. relacionó la severidad fenotípica de RP con la ubicación de la mutación de la rodopsina implicada.²⁸⁰ Los pacientes con mutaciones en el dominio intradiscal tienden a tener un mejor pronóstico visual que aquellos con mutaciones en el dominio transmembrana, mientras que los pacientes con mutaciones en el dominio citoplásmico tienen la peor función visual (Figura 57).²⁸⁰

La mutación más común en el gen de la rodopsina en los Estados Unidos es la mutación p.Pro23His. Esta mutación se localiza en el dominio intradiscal de la rodopsina y representa el 10-15% de la RPAD en los caucásicos estadounidenses.²⁸¹ El fenotipo asociado con la mutación p.Pro23His es relativamente leve cuando se comparan los campos visuales del paciente y las amplitudes del ERG.^{280,282}

Las mutaciones encontradas en el dominio citoplásmico de la rodopsina conllevan un peor pronóstico visual y un fenotipo más severo, y pueden deberse a las importantes funciones de transporte celular de este dominio.^{276,282} En particular, se han encontrado varias mutaciones de la enfermedad en el codón 347 del dominio citoplásmico de la rodopsina. Estas mutaciones, incluida la mutación Pro347Leu relativamente común, se han asociado con un pronóstico visual peor.²⁸²

En nuestra serie la mayoría de pacientes presentaban un fenotipo leve. Ha habido un caso con 2 mutaciones en el gen RHO (p.Val104Asp y p.Asp190Asn) y cabría esperar que

presentara un fenotipo más severo, pero el paciente presentaba un cuadro leve de RP sectorial. Dos pacientes presentaron fenotipos severos, uno de ellos presentaba la mutación p.Ter349Glu que se ha asociado a fenotipos de RPAD de aparición precoz y baja agudeza visual¹⁹⁷ y el otro paciente presentaba una mutación adicional en el gen NR2E3. Por último, la RP puede ser difícil de diagnosticar en niños, sobretodo en las formas dominantes donde se retrasa el inicio de la enfermedad. Además, el diagnóstico presintomático puede ser importante para las familias con niños con distrofias retinianas puesto que la incertidumbre de padecer o no la enfermedad puede ser más frustrante que conocerlo y ser capaz de prepararse para el futuro. Tsui et al. en un estudio de correlación genotipo-fenotipo para la mutación p.Asp190Asn en el gen RHO, vieron que dos de los tres niños menores de 12 años de familiares afectados presentaban la mutación estando asintomáticos.²⁸³ Al realizarles el estudio clínico vieron que los niños con la mutación presentaban un anillo hiperfluorescente en la macula en la autofluorescencia (AF) y la onda b del ERG escotópico estaba retrasada. Los autores concluyen que la AF y el ERG pueden ser de utilidad para evaluar niños asintomáticos con RP.

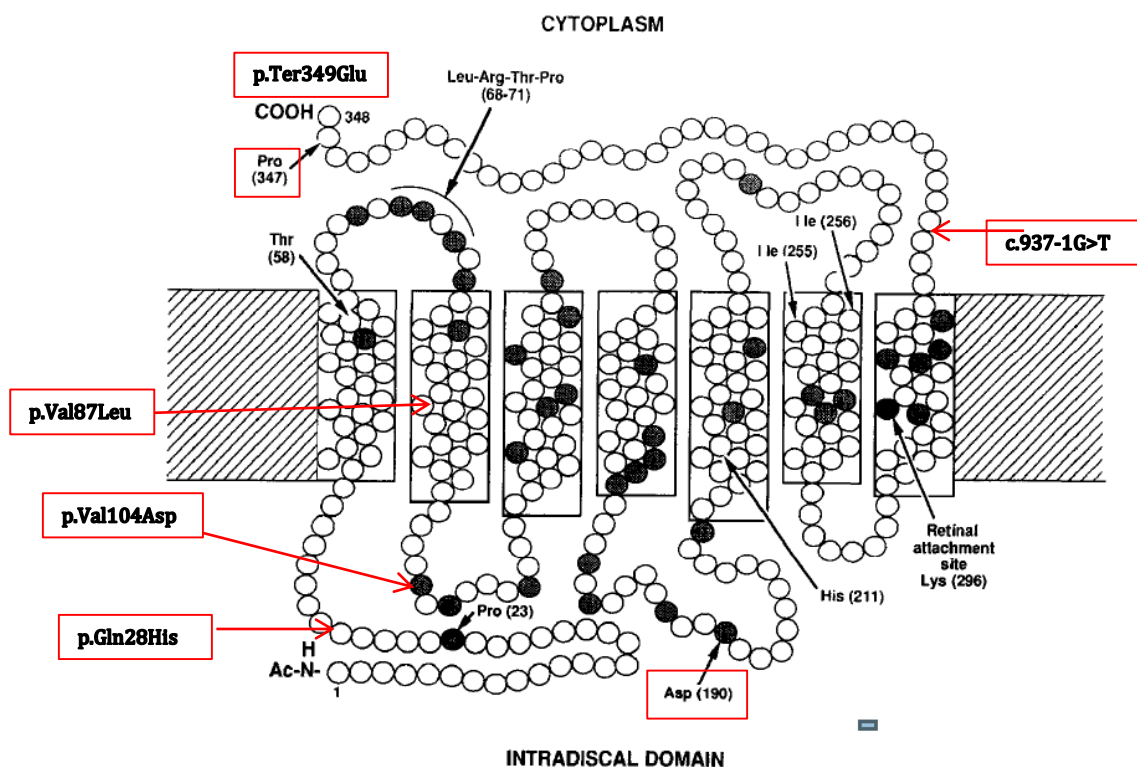


Figura 57. Modelo esquemático de la rodopsina humana modificado de Keen et al.¹⁹⁸ que muestra los siete dominios transmembrana, las ubicaciones de residuos de aminoácidos afectados por mutaciones dominantes que causan retinitis pigmentosa (flechas) y en rojo las mutaciones detectadas en nuestro estudio.

4.2. Resultados en familias RPAR

El 47,5% de las 61 familias con RPAR no sindrómicas pudieron ser genotipadas. La mayoría de los casos se han detectado con la técnica HRM (9 casos de 21 familias) pero también con NGS (3/21) y Affymetrix (5/21). Las mutaciones más frecuentes han sido en los genes **CERKL (24%)**, **USH2A (19%)**, **PDE6A (10%)** y **CRB1 (10%)**. El resto de mutaciones han presentado una prevalencia del 5%: EYS, NR2E3, SEMA4A, RLBP1, RP1, ABCA4, TULP1 y ROM1.

En un estudio en el 2010 de 272 familias españolas analizadas mediante genotipado con *microarrays* encontraron la mutación en el 11% de los pacientes. Hoy en día, gracias a la secuenciación masiva este porcentaje se ha incrementado, situándose entorno a un 50% de rendimiento diagnóstico.^{42,44} Las mutaciones más frecuentes encontradas en la población española fueron RDH12, USH2A y CERKL. La mutación más frecuente en el gen CERKL fue la mutación p.Arg257Ter que es la única descrita en pacientes españoles.^{222,284} En nuestro estudio hemos encontrado una **mutación novel p.Arg283Ter** en 2 familias de origen guipuzcoano de Alegia y Ataun, localidades separadas por 23 km.

En los genes asociados a las formas recesivas de RP, existen varios genes más frecuentes en la población española respecto a otras poblaciones según Daiger et al.⁴³ en una revisión *online* de RP actualizada cada año: el gen **CERKL** encontrado en el 3-4% de población española afecta de RPAR (1% en RPAR a nivel mundial), el gen **CRB1** en el 6-7% de la población española (1% en RPAR a nivel mundial) y el gen **EYS** en el 10-30% de la población española (<1% en RPAR a nivel mundial).²⁰⁴ En el presente estudio las mutaciones en el **gen CERKL** superan tanto a la población española como mundial con un 24% frente al 3-4% y 1%. Respecto a la mutación CRB1 ha sido la cuarta en frecuencia con un 10% y al contrario que en los estudios de población española sólo hemos encontrado un 5% de familias con RPAR con mutaciones en el gen EYS.

El segundo gen mutado en frecuencia en las familias RPAR encontrado en el presente estudio ha sido el gen USH2A, con el 19% de familiares con mutaciones en dicho gen. Esta frecuencia es similar al 17% descrito a nivel mundial por Daiger et al.⁴³

El tercer gen mutado en frecuencia ha sido el gen PDE6A con un 10% de familiares afectados. La frecuencia es superior al 3-4% descrita en la población general.⁴³ Es un hallazgo importante porque existen estudios en modelos animales en marcha en terapia génica para este gen.²⁸⁵ Así, el 10% de nuestra población se podría beneficiar en un futuro de estos tratamientos. Además, nuestro grupo de investigación dispone de un modelo de

ratón con mutaciones en la subunidad beta del gen PDE6, relacionado con éste y con gran homología con el gen humano. Es por tanto esperable que los estudios en este modelo serán de relevancia para un grupo significativo de nuestros pacientes.

Cabe destacar la mutación hallada en el gen NR2E3, la cual es muy poco frecuente en otras poblaciones y se detectó por primera vez en Portugal. Los criptojudíos (marranos) son los supervivientes de los judíos españoles que fueron perseguidos a finales del siglo XV, escaparon a Portugal y tuvieron que convertirse al cristianismo para salvar sus vidas. Hoy en día, todavía existen grupos aislados en áreas montañosas como Belmonte en la provincia de Beira-Baixa de Portugal. Gerber et al.²²⁴ tras estudiar una población altamente endogámica y consanguínea de criptojudíos de Belmonte afectados de RPAR encontraron una mutación sin sentido en el gen PNR, también denominado NR2E3. Los estudios de haplotipo apoyan la teoría de que esta mutación es antigua pero que probablemente ocurrió tras el asentamiento de esta población en Belmonte. Con nuestro hallazgo de esta mutación en una familia de origen español en Palencia podríamos discutir la teoría de que quizás esta mutación ya existía previo al asentamiento en Portugal y que procede de la población judía española. Para apoyar esta misma teoría, recientemente en un artículo publicado por Ayuso et al. en el 2016 han demostrado una prevalencia de mutaciones en el gen NR2E3 del 3,5% en población española.²⁸⁶

4.2.1. Correlación genotipo- fenotipo RPAR y RPesp con mutaciones en el gen CERKL

El gen CERKL está implicado en la apoptosis mediada por esfingolípidos en la retina. El gen CERKL se expresa de forma moderada en diferentes tejidos, incluyendo la retina, riñón, pulmón y páncreas y de forma leve en cerebro, placenta e hígado.²¹³ La mutación p.Arg257Ter se encuentra en el 3,3% de RPAR en familias españolas. Hasta el 2008 sólo estaba descrita esta mutación en la población española, en nuestro estudio hemos hallado también la mutación p.Arg283Ter. Este gen es relevante puesto que es el segundo gen mutado en frecuencia en familias españolas de RPAR.

En un estudio publicado por Avila-Fernandez et al.,²¹⁴ se describe la correlación genotipo-fenotipo de 9 pacientes de 7 familias españolas con la mutación p.Arg257Ter en el gen CERKL. Todos los pacientes tenían un fenotipo en común que consistía en atrofia macular, atrofia coriorretiniana parcheada (similar a la encontrada en la atrofia girata) y pigmento en grumos en la periferia. Los pacientes no presentaban síntomas extraoculares. La mediana de la edad de diagnóstico fue de 23 años. La mayoría de pacientes preservaban la AV hasta la edad adulta precoz, pero pronto desarrollaban una pérdida severa de AV. En

nuestro estudio, los pacientes con mutaciones en el gen CERKL presentaban el mismo fenotipo descrito por Avila-Fernandez et al., tanto los pacientes con la mutación p.Arg257Ter como la mutación p.Arg283Ter. Además, se trata de la mutación más frecuente encontrada en nuestra serie en las familias RPAR y también en los pacientes de origen guipuzcoano. Se trata de un fenotipo con atrofia macular y mal pronóstico visual, lo cual es importante conocer en la práctica clínica para poder ofrecer un pronóstico a los pacientes y orientarles de cara al futuro.

4.2.2. Correlación genotipo- fenotipo RPAR: mutaciones en el gen CRB1

Mutaciones en el gen CRB1 se han asociado a RP de inicio precoz y ACL. También se ha asociado a la forma de RP con preservación pararteriolar del epitelio pigmentario retiniano.²⁸⁷ En nuestra serie sólo 2 pacientes presentaban esta mutación y sólo una de ellas presentaba una forma precoz de ACL. En ambas pacientes se describió la triada clásica en el fondo de ojo. Dos pacientes de nuestra serie tenían el fenotipo característico de preservación pararteriolar del EPR con espículas óseas paravenosas, pero en ninguno de los pacientes se encontraron mutaciones en el gen CRB1.

4.2.3. Correlación genotipo-fenotipo RPAR: mutaciones en el gen TULP1

Mutaciones en el gen TULP1 se han asociado a formas precoces y fenotipo severo de RP, al igual que lo encontrado en nuestra serie.^{287,288}

4.2.4. Correlación genotipo-fenotipo: mutaciones en el gen ABCA4

El gen ABCA4 se ha implicado en el 5% de casos de RPAR.²⁸⁹ Pero además de asociarse a RPAR, se ha asociado clásicamente a enfermedad de Stargardt, fundus flavimaculatus, distrofia de conos y bastones e incluso a algunos casos de DMAE. Klevering et al. en un estudio sobre el espectro fenotípico causado por mutaciones en el gen ABCA4 concluyen que fenotipos claramente diferentes pueden converger a una etapa final similar, caracterizada por una atrofia coriorretiniana extensa y baja AV. Con el advenimiento de las opciones terapéuticas como la terapia génica, el reconocimiento por el oftalmólogo de los diversos fenotipos retinianos asociados con las mutaciones ABCA4 es cada vez más importante.^{290,291} En nuestra serie sólo encontramos una paciente con RPAR y mutación en el gen ABCA4 y al igual que lo descrito anteriormente presentaba atrofia coriorretiniana extensa y baja AV.

4.2.5. Correlación genotipo-fenotipo RPAR: mutaciones en el gen RLBP1

Mutaciones en el gen RLBP1 se han asociado a Retinitis Punctata Albicans²⁹² y al Síndrome de Bothnia.²⁹³⁻²⁹⁵ Los pacientes presentan nictalopía de inicio precoz en la infancia. En adultos jóvenes se observa Retinitis Punctata Albicans, seguido de atrofia macular y atrofia parcheada paracentral y en periferia parecido a la atrofia girata. En estadios más avanzados, se aprecia pigmento en forma de espículas óseas y estrechamiento arteriolar. Sin embargo, los pacientes preservan el aspecto del nervio óptico. La disminución de AV deriva en ceguera legal en la edad adulta precoz. El único paciente del presente estudio con esta mutación mostraba el fenotipo descrito anteriormente en la edad adulta. Se trata de una mutación prevalente en el norte de Suecia, aunque se ha encontrado en diferentes poblaciones.²⁹⁵ La mutación produce un defecto en la capacidad de la proteína de unión a retinaldehído celular para unirse a retinoide, lo cual probablemente explique la disfunción de los bastones seguido de degeneración central y periférica de la retina.²⁹⁴

4.3. Resultados en familias RPLX

Sólo hemos encontrado la mutación en una de las tres familias. La mutación se encuentra en el gen RP2. Se estima que el gen RP2 está implicado en el 10% de las RP ligadas al cromosoma X.²⁹⁶ Esta mutación CS097280, altera el patrón de *splicing* o ensamblaje de la proteína y como consecuencia se pierde el exón 4 y se altera el tamaño de la proteína debido a la prematura introducción de *novó* de un condón stop.²³³ El producto del gen RP2 presenta homología con el cofactor C humano, una proteína implicada en las últimas etapas del plegamiento de la beta-tubulina. Se ha descrito que la degeneración progresiva de la retina podría estar causada por una acumulación de tubulina específica de fotorreceptores, incorrectamente plegada.²⁹⁷ En las mujeres portadoras, esta mutación puede conducir a un amplio rango de características fenotípicas, desde la normalidad hasta una degeneración severa de la retina, apoyando la hipótesis de una herencia semidominante ligada al cromosoma X.²³³

Las variantes patogénicas en los genes RPGR (también denominado RP3) y RP2 son las causas más frecuentes de RPLX. Estudios de ligamiento sugieren que son responsables del 70-90% y 10-20% de casos de RPLX respectivamente.²⁹⁸ Hay que sospechar mutaciones en el gen RPGR en varones con RPesp, puesto que se ha visto que el 15% presentan una variante patogénica en este gen.²⁹⁹

La patología retiniana en mujeres con RPLX es típicamente menos severa que la

encontrada en los varones; al contrario que en las formas de RPAD donde los hombres y mujeres están igualmente afectados. Como las mujeres heterocigotas para una variante patogénica en los genes implicados en la RPLX pueden ser asintomáticas o expresar degeneración retiniana de leve a severa,^{300,301} las familias con RPLX con alguna mujer afecta pueden confundirse como familias de RPAD. Así, por ejemplo, en una cohorte de 258 familias con RPAD aparente, 19 familias se reclasificaron como RPLX por mutaciones en el gen RPGR (7,4%) y 2 familias como RPLX por mutaciones en el gen RP2.²⁶¹ Por lo tanto, esta observación puede que infraestime la actual frecuencia de casos de RP debido a mutaciones en el gen RPGR en pedigris de RPAD.

Por último, hacer hincapié en las técnicas de secuenciación. La mutación encontrada en nuestro estudio fue mediante la técnica HRM. Pero a día de hoy los genes asociados a RPLX también se están estudiando con NGS y esta última técnica tiene una limitación en el exón final de RPGR rico en dinucleótidos AG (orf15). Las mutaciones en RPGR(orf15) están bien documentadas como una causa importante de RPLX,³⁰² pero las técnicas de secuenciación capilar bidireccional siguen siendo la herramienta de cribado clínico estándar para esta región del genoma.³⁰³ Complementando los servicios de diagnóstico de NGS con secuenciación capilar bidireccional de regiones que no se detectan mediante NGS aumentará el rendimiento diagnóstico.

4.3.1. Correlación genotipo-fenotipo RPLX: mutación en el gen RP2

Se ha identificado una correlación genotipo-fenotipo en pacientes con RPLX con mutaciones en el gen RP2. Jayasundera et al. en el 2010 publicaron una serie de 25 pacientes con esta mutación.²⁹⁷ El 91% de pacientes presentaba afectación macular y AV < 20/50. Dos pacientes presentaron un fondo de ojo *coroideremia-like* y el 82% de los pacientes eran miopes con una media de -7,97D. En el 90% de los pacientes se demostró una disfunción severa de conos y bastones en el ERG. Describen también alteraciones en 3 mujeres portadoras que presentan atrofia macular en uno o ambos ojos y miopía (media -6,23D). Este fenotipo es el descrito en nuestro único paciente con dicha mutación. Los autores concluyen que el *screening* del gen RP2 debe ser priorizado en pacientes menores de 16 años de edad caracterizados por herencia ligada al cromosoma X, disminución de AV, miopía alta y atrofia macular precoz. También sugieren que los pacientes que presenten una apariencia de fondo similar a la coroideremia y que no tienen mutaciones causantes de enfermedad en el gen de la coroideremia (CHM) se examinen en busca de variaciones en el gen RP2.

4.4. Resultados en familias RP esporádica

De las 31 familias clasificadas como RPesp, sólo hemos encontrado la mutación en una familia (3,2%) en el gen CERKL (p.Arg283Ter) que es un gen responsable en el 1% de casos de RPAR en diferentes poblaciones a nivel mundial. En España según Daiger et al.⁴³ esta mutación es más frecuente que a nivel mundial, encontrándose en el 3-4% de casos de RPAR. Sin embargo, en nuestro estudio, mutaciones en este gen se encuentran con más frecuencia que en la población española (186), siendo responsables del 24% de los casos de RPAR en las 127 familias estudiadas y del 29% entre las de origen guipuzcoano..

4.5. Resultados en familias con origen guipuzcoano

Sólo un tercio de las familias estudiadas tenía origen guipuzcoano (figura 58). De las 42 familias de origen guipuzcoano estudiadas encontramos resultados moleculares positivos en 18 familias (43%). Para las formas de RPAR (síndromicas y no síndromicas) las mutaciones más frecuentes han sido en los genes CERKL (29%), USH2A (22%) y CRB1 (14%).

En una revisión actualizada del 2017 de Daiger et al.⁴³ la prevalencia de la mutación CERKL en las formas recesivas es sólo del 3-4%, y destacan que es más frecuente esta mutación en la población española, como lo han demostrado Ayuso et al.²¹⁴ En nuestro estudio hemos encontrado una **mutación novel p.Arg283Ter** en 2 familias de origen guipuzcoano de Alegia y Ataun, localidades separadas por 23km. Esta mutación podría proponerse como una mutación fundadora en Gipuzkoa pero hemos encontrado otras 2 familias con la misma mutación cuyo origen estaba en Ávila y la Coruña, desestimando nuestra hipótesis del estudio.

Las mutaciones en el gen USH2A se encuentran en el 10-15% de las formas no síndromicas del RPAR,⁴³ esta cifra se asemeja a la encontrada en nuestro estudio, puesto que una de las familias presentaba la mutación sin presentar el síndrome de Usher. Por último, mutaciones en el gen CRB1 son responsables del 6-7% de RPAR y es una mutación prevalente en España en casos de RP de inicio precoz (9%) y ACL (14%).³⁰⁴ Al contrario de lo esperado, en nuestra población guipuzcoana no hemos hallado mutaciones en el gen EYS, la cual es una mutación frecuente en España con una prevalencia estimada del 15,9%.²⁰⁴

En cuanto a la consanguinidad en las familias guipuzcoanas estudiadas, en el mapa se muestran en rojo las localidades con familias consanguíneas en nuestro estudio. Se observa que las familias consanguíneas están distribuidas por todo el territorio

guipuzcoano. Si analizamos el mapa, existe una tendencia como cabría esperar de mayor consanguinidad en poblaciones aisladas como en la zona de Aralar, ya descrito anteriormente por Zudaire en 1981 en un estudio impulsado por la Sociedad de Ciencias Aranzadi.³⁰⁵ En dicho trabajo se calcularon la frecuencia de uniones consanguíneas en la zona de Aralar y en la zona costera. Se encontró un 8,6% de consanguinidad en la zona de Aralar, destacando Ataun (21,6%) y Bedayo (22,2%). En la costa, la consanguinidad fue del 3,3%, destacando Deba, Getaria y Orío todas ellas con un 4,9% de matrimonios consanguíneos. En otro estudio del mismo autor en 1992 analizó la consanguinidad en Gipuzkoa.³⁰⁶ En la siguiente tabla mostramos las localidades mayores de 500 habitantes (puesto que las localidades menores de 500 habitantes pertenecen en su mayoría a otros municipios hoy en día) con mayor consanguinidad (>5%) y destacamos en negrita las localidades donde hemos encontrado pacientes con RP y consanguinidad en nuestro estudio (tabla 38).

Localidad	Frecuencia de consanguinidad (%)
Ataun	20,4
Amezqueta	11,9
Regil	9,4
Aya	7,7
Idiazabal	7,2
Asteasu	7,1
Aizarnazabal	6,5
Berastegui	5,9
Gaviria	5,8
Garagarza	5,7
Iziar	5,6
Zaldivia	5,1

Tabla 38. Localidades guipuzcoanas mayores de 500 habitantes con consanguinidad >5%. En negrita se resaltan las localidades de origen de pacientes con RP y consanguinidad en nuestro estudio.

A continuación, mostramos las frecuencias de consanguinidad que superan el 5% en las localidades de menos de 500 habitantes (tabla 39). En nuestro estudio no hemos encontrado ninguna familia que pertenezca a estas localidades.

Localidad	Frecuencia de consanguinidad (%)
Bedaio	22,2
Urdaneta	13,2
Aya-Ataun	12,8
Baliarrain	12,7
Isurieta	12,5
Oreja	12,1
Alzaga	10,8
Orendain	10,6
Araoz	10,6
Arenaza	10,5
Mendiola	10,5
Arama	10,3
Elosua	9,9
Marin	9,2
Alzola de Aya	9
Aratz Erreka	8,8
Gainza	7,9
Apozaga	7,7
Ursuaran	7,7
Aguinaga Eibar	7
Zerain	7
Zarimuz	6,4
Alquiza	6
Goronaeta	6
Bolibar	5,9
Larrino	5,8
Astigarreta	5,6
Garagarza Mondragon	5,6
Mutiloa	5,6
Alzola	5,6
Larraul	5,6
Laurgain	5,2

Tabla 39. Localidades de menos de 500 habitantes con frecuencia de consanguinidad mayor al 5%.

Creemos que es importante conocer la demografía guipuzcoana y buscar formas recesivas en los pacientes de estas localidades.

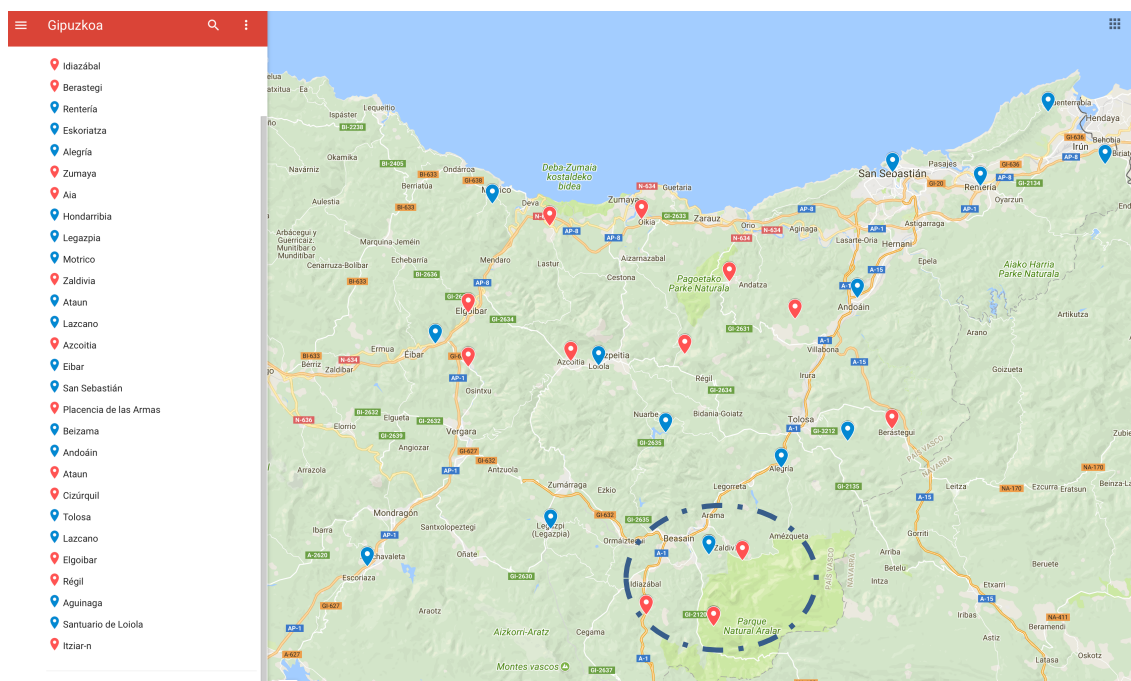


Figura 58: Mapa de las familias de origen guipuzcoano en nuestro estudio. En rojo se muestran las familias con consanguinidad, en azul familias no consanguíneas. En la circunferencia se muestran las localidades en la zona de Aralar donde se han encontrado familias consanguíneas en Ataun, Idiazabal y Zaldivia.

5. Síndrome de Usher

De los 6 pacientes de 5 familias con diagnóstico clínico de Síndrome de Usher tipo I (USH1), sólo se ha detectado una mutación en el gen ROM1 en 1 paciente. Esto puede ser debido al pequeño tamaño muestral o a la existencia de otros factores genéticos o adquiridos que fueran los responsables de la hipoacusia asociada al defecto visual en nuestros pacientes.

En nuestro estudio el porcentaje de casos de Sd. Usher tipo II (USH2) es superior al de USH1, como se ha descrito en los diferentes estudios.^{220,307} Este hecho puede atribuirse, al menos en parte, a que un gran número de familias han sido seleccionadas a través de asociaciones de afectados de RP y no de asociaciones de pacientes con sordera. En nuestra serie no hemos encontrado ningún caso con diagnóstico genético de USH3.

La prevalencia del Sd. Usher en la población general es bastante uniforme en diferentes países, varía del 1,8/100000 al 6,2/100000 (tabla 40).^{5,308-314} En un estudio de prevalencia del Sd. Usher en Valencia, del grupo liderado por el Dr. Millan, la prevalencia resultó ser de 4,2/100.000 (1/23.810).^{Espinos, Millan 315} El Dr. Millan y su equipo son centro de referencia para el genotipado del Sd. Usher, lo que puede explicar la diferencia del mayor número de casos diagnosticados con respecto a nuestro estudio.

La frecuencia de Sd. Usher en personas sordas va desde el 0,6 al 28%;³¹³ en personas con RP, el porcentaje de sordera va desde el 8% al 33,3%.³¹⁶ En nuestro estudio la prevalencia del Sd. de Usher ha sido 1 de cada 47.619 habitantes (2,1/100000) que se encuentra dentro del rango descrito en diferentes países y menor que la prevalencia encontrada en Valencia.

País	Prevalencia en 100.000 habitantes	Referencia
Birmingham	6,2	312
Dinamarca	5	313
EEUU	4,4	308
Valencia	4,2	315
Noruega	3,6	5
Colombia	3,2	310
Finlandia	3,0	309,314
Suecia	3,0	309
Gipuzkoa	2,1	Estudio actual

Tabla 40. Tabla de prevalencia del Síndrome de Usher en diferentes países. Modificada de Espinos et al.³¹⁵

En nuestra población la mutación mayoritaria ha sido la **mutación p.Cys759Phe** (el 37,5% de las familias con RP sindrómicas y no sindrómicas con mutación en el gen USH2A presentaba esta mutación) encontrada en segundo lugar en las familias españolas según el grupo de Ayuso.³¹⁷ La mutación c.2299delG (p.Glu767SerfsTer21), la más frecuente en España y a nivel mundial, se ha encontrado en heterocigosis compuesta en una sola familia con síndrome de Usher y en otra familia con RP no sindrómica de nuestro estudio.^{220,221} En nuestro estudio hemos encontrado mutaciones esperadas en el Sd. Usher en el 41,6% de familias y en el 33,3% de familias mutaciones en el gen USH2A. Este porcentaje es mayor que el obtenido por Weston et al. (2000)³¹⁸ en una población heterogénea en cuanto a su origen, probablemente debido a la mejoría de las técnicas de detección molecular en los últimos años. Pero este porcentaje sigue siendo inferior al nivel de detección descrito por Dreyer et al. (2000)³¹⁹ en la población con USH2 del norte de Europa, donde encontraron mutaciones en el gen USH2A en el 87% de sus pacientes. Las mutaciones encontradas en nuestros pacientes han sido descritas anteriormente excepto la mutación p.Trp4464Ter.

5.1. Correlación genotipo-fenotipo Síndrome de Usher

En un estudio del grupo de Ayuso y colaboradores (2015) donde analizaron molecular y fenotípicamente a 433 pacientes con Síndrome de Usher concluyen que las diferencias en la clínica son estadísticamente significativas en el USH1 respecto al USH2.³¹⁷ En nuestro estudio al comparar los pacientes con USH1 y USH2 vimos que la edad de diagnóstico era menor para USH1 (12,5 años) que para USH2A (26,1 años). Estos resultados se pueden equiparar al estudio de Ayuso donde las edades de diagnóstico son de 15,6 y 26,8 años respectivamente. La mutación más frecuente fue la p.Glu767SerfsTer21(c.2299delG) que se ha encontrado en muchas familias de origen europeo, con una frecuencia alélica del 15-50%²²⁰ y la segunda mutación en frecuencia fue la mutación p.Cys759Phe que es la mutación predominante en nuestro estudio. Se vio que ninguno de los pacientes con la mutación p.Cys759Phe presentaba un fenotipo severo de pérdida de audición y más del 60% presentaban pérdida leve de audición. Al contrario, los pacientes con la mutación p.Glu767SerfsTer21 presentaban en su mayoría (72,1%) sordera moderada. Nuestro estudio no tenía la potencia suficiente debido al tamaño muestral para correlacionar el genotipo con el fenotipo. Hemos descrito una peor agudeza visual en los pacientes USH1 y el 100% de pacientes tanto en USH1 como USH2 presentaban ceguera legal.

La mutación p.Cys759Phe en homocigosis se ha relacionado clásicamente con RPAR sin pérdida auditiva.²¹⁵ Otros grupos, entre ellos el grupo de Ayuso han descrito casos de heterocigosis compuesta de p.Cys759Phe con otras mutaciones en el gen USH2A que se asocian a RPAR o a USH2 indistintamente. No se han descrito casos de USH2 en homocigosis para la mutación p.Cys759Phe y fenotipo con pérdida auditiva como se ha demostrado en nuestro estudio. Por lo tanto, pacientes que presentan esta mutación podrían beneficiarse de un examen auditivo.

Recientemente Lenassi et al. (2015)³²⁰ han publicado un estudio de correlación genotipo-fenotipo en pacientes con mutaciones en el gen USH2A y han visto que existen 6 variantes retina-específicas donde sólo se afecta la retina y el paciente preserva la audición. Se incluye la mutación ampliamente descrita como retina-específica c.2276 G>T, p.(Cys759Phe) y otras 5 variantes: c.2802T>G, p.(Cys934Trp); c.10073G>A, p.(Cys3358Tyr); c.11156G>A, p.(Arg3719His); c.12295-3T>A; y c.12575G>A, p.(Arg4192His). Los autores proponen un modelo de jerarquía alélica donde la presencia de al menos un alelo retina-específico en un paciente con mutaciones en el gen USH2A daría lugar a la preservación de la audición (figura 59).

Una vez más son necesarios estudios de correlación genotipo-fenotipo, puesto que pueden mejorar el manejo clínico, consejo genético y estimar un pronóstico tanto visual como auditivo.

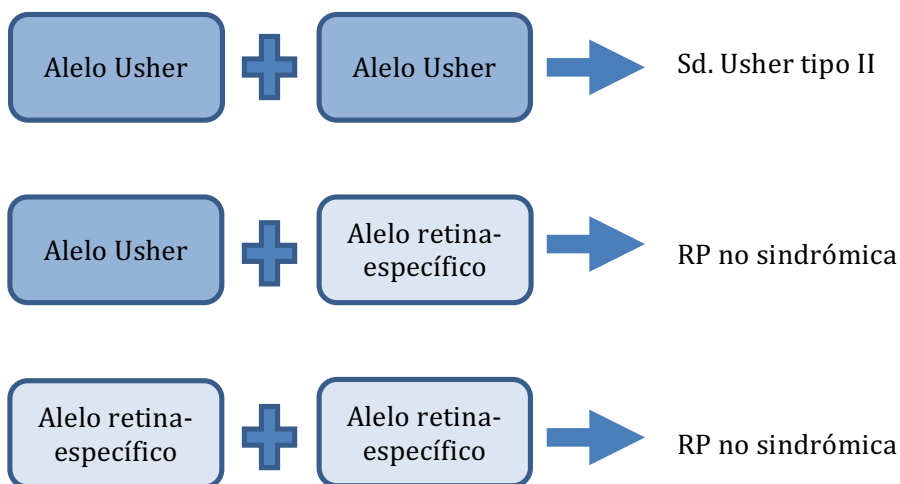


Figura 59. Esquema que muestra la jerarquía alélica propuesta de mutaciones USH2A: la presencia de al menos un alelo USH2A específico de la enfermedad de la retina (retina-específico) en un paciente con enfermedad relacionada con USH2A da como resultado una audición normal, al menos en la infancia.³²⁰

6. Síndrome de Bardet Biedl

La prevalencia en Gipuzkoa del síndrome de Bardet-Biedl en el presente estudio ha sido de 0,00084%, es decir 1 paciente por 119.048 habitantes. Esta prevalencia se encuentra por encima del rango de prevalencias encontradas en Europa (de 1:125000 a 1:160000)^{311,321,322} y por debajo de la población Árabe (1:65000)³²³; y poblaciones aisladas con una mayor incidencia de este síndrome como Terranova (1:13000)³²⁴, Kuwait (1:17000)³²⁵ e islas Feroe (1:3700).³²⁶

Hasta ahora se han identificado 15 genes asociados al Sd. de Bardet Biedl.³²⁷ La mayoría de los genes BBS se pueden dividir en 2 grupos. Uno forma un complejo llamado BBSoma (BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8 y BBS9), que se cree que recluta glutamil transpeptidasa Rab8,³²⁸ y el segundo grupo comprende proteínas de tipo chaperonina,³²⁹ incluyendo BBS6, BBS10 y BBS12. Las mutaciones en los genes BBS conocidos se detectan en aproximadamente el 75% de las familias, y BBS1 y BBS10 representan cada una entre el 20% y el 25% de las familias de descendencia europea.^{234,330} Se han descrito 2 mutaciones ampliamente distribuidas derivadas de un efecto fundador, la mutación p.Met390Arg en BBS1^{234,331} y la mutación p.Cys91Leufs en BBS10.³³⁰ La variante

p.Met390Arg es la mutación BBS1 más común y se ha observado en aproximadamente el 80% de las familias con enfermedad asociada a BBS1.^{181,331} En nuestra población hemos encontrado la mutación responsable del Sd. Bardet-Biedl en el 66,6% de los casos y la mutación más frecuente hallada ha sido la mutación **p.Met390Arg** en el gen **BBS1**, que corresponde con la mutación más frecuente en la literatura. Nuestro estudio ha demostrado una buena rentabilidad diagnóstica en los casos de sospecha de Sd. de Bardet Biedl.

6.1. Correlación genotipo-fenotipo Síndrome de Bardet Biedl

Respecto a la correlación genotipo-fenotipo, el síndrome de Bardet Biedl se engloba dentro de las enfermedades raras denominadas ciliopatías las cuales presentan fenotipos que se solapan, además existe una alta variabilidad intra e interfamiliar en la presentación clínica, lo cual complica el diagnóstico de este síndrome. Diferentes autores sugieren que los pacientes con variantes patogénicas en BBS12 y BBS10 (genes BBS de tipo chaperonina) presentan un fenotipo más severo que el grupo de pacientes con cambios en el gen BBS1.³³²⁻³³⁴ Quizá el distinto papel funcional ejercido por las proteínas BBS tipo *chaperonina* (BBS6, BBS10 y BBS12) respecto a las que forman el complejo BBSoma (BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8 y BBS9), podría explicar esas diferencias en la severidad del fenotipo asociado, como proponen Daniels et al. (2012).³³⁵

Castro-Sánchez et al.³³² en un estudio de 52 pacientes, destaca la frecuencia de afectación urogenital mostrada por pacientes con cambios en BBS10 (83%) y la prevalencia de alteraciones cognitivas en pacientes BBS12 (75%), este último dato en contraposición clara a lo referido por Deveault et al. (2011).³³⁶ En nuestro estudio, también destaca la mayor severidad fenotípica en el paciente con alteraciones en el gen BBS12, presentando el síndrome completo y un retraso mental más severo que el resto de pacientes.

Respecto al fenotipo ocular, sólo el 50% de pacientes presentó la triada clásica de RP. La mitad de pacientes carecían de espículas óseas en media periferia. Sólo el paciente con mutación en el gen BBS12 de los pacientes con Sd. de Bardet Biedl con genotipado positivo presentó espículas óseas en el fondo de ojo y anillo de hiperautofluorescencia macular. No hubo diferencias en la agudeza visual entre grupos ni en el porcentaje de ceguera legal entre los pacientes. Por lo tanto, al igual que el grupo de Castro-Sanchez consideramos que el fenotipo ocular de pacientes afectados de BBS1 no se debería considerar como leve comparándolo con el resto de fenotipos BBS.

Para un diagnóstico correcto de este síndrome, en nuestro estudio las dos características que se presentan en el 100% de los pacientes ha sido la existencia de polidactilia y distrofia retiniana. Por lo tanto, ante cualquier paciente afecto de distrofia retiniana deberíamos preguntar por la existencia de polidactilia y en ese caso descartar mutaciones en el gen BBS. Para complicar aún más el diagnóstico se han documentado casos de RP no sindrómica con la mutación p.Met390Arg en el gen BBS1.³²⁷

Tras la revisión de diferentes datos fenotípicos descritos en la literatura hacemos extensiva la recomendación del grupo español de realizar un seguimiento más frecuente de los pacientes BBS con variantes causales en BBS10 y BBS12, ya que su espectro clínico es generalmente más severo y de inicio temprano, prestando especial atención al aparato urogenital y la detección y tratamiento de anomalías en el desarrollo. Gracias a estos estudios de correlación genotipo-fenotipo podemos contribuir a un mejor manejo de los pacientes afectados.

7. Características clínicas de la RP en Gipuzkoa

7.1. Síntoma al diagnóstico y edad media de diagnóstico. Correlación genotipo-fenotipo

La edad media de diagnóstico fue de 29 años con un amplio rango de edad (de 1 a 70 años). Este amplio rango en la edad de diagnóstico fue un resultado esperado, debido a la gran heterogeneidad clínica de la RP. En un estudio de 370 pacientes con RP vieron que la edad media de diagnóstico fue de 35,1 años.³³⁷ Puede que haya un sesgo entre el inicio de síntomas y diagnóstico dependiendo de la población estudiada y el acceso a la sanidad.

En general, según el tipo de herencia la edad de inicio varía, de más precoz a más tardía serían las formas RPLX, RPAR y RPAD.

La RP de inicio precoz se diagnostica alrededor de los 2 años de edad. Genes asociados a RP precoz incluyen RPE65, CRB1 y TULP1.^{29,338,339} En nuestro estudio pacientes que han tenido un inicio precoz de la enfermedad presentaban las mutaciones en los genes **CRB1** y **TULP1**, pero también hemos encontrado otras mutaciones como **CERKL**, **RP1**, **RLBP1**, **PDE6A** y **BBS12**. Señalar que todos los pacientes presentaban formas recesivas de la enfermedad, incluyendo un síndrome de Bardet Biedl asociado a un fenotipo más severo. Debido al número reducido de pacientes por mutación no podemos concluir que dichas mutaciones se asocien a formas precoces de la enfermedad.

La RP de inicio tardío, normalmente el diagnóstico ocurre en la edad adulta y se asocia típicamente a las formas dominantes. El gen CRX es uno de los propuestos como causa de RPAD de inicio tardío.³⁴⁰ En nuestro estudio, los siguientes genes se han asociado a formas tardías de RP: **RHO**, **SNRP200** y **RIMS1**. Todos ellos asociados a formas dominantes. Tres pacientes con mutaciones en el gen RHO presentaban además RP sectorial, que se asocia a formas más leves. Aunque las formas recesivas generalmente se inician más precozmente, existen fenotipos leves como es el caso de la mutación **p.Cys759Phe** en el gen USH2A, en nuestro estudio 2 pacientes con dicha mutación fueron diagnosticados a partir de los 40 años.

El principal síntoma al diagnóstico ha sido la nictalopía seguido de disminución de AV. Todos los pacientes con mutaciones asociadas a un inicio precoz de la enfermedad fueron diagnosticados por disminución de AV como síntoma principal y no nictalopía. Así, ante pacientes con sospecha de RP que acuden refiriendo como principal síntoma disminución de AV en vez de nictalopía, debemos pensar en mutaciones causantes de RP de inicio precoz.

7.2. Agudeza visual y equivalente esférico

Se han visto diferencias estadísticamente significativas en la AV, siendo mejor en pacientes con RPAD y peor en las formas de RPLX y RPAR. Respecto al equivalente esférico (EE) la media ha sido de miopía leve (-0,72 y -0,75D en OD y OI). En la literatura también está descrita esta desviación hacia la miopía leve en los pacientes con distrofias retiniana, con una media de EE de -1,86 comparado a la media de +1,0 en la población sana.³⁴¹

Si lo dividimos por tipos de herencia existe una tendencia a la miopía leve en todos los grupos del presente estudio excepto en los pacientes con RPLX que presentan una media de -5D. Este error de refracción es el mismo descrito por diferentes autores.^{35,341} Pero también existen ciertas mutaciones que se asocian a RP e hipermetropía, sobretudo en las formas precoces y ACL como son mutaciones en GUCY2D, RPGRIP1, CRX o CEP290.³⁵ En nuestra serie sólo hemos encontrado hipermetropía asociada a mutaciones en los genes CRB1 y PRPF8, y sólo el CRB1 se ha asociado a RP de inicio precoz.

7.3. Ceguera legal

Existen pocos estudios que hacen referencia al porcentaje de ceguera legal de los pacientes de RP. La mayoría de datos vienen de las asociaciones de pacientes con baja visión como la ONCE en España y *Foundation Fighting Blindness* en EEUU. Debido al

impacto social y económico que representa la ceguera legal en la población actual decidimos calcular este porcentaje en nuestra serie. En total más de la mitad (58%) de los pacientes presentaban ceguera legal. Por tipo de herencia el 45% de pacientes con RPAD y RPesp, el 70% de pacientes con RPAR y el 83% de pacientes con RPLX padecían ceguera legal. Como el grupo más numeroso de pacientes es el grupo RPAR, en global en nuestra serie el 55% de ciegos legales pertenecen a RPAR, el 25% a RPAD, el 15% a RPesp y sólo un 5% a RPLX.

En un estudio multicéntrico en Japon donde incluyeron 29 centros de rehabilitación visual, la RP fue la mayor causa de déficit visual o ceguera, afectando a un 25% de los pacientes.²³ En Kuwait, la RP fue la causa principal de incapacidad visual en menores de 60 años,²⁴ y en Dinamarca, la RP junto con la neuropatía óptica fueron las causas principales de ceguera en personas entre 20 y 64 años, alcanzando cada uno un porcentaje del 29% de los casos.²⁵ En Gipuzkoa hasta Noviembre de 2017 hay registrados 942 afiliados a la ONCE, 507 mujeres (54%) y 435 hombres (46%). Por patologías la RP se encuentra en segundo lugar representando un 13,1% de los afiliados en Gipuzkoa (tabla 41). En un estudio elaborado por la fundación retinaplus donde se calculó el coste de la ceguera por patología en España, se vió que la RP se encontraba en segundo lugar en cuanto a coste de la ceguera anual por persona (1.479,95€), detrás de la retinopatía diabética y delante de la DMAE, las cuales son enfermedades muy prevalentes pero que producen ceguera en edades más avanzadas en la mayoría de casos. Así, aunque la RP se considera una enfermedad rara, su impacto económico y social es importante.

Patología	Porcentaje (%) de afiliados a ONCE Gipuzkoa
Miopía magna	24
Retinosis Pigmentaria	13,1
Atrofia nervio óptico	10,8
DMAE	9,8
Glaucoma	4,6
Desprendimiento de retina	3,6
Catarata	3,5
Retinopatía diabética	2,5

Tabla 41. Porcentaje de afiliados a la ONCE en Gipuzkoa por las patologías más frecuentes.

7.4. Triada clásica

La triada clásica de atenuación arteriolar, palidez papilar y pigmento en forma de espículas óseas se encuentra dentro de los criterios diagnósticos de la RP. En nuestro estudio el 83,5% de pacientes la presentaba. Sólo en el 50% de pacientes con Sd. de Bardet Biedl se encontraron espículas óseas en el fondo de ojo. Por mutaciones resaltar que los pacientes con mutaciones en el gen BBS1 no presentaban espículas óseas en el fondo de ojo, lo cual puede ayudarnos a orientar el diagnóstico genético en las formas sindrómicas.

7.5. RP sectorial

Mutaciones en los genes RHO y PRPF31 se han asociado a RP sectorial.^{287,342} En el presente estudio el 78% de pacientes con diagnóstico clínico de RP sectorial presentaban mutaciones en el gen RHO. También se describe la RP sectorial en 2 pacientes aislados con mutación en el gen SNRNP200 y PRPF8 que no se ha descrito anteriormente. Las espículas óseas se encontraban en los cuadrantes nasal e inferiores.

Tras los resultados obtenidos en el presente estudio, recomendamos buscar mutaciones en el gen RHO a los pacientes afectados de RP sectorial dada su alta rentabilidad diagnóstica.

7.6. Complicaciones oculares

7.6.1. Catarata

El origen y el mecanismo fisiopatológico de la formación de la catarata subcapsular posterior (CSP) en la RP se desconoce, se ha sugerido que la degeneración retiniana produce una cápsula posterior hiper celular y la característica catarata (figura 60).³⁴³ Como característica clínica específica de la catarata en los pacientes con RP, estudios previos han publicado opacidades subcapsulares a una edad más temprana. La edad media a la que se someten a cirugía de catarata estos pacientes se adelanta, diferentes estudios han descrito cirugía de catarata a edades comprendidas entre los 47 y 62 años, a diferencia de la cirugía de catarata senil que se encuentra entre los 72 y 74 años.³⁴⁴

La prevalencia de cataratas en RP varía según los estudios. Fishman et al. demostraron en 338 pacientes un 53% de CSP (incluyendo los pacientes intervenidos previamente de catarata).³² Heckenlively et al. encontraron en un grupo de 291 pacientes con diferentes distrofias retinianas un 41% de CSP; de los pacientes con coroideremia un 31% presentó CSP, un 42% en el grupo de síndrome de Usher y un 28% en el grupo de distrofias de conos y bastones.³⁴⁵ En el presente estudio en 164 pacientes afectados de RP el 62% presentó catarata o estaba intervenido de catarata. No encontramos diferencias en sexo en

la prevalencia de cataratas. Tampoco parece que existan diferencias dependiendo del tipo de mutación, aunque el tamaño muestral es insuficiente.

En la tabla 42 se muestra la prevalencia de catarata según el tipo de herencia en dos estudios diferentes. En nuestro estudio, las formas recesivas y esporádicas presentaban mayor porcentaje de catarata, pero el resultado no ha sido estadísticamente significativo (Chi-cuadrado de Pearson $p=0,13$).

	Número pacientes	% catarata en RPAD	% catarata en RPAR	% catarata en RPLX	% catarata en RPesp
Heckenlively et al. 1982	291	49	48	40	39
Irigoyen et al. 2017	164	51	66	50	74

Tabla 42. Prevalencia de catarata según tipos de herencia de RP en diferentes estudios.

Fishman et al. demostraron una probabilidad del 41% (en RP-AD) al 90% (en RP-ligX) de presentar CSP a los 40 años, mientras que la probabilidad de presentar catarata a los 60 años alcanza más del 80% en muchos tipos genéticos de RP.³² En nuestro estudio, el 62% de los pacientes presentaba catarata en el momento del estudio, pero vemos que, si ajustamos los casos de cataratas por grupos de edad, esa cifra aumenta considerablemente con la edad. A partir de los 40 años entre el 50 y 81% de pacientes presentará catarata (figura 41).

De 0 a 19 años ningún paciente presentó catarata, aunque en el grupo de RPLX no tenemos pacientes para este grupo de edad para valorarlo. Jackson et al. en un estudio retrospectivo de 142 ojos vieron que la edad de cirugía se adelantaba 10 años en los pacientes con RPLX.³⁴⁶ En nuestro estudio en las formas ligadas al cromosoma X, las cuales presentan un fenotipo más agresivo y de aparición más precoz no se ha encontrado más frecuencia de catarata, probablemente debido al pequeño tamaño muestral.

En conclusión, los pacientes con RPLX parece que presentan catarata con más frecuencia y a edades más tempranas que el resto de tipos hereditarios de RP. Más del 50% de la población con RP independientemente del tipo de herencia desarrollará CSP a partir de los 40 años.

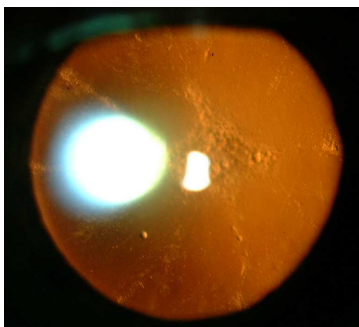


Figura 60. Catarata subcapsular posterior en paciente con RP.

7.6.2. Presión intraocular y OCT CFN

La PIO media en nuestra serie ha sido de 14,9 mmHg. El 5,5% de pacientes estaban diagnosticados de glaucoma, un porcentaje algo mayor que el 2,3% descrito por Peng et al.³⁷ y el 2,5% descrito para la población general en Europa.³⁴⁷

El grosor medio de capas de fibras nerviosas (CFN) medido mediante OCT ha sido de 95,3 μm y 92,3 μm en ambos ojos con la OCT Stratus y Cirrus respectivamente. No fue uno de los objetivos del estudio determinar el grosor de CFN, puesto que muchos pacientes debido a la baja visión o reducción en el CV no podían fijar para realizar la prueba correctamente y sólo se obtuvieron datos en el 60% de pacientes para el OD y 57% para el OI. El Stratus OCT tiende a dar valores superiores que el Cirrus OCT por lo que los resultados obtenidos con ambos aparatos no deberían ser intercambiables.³⁴⁸

Varios estudios histológicos de RP han demostrado que la disminución de la densidad de fotorreceptores y el adelgazamiento de la retina externa produce secundariamente una degeneración de la retina interna y capa de fibras nerviosas, mediante un daño transneuronal, compromiso vascular o compresión axonal.^{349,350} Así, Newman et al. demostraron en pacientes con distrofias retinianas, incluyendo RP, la evidencia de defectos en la CFN oftalmoscópicamente.³⁵¹ Diferentes autores han medido el grosor medio de la CFN en pacientes con RP, con un rango de 82,90 a 128 μm con diferentes aparatos de OCT (tabla 43). Más recientemente, Yildirim et al. han analizado la CFN mediante Sd-OCT a 22 pacientes con RP y el grosor medio ha sido de 95,57 μm . Concluyen que la Sd-OCT es un instrumento muy sensible y efectivo para detectar cambios en la CFN en pacientes con RP.³⁵² Además, la medida de la CFN puede proporcionar información sobre la progresión de la RP y podría ser útil como indicador pronóstico para futuros tratamientos.

Autor y año	País	OCT	Grosor medio CFN, μm
Yildirim, 2015 ³⁵²	Turquía	SD-OCT	97,57
Xue, 2013 ³⁵³	China	RTVue-OCT	115,82
García-Martin, 2013 ³⁵⁴	España	SD-OCT	82,90
Hwang, 2012 ³⁵⁵	Corea	Cirrus HD-OCT	112,76
Hood, 2009 ³⁵⁶	USA	Cirrus HD-OCT	128,20
Oishi, 2009 ³⁵⁷	Japón	FD-OCT	104,10
Irigoyen, 2017	España	Stratus y Cirrus-OCT	95,3 y 92,3

Tabla 43. Grosor medio de capa de fibras nerviosas (CFN) medido mediante OCT según diferentes autores.

7.6.3. Patología macular: MER, EM, OCT, Anillo hiperautofluorescencia.

7.6.3.1. Hallazgos en OCT

La tomografía de coherencia óptica (OCT) es una prueba no invasiva que proporciona información morfológica de la retina. Evalúa la interfaz vitreoretiniana, el contorno y el grosor de la retina, la presencia de líquido subretiniano e intrarretiniano, y la capa de fotorreceptores y el estado del EPR. Comparado con la OCT de dominio tiempo, la OCT de Fourier o dominio espectral proporciona una mayor resolución axial y velocidad de escaneo permitiendo más detalles de los cambios estructurales dentro de las capas de la retina, específicamente el segmento externo, el segmento interno, la capa nuclear externa y el EPR.²⁸⁷

Tenemos que tener en cuenta que, según la resolución del aparato, las medidas de espesores retinianos serán diferentes. Las líneas de referencia que se emplean para marcar el límite interno y externo de las mediciones son distintas para unos y para otros. De acuerdo con el fabricante, el programa del Stratus OCT mide espesor retiniano desde la capa de fibras nerviosas de la retina (CFN) hasta el límite interno del epitelio pigmentario de la retina (EPR). El fabricante del Cirrus HD dice que las mediciones del aparato están comprendidas entre la CFN y la banda externa del EPR. Ambas OCT tienen por tanto una banda externa de referencia distinta, que en el caso del Cirrus HD es mucho más profunda. Esto origina que las mediciones del espesor macular del Cirrus HD sean superiores a las del Stratus. El grupo español de la Dra. Pinilla en un estudio realizado en 132 sujetos sanos ha encontrado una diferencia media de 63,8 μm en el espesor macular central.³⁵⁸

Existen, por tanto, variaciones en las mediciones de los distintos sistemas de OCT en la valoración del espesor retiniano macular. El grado de variabilidad nos indica que los

pacientes deberían ser preferentemente seguidos con un mismo aparato, aunque se pueden correlacionar los resultados obtenidos con los diferentes tomógrafos.

La OCT se ha utilizado para estudiar la relación entre la función visual y la estructura retiniana: se han realizado diferentes estudios comparando los hallazgos de la OCT (grosor y volumen macular, estado de líneas de fotorreceptores, grosor de capa nuclear externa, presencia de EMQ y MER...) con la perimetría automatizada, la microperimetría, ERGmf y agudeza visual. A continuación, resumimos algunos de los hallazgos derivados de estos estudios.

La relación entre la estructura de la retina y la función visual se ha estudiado en pacientes con RP que utilizan OCT de dominio Fourier y perimetría automatizada, así como microperimetría.^{359,360} En pacientes con RP, el grosor de los fotorreceptores como se demostró en la OCT disminuye con la pérdida de la sensibilidad del campo visual.³⁵⁹

Las líneas de los fotorreceptores en la OCT se han asociado al pronóstico visual de los pacientes. Como uno de los primeros cambios histopatológicos en la RP es el acortamiento de los segmentos de los fotorreceptores (figura 61 y 62), la integridad de las líneas de los fotorreceptores se han estudiado ampliamente: la membrana limitante externa (MLE), la zona de elipsoides (EZ) y la zona de interdigitación (IZ). Se ha visto que la primera línea en afectarse es la IZ, seguida de la EZ y por último la MLE. Estos hallazgos clínicos son consistentes con los cambios histopatológicos y confirman que las primeras alteraciones en la RP se producen en los segmentos externos de los fotorreceptores.^{34,349}

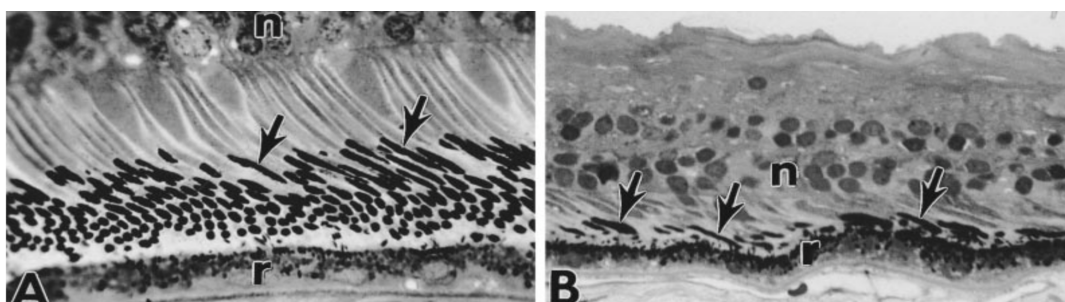


Figura 61. Localización de la rodopsina mediante inmunohistoquímica en una retina normal (A) y la retina de un hombre con RPLX (B). Los bastones en la retina normal (A) tienen inmunoreactividad a la rodopsina restringida a los segmentos externos largos y delgados (flechas). r, EPR; n, núcleos de los fotorreceptores. Los bastones en la retina RP (B) tienen inmunoreactividad para la rodopsina en segmentos externos notablemente acortados (flechas). r, EPR. $\times 500$. Reproducido de (Milam y Li, 1995)³⁴⁹ con permiso de la Dra. Milam.

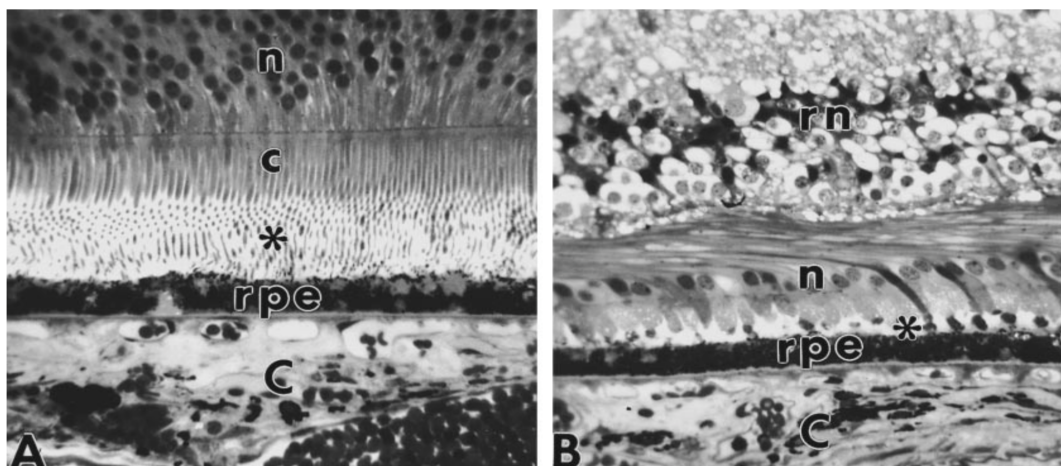


Figura 62. La fovea de la retina humana normal (A) contiene de seis a ocho filas de núcleos fotorreceptores tipo cono (n). Los conos tienen segmentos internos delgados (c) y segmentos externos largos y delgados (*); RPE, EPR; C, coroides. La figura B muestra la mácula de un hombre con RPLX cuya agudeza visual era 6/120. Los fotorreceptores se reducen a una monocapa de núcleos de conos con segmentos externos muy cortos (*); RPE, EPR; n, núcleos de conos; rn, capa nuclear interna; C, coroides. $\times 500$. Imagen cedida por la Dra. Milam.³⁴⁹

En la RP tras la degeneración de los segmentos externos de los fotorreceptores se produce un adelgazamiento de la capa nuclear externa (ONL). Estos cambios se han correlacionado con la función visual de los pacientes. Estudios recientes han demostrado que la disminución del campo visual se relaciona directamente con el adelgazamiento de los segmentos externos de los fotorreceptores³⁶¹ y la extensión de la línea EZ se corresponde con el campo visual remanente.³⁶²

Diferentes estudios clínicos han informado correlaciones entre la línea EZ y la AV.^{363,364} Basándose en la longitud de la línea EZ, los pacientes con RP se separaron en tres grupos (estadio 1: zona de elipsoides no visible, estadio 2: zona de elipsoides alterada y estadio 3: zona de elipsoides normal), y se encontró que la AV era significativamente mejor con una línea EZ conservada.³⁶⁴ En nuestro estudio también dividimos a los pacientes en estos 3 grupos y vimos al igual que Aizawa et al.³⁶⁴ que en los casos en los que la zona de elipsoides estaba preservada los pacientes tenían mejor AV. Al estudiar la extensión de la zona de elipsoides Aizawa et al. vieron que la AV se correlacionaba con la extensión de la zona de elipsoides, a mejor AV mayor extensión. En nuestro estudio no vimos esta correlación, sugiriendo que la buena AV de nuestros pacientes depende más de la integridad de la zona de elipsoides que de su extensión, y la extensión de la zona de elipsoides podría estar relacionada más con el campo visual. Estos resultados sugieren que la presencia de la línea EZ se asocia a una función preservada del fotorreceptor en RP.

Sin embargo, al comparar la línea EZ con las amplitudes del ERGmf, vieron una correlación débil, pacientes con línea EZ intacta presentaron amplitudes reducidas en el ERGmf. Esto lo explican por la teoría de que el daño funcional visto en el ERGmf precede al estructural valorado mediante la OCT.^{365,366}

Respecto a la retina interna, se ha demostrado su preservación incluso en casos de adelgazamiento de la retina externa.³⁵⁶

El grosor macular y el volumen macular también se han asociado a la función visual. Sugita et al. estudiaron la correlación entre la amplitud del ERGmf y el volumen macular y encontraron una correlación positiva.³⁶⁷ En nuestro estudio sólo se describen los grosores maculares centrales y no se correlacionaron con la función visual, debido a la falta de tecnología como el ERGmf. En un futuro se podrán realizar estudios de este tipo gracias a la adquisición del equipo de electrofisiología ocular para la ampliación de este proyecto.

La OCT es la herramienta adecuada para detectar complicaciones secundarias en la RP, como la membrana epirretiniana (MER) y el edema macular quístico (EMQ).^{368,369} Al comparar con la población general, la patología macular es más prevalente en pacientes con RP^{370,371} y se ha observado en el 45,1% de ojos en RP.³⁷² En diferentes estudios clínicos, el EMQ se presentó del 5,5 al 24,5%,^{371 372} y la prevalencia de la MER se informó en el 0,6 al 27,3% de los casos.^{34,370} Aunque la prevalencia de anomalías maculares fue diferente en varios estudios,^{370,372} como se muestra en la tabla 44, los resultados mostraron que la anomalía más frecuente fue el EMQ y MER dependiendo de los estudios, seguido de síndrome de tracción vitreomacular (TVM) y agujero macular.³⁷⁰ Hajali et al. informaron una prevalencia del 38% de EMQ en al menos un ojo en pacientes con RP. Aunque no fue estadísticamente significativa, se encontró que la prevalencia del EMQ era del 52% para RPAD, 39% para RPAR, 39% para RPesp y ninguna para RPLX.³⁶⁹ En nuestro estudio la patología más frecuente fue la MER (27,8%) seguida del EMQ (25,3%) y por tipos de herencia al igual que Hajali et al. no vimos diferencias estadísticamente significativas para el EMQ ni para la MER.

Makiyama et al. vieron que la presencia de MER y TVM se asociaba al EMQ,³⁷² y la mayoría de los casos de edema macular en el estudio clínico se encontraron acompañados de MER y TVM.³⁷² La cirugía de cataratas y el genotipo fueron los otros factores relacionados con la presencia de EMQ y se ha informado que el EMQ es más frecuente en los grupos de RPAD en comparación con los grupos de RPAR, RPesp y Usher II.³⁶⁹ En nuestro estudio también

encontramos la asociación de EMQ y MER; el 60% de pacientes con EMQ presentaba asociada una MER. En nuestro estudio el EMQ fue más frecuente en el grupo de RPAR (44,6%), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Intentamos analizar las mutaciones que se asociaban al EMQ, pero debido al pequeño tamaño muestral en cada mutación no podemos concluir que el EMQ se asocia a determinadas mutaciones, son necesarios estudios a gran escala para poder realizar este tipo de asociaciones.

La MER se ha presentado en la mayoría de estudios como la segunda alteración macular macroscópica más frecuente en pacientes con RP,³⁷⁰ con una incidencia del 19,8% después del edema macular.³⁷⁰ Muchos factores se han relacionado con la MER, como el origen étnico, los factores de riesgo ambientales y la edad,³³ pero la proliferación de astrocitos fibrosos y la remodelación de la CFN también se han postulado como responsables de la aparición de MER en pacientes con RP. Por lo tanto, las observaciones de las estructuras maculares por OCT ayudan a encontrar alteraciones maculares y también a proporcionar una idea de la patogénesis de la RP.³⁴

Dado que las alteraciones maculares causan la pérdida de visión en cualquier estadio de la RP,³⁷² es importante evaluar la estructura macular en el tiempo en estos pacientes. Se ha demostrado que la OCT es igual o incluso más sensible que la angiografía fluoresceínica para detectar el EMQ en RP.³⁷¹ Por lo tanto, el *screening* mediante OCT es muy recomendable para evaluar alteraciones maculares en estos pacientes.

La tecnología avanza continuamente y ya se han publicado los primeros estudios con OCT-angiografía (OCT-A) en pacientes con RP. Sugahara et al. en un trabajo publicado en el 2017 han descrito que la densidad de flujo vascular parafoveal en la capa vascular profunda y la zona superficial avascular foveal son factores asociados a la AV de los pacientes.³⁷³

Por último, recientemente características descritas en la OCT se postulan como posibles biomarcadores en pacientes con distrofias retinianas.³⁷⁴ La Sd-OCT sirve tanto como biomarcador estructural, al valorar el grosor retiniano y la presencia o no de complicaciones maculares como la MER y el EMQ; como marcador ultraestructural al valorar la integridad de la zona de elipsoides y su transición entre retina sana y retina degenerada. Estos biomarcadores pueden ser útiles para monitorizar la progresión de la enfermedad en ensayos clínicos.^{375,376} También la OCT nos puede servir para orientar el

tipo de tratamiento más adecuado en nuestros pacientes, según el grupo de la Dra. Pinilla la terapia génica, las células encapsuladas y el trasplante de células madre o la visión artificial son aproximaciones terapéuticas que tendrán que utilizarse de forma individualizada, dependiendo cada caso no sólo del tipo de la enfermedad y su herencia, sino también del estado funcional y anatómico de la retina.¹⁰⁰ La elección de un tipo de terapia y el momento de su aplicación va a ser determinante para su éxito, y para ello la OCT se convierte en una herramienta imprescindible para la evaluación del estado de la retina y elección del tipo de terapia más adecuado. Por ejemplo: La utilización de terapia génica o células encapsuladas sólo será útil si todavía se conserva la capa de fotorreceptores. La persistencia de axones de las células ganglionares será un requisito básico a la hora de plantear el trasplante de células madre, ya que es necesario que existan fibras para poder transmitir la señal visual al sistema nervioso central. Una vez han desaparecido dichas células estas aproximaciones terapéuticas carecen de utilidad y se podría plantear la visión artificial. Además, la OCT será necesaria en el seguimiento y evaluación de los distintos tratamientos.

Autor y año	País	Tipo de OCT	% Edema macular	% MER	% TVM	% Agujero macular
Testa, 2014 ³⁷⁰	Italia	SD-OCT	20,4 (237/1161)	15,6 (58/1161)	5 (58/1161)	2(23/1161)
Hagiwara, 2011 ³⁷⁷	Japón	SD-OCT	5,5 (34/622)	0,6 (3/622)	0,8 (5/622)	0,5 (3/622)
Giusti, 2002 ³⁷⁸	Italia	SD-OCT	12,5 (22/176)	27,3 (48/176)		4,5 (8/176)
Makiyama, 2014 ³⁷²	Japón	SD-OCT	22,5 (119/529)			
Hirakawa, 1999 ³⁷¹	Japón	Cirrus-OCT	13,0 (12/89)			
Hajali, 2008 ³⁶⁹	EEUU	Stratus-OCT	38 (47/124)			
Gorovoy, 2013 ³⁷⁹	EEUU	Stratus-OCT	24,5 (22/90)			
Irigoyen, 2017	España	Cirrus y Stratus-OCT	25,3 (40/158)	27,8 (44/158)	1,2 (2/158)	0,6 (1/158)

Tabla 44. Porcentaje de edema macular, membrana epirretiniana (MER), tracción vitreomacular (TVM) y agujero macular diagnosticado mediante OCT en diferentes estudios poblacionales.

7.6.3.2. Anillo hiperautofluorescente macular

La imagen de autofluorescencia de fondo (AF) con un oftalmoscopio láser de barrido es una técnica no invasiva que ha demostrado su utilidad en numerosos estudios recientes de enfermedades retinianas hereditarias y adquiridas en humanos.³⁸⁰ El fluoróforo principal (lipofuscina) se acumula en las células epiteliales del EPR y es derivado de los segmentos externos del fotorreceptor. Algunos pacientes con RP tienen AF de fondo anormal en forma de anillo parafoveal de alta densidad que no es visible en el examen oftalmoscópico de rutina y que varía en tamaño entre pacientes.^{207,381} El anillo hiperfluorescente puede ser debido a disfunción celular precoz y sobreproducción de lipofuscina.³⁸² El tamaño del anillo de alta densidad se ha correlacionado con la amplitud del componente P50 del electroretinograma patrón (PERG) y el electroretinograma multifocal (ERGmf) en pacientes con buena agudeza visual,^{380,381} lo cual indica diferentes grados de preservación del sistema de conos sobre las áreas de la mácula central. Fuera del anillo de AF, se evidencia la degeneración de fotorreceptores mediante la pérdida de la zona de elipsoides y membrana limitante externa y el adelgazamiento o ausencia de la capa nuclear externa en la SD-OCT.^{383,384} En resumen, se considera que los anillos de AF reflejan una transición entre la función retiniana normal y alterada, con una función relativamente normal en las áreas retinianas internas al anillo, reducida dentro del anillo y ausentes fuera del anillo.^{178,376,384-387} Estos anillos no se consideran genotipo-específicos y se observan en todos los tipos hereditarios de RP (RPAD, RPAR y RPLX) y en las formas sindrómicas.^{382,383}

Se ha sugerido que el anillo de AF puede ser una manifestación relativamente tardía de la RP que avanza lentamente y que la constricción del anillo puede reflejar la pérdida progresiva del campo visual, conducida por la disfunción de los bastones y la consecuente disfunción de conos en áreas maculares centrales.³⁸⁸

El pronóstico para la preservación de la visión central puede ser mejor en pacientes con anillos grandes o que cambian lentamente. La ausencia de constricción del anillo de AF detectable en otros pacientes con agudeza visual normal puede reflejar una afectación macular más leve o menos progresiva. En pacientes con RP y agudeza visual normal, el anillo puede tener un valor pronóstico y puede ser útil para monitorizar la progresión de la enfermedad.³⁸² Además, los cambios en el anillo podrían ser una medida útil para valorar los efectos terapéuticos en futuros tratamientos para la RP. Sin embargo, no se entiende por qué no se encuentra dicho anillo en todos los pacientes con RP con evidencia clínica de preservación macular.³⁸⁰

En nuestro estudio al no ser un estudio longitudinal no se ha medido la progresión del anillo de AF. La presencia de AF se objetivó en el 61,5% de pacientes que accedieron a la prueba, quisimos valorar si patología macular como el edema macular y membrana epirretiniana se asociaba a la presencia del anillo, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Como se ha comentado anteriormente la presencia del anillo se da en todos los tipos de herencia, en nuestra serie el tipo de herencia con mayor frecuencia de anillo fue la RPAD con un 73,5% de sus pacientes con anillo, esto puede ser debido a que las formas dominantes tienen mejor pronóstico y el anillo se asocia a pacientes con RP tardía y buena AV. También observamos que los pacientes con el anillo presentaban una AV media y mediana mejores comparando con todos los pacientes incluidos en el estudio. Quisimos relacionar el anillo de AF con las mutaciones pero no ha sido posible sacar conclusiones debido al pequeño tamaño muestral en cada grupo. Se ha visto que las mutaciones más frecuentes encontradas en cada tipo de herencia en nuestra serie también presentan el anillo de AF: RHO, SNRP200, PRPF8, PRPF31, CERKL, USH2A, PDE6A, CRB1 y RP2. Serían necesarios estudios poblacionales más amplios para poder asociar el anillo de AF a diferentes mutaciones.

Por último, la autofluorescencia de fondo puede ser un marcador más sensible para la patología retiniana que la funduscopia o retinografía sola en la RP de inicio tardío, ya que los cambios en la AF en media periferia y el anillo hiperautofluorescente aparecen antes que los cambios objetivables en el fondo de ojo. Así, el uso precoz de imágenes de autofluorescencia de fondo en la evaluación de pacientes con lesiones sutiles de retina y quejas de pérdida de campo visual periférico puede ser una estrategia rentable y eficaz para el diagnóstico precoz.³⁸⁸

7.6.4. Drusas papilares

La prevalencia de drusas del nervio óptico en la población general estimado por Lorentzen es del 0,34%.³⁸⁹ Se ha descrito en general una mayor frecuencia en pacientes con RP, aunque los casos publicados varían entre el 1,4% y 80% y la mayoría están basados en estudios con poco tamaño muestral.³⁶ Grover et al. en un estudio con 262 pacientes de RP estimaron una frecuencia del 9,2% en pacientes con RP.³⁶ Por tipo de herencia, se objetivaron drusas en el 9,4% de pacientes RPAD, en el 7,1% de RPAR y en el 11,5% de RPLX.³⁶ En nuestra serie el porcentaje de drusas papilares ha sido mayor que en la población general, un 4,3%, pero menor al descrito por Gover et al. Respecto al tipo de herencia, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas debido al pequeño tamaño muestral en cada grupo. Cabría esperar que la prevalencia fuera mayor a

la descrita por Grover et al., ya que en el presente estudio que no sólo se utilizó la funduscopia para la detección de las drusas como los autores anteriores, sino que a muchos pacientes se les realizó la AF, la cual pone de manifiesto más fácilmente las drusas por su autohiperfluorescencia. El significado clínico de la presencia de drusas papilares en la función visual en pacientes con RP o la razón de su frecuencia más alta que en la población general se desconoce en la actualidad.

7.6.5. Test de colores

La mayoría de pacientes en estadios precoces de la enfermedad no presentan alteración en el test de colores. Este se ve afectado cuando se afectan los conos maculares. La deficiencia en la función de los conos azules (tritanopia adquirida) es característica de la RP avanzada. Los pacientes con visión $< 0,6$ y áreas de atrofia macular son los que peor realizan el test de colores. Los pacientes con RPAD se relacionan a mejores resultados en los tests de colores respecto a otras formas de RP.²⁹ En nuestra serie sólo 20 pacientes tenían alterado el test de colores y las formas dominantes preservaban mejor la visión de colores que las recesivas y esporádicas, aunque debido al pequeño tamaño muestral las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Esto sugiere una relación directa entre agudeza visual, función macular y resultados en el test de colores. Aunque sigue siendo un test básico utilizado en la práctica habitual en los pacientes con distrofias retinianas, los pacientes con baja visión no pueden realizar la prueba y a día de hoy tenemos herramientas más útiles para valorar la función macular como son la autofluorescencia y OCT macular.

7.6.6. Otra patología ocular. Atrofia macular

De los 19 pacientes con atrofia macular, 5 pacientes presentaban mutaciones en el gen **CERKL**. Uno de los pacientes estaba diagnosticado erróneamente de enfermedad de Stargardt por la atrofia macular. La atrofia macular ha sido la tercera complicación más frecuente en los pacientes con RP tras las cataratas y la patología macular. La OCT es en estos casos una herramienta útil para el diagnóstico.³⁶⁷ Habrá que sospechar atrofia macular en pacientes con RP y baja visión o estadios avanzados de la enfermedad.

8. Líneas futuras

A continuación, mostramos resumidamente las diferentes líneas de trabajo que han derivado de esta tesis y los proyectos asociados a RP del grupo de neurodegeneración sensorial del Instituto Biodonostia.

8.1. Diagnóstico genético molecular en las distrofias de la retina.

Como se ha comentado anteriormente, actualmente nuestro equipo de investigación está llevando a cabo el secuenciado completo de 316 genes asociados a distintas distrofias retinianas, utilizando una estrategia desarrollada por nuestro grupo de investigación, consistente en el secuenciado en *pool* de grupos de 64 muestras de pacientes, en combinación con un método de genotipado de alto rendimiento (Ezquerria-Inchausti et al.²⁵⁹). Aquellos pacientes sin resultados tras el secuenciado de estos genes, serán sometidos a secuenciado del exoma completo y/o al análisis de la variación del número de copias (CNV). El trabajo es parte de la tesis doctoral de Maitane Ezquerria del grupo de neurodegeneración sensorial del Instituto Biodonostia.

De acuerdo a la información actualizada al mes de abril de 2017, en el pasado I Congreso multidisciplinar de genética humana celebrado en Madrid, hay una clara tendencia al desarrollo de tecnologías que permitan un acercamiento real a la clínica del secuenciado del exoma completo. De hecho, en el Reino Unido hay un proyecto que ya ha comenzado a andar que se ha marcado como objetivo realizar el secuenciado del exoma completo a 100.000 individuos, con una cobertura considerada como para cumplir los estándares clínicos de al menos 100 lecturas por nucleótido. A pesar de que a día de hoy consideramos que esta metodología no es una realidad para la práctica clínica, sí somos conscientes de la gran celeridad en el avance en el campo de la secuenciación masiva, la interpretación y almacenaje de datos. De tal modo que cabría la posibilidad de que algunos de los pacientes con un diagnóstico negativo tras los primeros cribados por secuenciado de alto rendimiento de panel de 316 genes y análisis del número de copia, nos planteemos llevar a cabo un análisis del genoma completo, en lugar de secuenciar el exoma completo, si se produce un desarrollo suficientemente rápido de esta tecnología. Las principales ventajas asociadas al genoma completo vs. exoma, son:

- 1) Se analiza todo el genoma y no solo el 1% aproximadamente que representa la parte codificante.
- 2) Al no depender de técnicas de enriquecimiento, el secuenciado es un procedimiento técnicamente menos costoso, y más eficiente, ofreciendo una cobertura media de todo el

genoma muy homogénea, que permite la identificación de enfermedades generadas por reordenamientos del ADN.

3) A pesar de que no se puedan interpretar a día de hoy muchas de las variantes génicas encontradas en región no codificante, el disponer de toda la información del secuenciado completo del genoma hará posible una futura re-interpretación de las alteraciones halladas en los pacientes a medida que se avance en la interpretación de datos genómicos complejos.

Gracias a un proyecto financiado por la Acción Estratégica en Salud (PI17/01413) del Instituto Carlos III obtenido este año se ha podido ampliar el estudio a pacientes de Alava y Vizcaya.

8.2. Análisis de expresión de miRNAs-mRNAs

Ander Anasagasti, estudiante predoctoral del Instituto Biodonostia está llevando a cabo estudios en el modelo de ratón de RP, rd10. Partimos de la hipótesis de que, en las distrofias retinianas, se ve alterado un conjunto de mecanismos moleculares comunes a distintas formas de la enfermedad, con independencia del gen mutado. Esta idea se apoya en distintos trabajos en los que se ha descrito un patrón común de expresión diferencial tanto de genes, como de microRNAs en distintos modelos de distrofias retinianas, causados por mutaciones en genes diferentes.

Nuestro grupo ha venido realizando un estudio minucioso de la expresión del transcriptoma y de 1900 microRNAs en la retina de un modelo del ratón rd10, portador de una mutación espontánea en el gen PDE6B. Las mutaciones en el gen PDE6B también causan RP en seres humanos representando aproximadamente el 5% de todos los casos de RPAR a nivel mundial. Por lo tanto, los ratones rd10 proporcionan un modelo útil y ampliamente utilizado de RP que reproducen de manera muy fiel la patología retiniana humana.

Hemos observado un grupo de microRNAs con expresión diferencial, algunos de ellos comunes a otros trabajos en los que utilizaron distintos modelos de distrofias retinianas basados en mutaciones en los genes RHO y RDS. Esta línea de investigación ampliará el conocimiento sobre los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de esta distrofia de retina, y abrirá la posibilidad de desarrollar nuevos abordajes terapéuticos basados en la modulación de microRNAs y/o vías moleculares comunes a varios tipos de distrofias retinianas, con independencia del gen implicado.

8.3. Terapia génica

Uno de los objetivos de esta tesis doctoral ha sido crear un registro de pacientes con RP con genotipo conocido para poder incluir a pacientes en ensayos clínicos en terapia génica. Marina Crespo, estudiante de medicina, en su trabajo de fin de grado ha realizado una revisión bibliográfica sobre terapia génica en distrofias retinianas con el objetivo de recabar toda la información sobre ensayos clínicos. Además, la empresa Viralgen Vector Core recientemente ha decidido como emplazamiento San Sebastián. Viralgen tiene la intención de proporcionar un servicio único ya que esta empresa está a punto de convertirse en uno de los mayores fabricantes de productos de terapia génica en Europa. Dado que el futuro es muy prometedor en el campo, Viralgen puede ser un protagonista especial en el proceso de desarrollo de la terapia génica para las distrofias de la retina.

8.4. Ensayo clínico en electroestimulación transcorneal

Gracias a la colaboración con el Hospital de Tübingen, centro de referencia en distrofias retinianas en Alemania, vamos a poder participar en un ensayo clínico multicéntrico internacional en terapia de electroestimulación transcorneal, liderado por el Doctor Jay Federman del Wills Eye Hospital, EEUU. De los 7 centros seleccionados, seremos el único centro español en participar. Estamos pendientes de financiación para iniciar el ensayo clínico.

8.5. Unidad de distrofias retinianas

Mediante este estudio consideramos que se ha objetivado la necesidad de estudiar a los pacientes tanto clínica como genéticamente. A nivel nacional y europeo tanto las instituciones como las asociaciones de pacientes ven conveniente la creación de unidades de referencia para el estudio de las enfermedades raras. Hace no más de 10 años no existían terapias para los pacientes de RP, sin embargo, a día de hoy podemos ofrecerles consejo genético, diagnóstico genético preimplantacional (DGP), ayudas de baja visión y ya están comercializadas las primeras prótesis retinianas. Además, en un futuro próximo comenzarán los primeros tratamientos en terapia génica.

Por todo ello, uno de los objetivos, en un futuro que deseamos próximo, es crear una Unidad de Distrofias en nuestro Servicio. Pensamos que nuestro Hospital cumple los criterios para convertirse en un Centro de Referencia en Distrofias Retinianas porque disponemos de:

- Registro de distrofias retinianas.
- Grupo de investigación en RP en Bionostia con dos líneas de investigación, una en genética y otra en terapia celular en modelos animales.

- Asociación de pacientes Begisare con despacho en el Hospital.
- Servicio de Genética y Unidad de fertilidad (DGP).
- Equipo de Electrofisiología Ocular, gracias a la convocatoria *Bottom up*.
- Ópticos en el Servicio de Oftalmología con conocimiento en baja visión.
- Quirófanos equipados y certificados para implantar prótesis retinianas.

Limitaciones

Una de las limitaciones del presente estudio ha consistido en la imposibilidad de calcular la incidencia al no tratarse de un estudio prospectivo. Tampoco hemos podido valorar la progresión de la enfermedad en el tiempo.

La tecnología en el ámbito de la biomedicina y en oftalmología está en constante evolución. En nuestro estudio hemos tenido un cambio en el equipo de OCT y los pacientes han sido evaluados con tecnologías diferentes.

Otra de las limitaciones está relacionada con los métodos de búsqueda de mutaciones. En el momento en que se llevaron a cabo estos análisis, no se disponía de las plataformas de secuenciado masivo de las que dispone en la actualidad nuestro equipo de investigación, lo que ha podido limitar el número de pacientes diagnosticados. Además, gracias a la capacidad de secuenciación del exoma de los pacientes de una forma relativamente asequible, se está impulsando el descubrimiento de nuevos genes asociados a distrofias hereditarias de la retina. Por todo ello, los resultados de nuestro estudio se verán ampliados en los próximos años.

A la hora de realizar correlaciones genotipo-fenotipo al haber tanta heterogeneidad de genes mutados en RP, había pocos pacientes en cada grupo para poder encontrar diferencias estadísticamente significativas en los estudios de correlación genotipo-fenotipo. Serían necesarios estudios multicéntricos de centros de referencia para llevar a cabo este tipo de estudios. Gracias a los registros nacionales y europeos que se están creando en los últimos años y el uso de la tecnología Big data³⁹⁰ se podrá mejorar el estudio de las enfermedades raras.

Conclusiones

1. La prevalencia de RP en Gipuzkoa se asemeja a la prevalencia encontrada en otras poblaciones.
2. No se ha podido demostrar una mutación fundadora en los pacientes guipuzcoanos. Las mutaciones más prevalentes encontradas en el estudio son comparables a las mutaciones más prevalentes en la población española. Las mutaciones en el gen CERKL son las responsables del mayor número de casos de RPAR en nuestra cohorte. Y es el gen responsable del mayor número de casos en Gipuzkoa.
3. Mediante este estudio se ha conseguido crear un registro de pacientes de RP en Gipuzkoa y conocer las mutaciones causantes de la enfermedad. Gracias a ello podremos participar en futuros ensayos clínicos en terapias donde es imprescindible conocer la mutación de los pacientes.
4. Más de la mitad de los pacientes de RP en nuestro estudio presenta ceguera legal. Todos los pacientes con Síndrome de Usher padecen ceguera legal en nuestro estudio.
5. Más de la mitad de la población con RP independientemente del tipo de herencia desarrollará catarata subcapsular posterior a partir de los 40 años.
6. Gracias a la caracterización molecular de nuestros pacientes y a los estudios de genotipo-fenotipo en un futuro se podrá orientar más eficientemente el estudio genético.
7. Los estudios de correlación genotipo-fenotipo nos permitirán dar un pronóstico a nuestros pacientes.
8. La OCT es la herramienta adecuada para detectar complicaciones secundarias en la RP, como la membrana epirretiniana (MER), el edema macular quístico (EMQ) y la atrofia macular.
9. Las pruebas no invasivas como la OCT y la autofluorescencia pueden servir como biomarcadores. Estos biomarcadores pueden ser útiles para monitorizar la progresión de la enfermedad y la respuesta a futuras terapias.

Referencias bibliográficas

1. Publicaciones del grupo de neurodegeneración sensorial del Instituto Biodonostia relacionadas con el presente estudio

1.1. Artículos en revistas indexadas

1) A new approach based on targeted pooled DNA sequencing identifies novel mutations in patients with Inherited Retinal Dystrophies. Ezquerria-Inchausti M, Anasagasti A, Barandika O, **Irigoyen C**, López de Munain A, Ruiz-Ederra J. Enviado.

2) High prevalence of mutations affecting the splicing process in a Spanish cohort with autosomal dominant retinitis pigmentosa. Ezquerria-Inchausti M, Barandika O, Anasagasti A, **Irigoyen C**, López de Munain A, Ruiz-Ederra J. Sci Rep. 2017 Jan 3;7:39652. doi: 10.1038/srep39652.

3) A Cost-Effective Mutation Screening Strategy for Inherited Retinal Dystrophies. *Barandika O, ***Irigoyen C**, *Anasagasti A; Egiguren G, Ezquerria-Inchausti M, López de Munain A; Ruiz-Ederra J. Ophthalmic Res. 2016;56(3):123-31. doi: 10.1159/000445690.

* Indica misma contribución.

4) Genetic high throughput screening in Retinitis Pigmentosa base on high resolution melting (HRM) analysis. Anasagasti A, Barandika O, **Irigoyen C**, Benitez BA, Cooper B, Cruchaga C, López de Munain A, Ruiz-Ederra J. Exp Eye Res. 2013;116:386-94.

5) Current mutation discovery approaches in Retinitis Pigmentosa. Anasagasti A, **Irigoyen C**, Barandika O, López de Munain A, Ruiz-Ederra J. Vision Res. 2012;75:117-29. doi: 10.1016/j.visres.2012.09.012.

6) Therapeutic challenges to Retinitis pigmentosa: from neuroprotection to gene therapy. Sahni JN, Angi M, **Irigoyen C**, Semeraro F, Romano MR, Parmeggiani F. Curr Genomics. 2011 Jun;12(4):276-84.

1.2. Capítulo libro

Autora del capítulo: Distrofias retinianas y cataratas. Ponencia SECOIR Catarata & Retina. (Sociedad Española de Cirugía Ocular Implanto- Refractiva) 2017.

ISBN: 978-84-939898-2-8.

1.3. Comunicaciones orales

- 1) Ponente en Retina. Nuevos horizontes, Cordoba 11-12 de Noviembre de 2016, con la comunicación oral: Distrofias retinianas: Correlación genotipo-fenotipo. Consejo genético.
- 2) Estudio epidemiológico molecular de la Retinosis Pigmentaria en Gipuzkoa. Comunicación oral en la Asociación Oftalmológica del Norte (AON), San Sebastián 24-25 de Noviembre de 2017. Premio a la mejor comunicación oral.

1.4. Posters en congresos

- 1) Retinal transcriptome profiling analysis in rd10 mouse model of retinitis pigmentosa. Ander Anasagasti, Ane Miren Imaz-Borrajeros, Maitane Ezquerria-Inchausti, Olatz Barandika, Cristina Irigoyen, Adolfo López de Munain, Javier Ruiz-Ederra. Congreso Neurogune, Bilbao 27 de junio de 2016.
- 2) Mutations affecting splicing process: high prevalence of cases within our cohort of patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. Maitane Ezquerria-Inchausti, Olatz Barandika, Ander Anasagasti, Ane Miren Imaz-Borrajeros, Cristina Irigoyen, Adolfo López de Munain, Javier Ruiz-Ederra. Congreso Neurogune, Bilbao 27 de junio de 2016.
- 3) MicroRNA-mRNA interaction network analysis in early retinal degeneration in the rd10 Mouse Model of Retinitis Pigmentosa. Ander Anasagasti, Ane Miren Imaz-Borrajeros, Maitane Ezquerria-Inchausti, Olatz Barandika, Cristina Irigoyen, Adolfo López de Munain, Javier Ruiz-Ederra. Congreso Neurogune, Bilbao 27 de junio de 2016.
- 4) Development of a strategy for mutation detection in patients with Retinitis Pigmentosa using the Axiom Exome Genotyping Array. 13th Euretina Congress, Hamburgo, 26-29 Septiembre 2013.
- 5) Desarrollo de técnicas de cribado genético masivo en muestras de pacientes de retinosis pigmentaria en Gipuzkoa. Irigoyen C, Anasagasti A, Ruiz-Ederra J. 88 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología. Barcelona, Sept 2012.
- 6) Combination of next generation sequencing and HRM analysis techniques in retinitis pigmentosa: A cost-effective approach for a complex disease. Anasagasti A, Cruchaga C, Barandika O, Irigoyen C, Mendez A, de Benedetti G, Lopez de Munain, Ruiz-Ederra J. 14th Vision Research Conference. ARVO 4-5 Mayo, 2012.

2. Bibliografía

1. Shintani K, Shechtman DL, Gurwood AS. Review and update: current treatment trends for patients with retinitis pigmentosa. *Optometry* 2009; **80**(7): 384-401.
2. Bunker CH, Berson EL, Bromley WC, Hayes RP, Roderick TH. Prevalence of retinitis pigmentosa in Maine. *Am J Ophthalmol* 1984; **97**(3): 357-65.
3. Ammann F, Klein D, Franceschetti A. Genetic and epidemiological investigations on pigmentary degeneration of the retina and allied disorders in Switzerland. *J Neurol Sci* 1965; **2**(2): 183-96.
4. Hu DN. Prevalence and mode of inheritance of major genetic eye diseases in China. *J Med Genet* 1987; **24**(10): 584-8.
5. Grondahl J. Estimation of prognosis and prevalence of retinitis pigmentosa and Usher syndrome in Norway. *Clin Genet* 1987; **31**(4): 255-64.
6. Bunday S, Crews SJ. A study of retinitis pigmentosa in the City of Birmingham. II Clinical and genetic heterogeneity. *J Med Genet* 1984; **21**(6): 421-8.
7. Xu L, Hu L, Ma K, Li J, Jonas JB. Prevalence of retinitis pigmentosa in urban and rural adult Chinese: The Beijing Eye Study. *Eur J Ophthalmol* 2006; **16**(6): 865-6.
8. Sen P, Bhargava A, George R, et al. Prevalence of retinitis pigmentosa in South Indian population aged above 40 years. *Ophthalmic Epidemiol* 2008; **15**(4): 279-81.
9. Groft SC, de la Paz MP. Rare diseases - avoiding misperceptions and establishing realities: the need for reliable epidemiological data. *Adv Exp Med Biol* 2010; **686**: 3-14.
10. de la Paz MP, Villaverde-Hueso A, Alonso V, et al. Rare diseases epidemiology research. *Adv Exp Med Biol* 2010; **686**: 17-39.
11. Nangia V, Jonas JB, Khare A, Sinha A. Prevalence of retinitis pigmentosa in India: the Central India Eye and Medical Study. *Acta Ophthalmol* 2012; **90**(8): e649-50.
12. You QS, Xu L, Wang YX, et al. Prevalence of retinitis pigmentosa in North China: the Beijing Eye Public Health Care Project. *Acta Ophthalmol* 2013; **91**(6): e499-500.
13. Ferrari S, Di Iorio E, Barbaro V, Ponzin D, Sorrentino FS, Parmeggiani F. Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Curr Genomics* 2011; **12**(4): 238-49.
14. Perez DV. La retinosis pigmentaria en España: estudio clínico y genético.; 2001.
15. <http://www.esretnet.org/>.
16. Bertelsen M, Jensen H, Bregnhøj JF, Rosenberg T. Prevalence of generalized retinal dystrophy in Denmark. *Ophthalmic Epidemiol* 2014; **21**(4): 217-23.
17. Tous HM, Izquierdo NJ. Retinitis pigmentosa in Puerto Rico. *P R Health Sci J* 2006; **25**(4): 315-8.
18. Peterlin B, Canki-Klain N, Morela V, Stirn B, Rainer S, Cerar V. Prevalence of retinitis pigmentosa in Slovenia. *Clin Genet* 1992; **42**(3): 122-3.
19. Boughman JA, Conneally PM, Nance WE. Population genetic studies of retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 1980; **32**(2): 223-35.
20. Bunday S, Crews SJ. A study of retinitis pigmentosa in the City of Birmingham. I Prevalence. *J Med Genet* 1984; **21**(6): 417-20.
21. Bocquet B, Lacroux A, Surget MO, et al. Relative frequencies of inherited retinal dystrophies and optic neuropathies in Southern France: assessment of 21-year data management. *Ophthalmic Epidemiol* 2013; **20**(1): 13-25.
22. Ayuso C, Garcia-Sandoval B, Najera C, Valverde D, Carballo M, Antinolo G. Retinitis pigmentosa in Spain. The Spanish Multicentric and Multidisciplinary Group for Research into Retinitis Pigmentosa. *Clin Genet* 1995; **48**(3): 120-2.
23. Hata H YM, Nakanishi T, Ri T, et al. Causes of entering institutions for visually handicapped persons during the past fifteen years. *Jpn J Clin Ophthalmol* 2003; **57**: 259-62.
24. Al-Merjan JI, Pandova MG, Al-Ghanim M, Al-Wayel A, Al-Mutairi S. Registered blindness and low vision in Kuwait. *Ophthalmic Epidemiol* 2005; **12**(4): 251-7.
25. Buch H, Vinding T, La Cour M, Appleyard M, Jensen GB, Nielsen NV. Prevalence and causes of visual impairment and blindness among 9980 Scandinavian adults: the Copenhagen City Eye Study. *Ophthalmology* 2004; **111**(1): 53-61.
26. Frick KD, Roebuck MC, Feldstein JI, McCarty CA, Grover LL. Health services utilization and cost of retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 2012; **130**(5): 629-34.
27. Dryja TP, McGee TL, Reichel E, et al. A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 1990; **343**(6256): 364-6.
28. <https://sph.uth.edu/retnet/>.

29. Hamel C. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis* 2006; **1**: 40.
30. Fain GL. Why photoreceptors die (and why they don't). *Bioessays* 2006; **28**(4): 344-54.
31. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet* 2006; **368**(9549): 1795-809.
32. Fishman GA, Anderson RJ, Lourenco P. Prevalence of posterior subcapsular lens opacities in patients with retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 1985; **69**(4): 263-6.
33. Ng CH, Cheung N, Wang JJ, et al. Prevalence and risk factors for epiretinal membranes in a multi-ethnic United States population. *Ophthalmology* 2011; **118**(4): 694-9.
34. Liu G, Liu X, Li H, Du Q, Wang F. Optical Coherence Tomographic Analysis of Retina in Retinitis Pigmentosa Patients. *Ophthalmic Res* 2016; **56**(3): 111-22.
35. Chassine T, Bocquet B, Daien V, et al. Autosomal recessive retinitis pigmentosa with RP1 mutations is associated with myopia. *Br J Ophthalmol* 2015; **99**(10): 1360-5.
36. Grover S, Fishman GA, Brown J, Jr. Frequency of optic disc or parapapillary nerve fiber layer drusen in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 1997; **104**(2): 295-8.
37. Peng T, Wu L, Zhou W. Retinitis pigmentosa associated with glaucoma--clinical analysis. *Yan Ke Xue Bao* 1990; **6**(1-2): 17-9.
38. Bonnet C, El-Amraoui A. Usher syndrome (sensorineural deafness and retinitis pigmentosa): pathogenesis, molecular diagnosis and therapeutic approaches. *Curr Opin Neurol* 2012; **25**(1): 42-9.
39. García-Martín E G-AL, Bambó-Rubio MP. Retinosis pigmentaria. Avances diagnósticos y terapéuticos. *TheaInformación*. 2015:1-21.
40. Jackson TL. Moorfields manual of ophthalmology. Philadelphia, Pa.: Mosby Elsevier; 2008.
41. Maubaret C, Hamel C. [Genetics of retinitis pigmentosa: metabolic classification and phenotype/genotype correlations]. *J Fr Ophthalmol* 2005; **28**(1): 71-92.
42. Ellingford JM, Barton S, Bhaskar S, et al. Molecular findings from 537 individuals with inherited retinal disease. *J Med Genet* 2016.
43. Fahim AT, Daiger SP, Weleber RG. Nonsyndromic Retinitis Pigmentosa Overview. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., eds. GeneReviews(R). Seattle (WA); 1993.
44. Perez-Carro R, Corton M, Sanchez-Navarro I, et al. Panel-based NGS Reveals Novel Pathogenic Mutations in Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa. *Sci Rep* 2016; **6**: 19531.
45. Rivolta C, Berson EL, Dryja TP. Paternal uniparental heterodisomy with partial isodisomy of chromosome 1 in a patient with retinitis pigmentosa without hearing loss and a missense mutation in the Usher syndrome type II gene USH2A. *Arch Ophthalmol* 2002; **120**(11): 1566-71.
46. Thompson DA, McHenry CL, Li Y, et al. Retinal dystrophy due to paternal isodisomy for chromosome 1 or chromosome 2, with homoallelism for mutations in RPE65 or MERTK, respectively. *Am J Hum Genet* 2002; **70**(1): 224-9.
47. Mansergh FC, Millington-Ward S, Kennan A, et al. Retinitis pigmentosa and progressive sensorineural hearing loss caused by a C12258A mutation in the mitochondrial MTT2 gene. *Am J Hum Genet* 1999; **64**(4): 971-85.
48. Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP. Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science* 1994; **264**(5165): 1604-8.
49. Katsanis N, Ansley SJ, Badano JL, et al. Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science* 2001; **293**(5538): 2256-9.
50. Lestienne P, Ponsot G. Kearns-Sayre syndrome with muscle mitochondrial DNA deletion. *Lancet* 1988; **1**(8590): 885.
51. Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, et al. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 1988; **38**(9): 1339-46.
52. Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. Genes and Mutations Causing Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; **5**(10).
53. Stone EM. Finding and interpreting genetic variations that are important to ophthalmologists. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2003; **101**: 437-84.
54. Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 2007; **125**(2): 151-8.
55. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; **409**(6822): 860-921.
56. Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; **291**(5507): 1304-51.
57. Bowne SJ, Humphries MM, Sullivan LS, et al. A dominant mutation in RPE65 identified by whole-exome sequencing causes retinitis pigmentosa with choroidal involvement. *Eur J Hum Genet* 2011; **19**(10): 1074-81.

58. Service RF. Gene sequencing. The race for the \$1000 genome. *Science* 2006; **311**(5767): 1544-6.
59. Anasagasti A, Irigoyen C, Barandika O, Lopez de Munain A, Ruiz-Ederra J. Current mutation discovery approaches in Retinitis Pigmentosa. *Vision Res* 2012; **75**: 117-29.
60. Carrillo J, Martinez P, Solera J, et al. High resolution melting analysis for the identification of novel mutations in DKC1 and TERT genes in patients with dyskeratosis congenita. *Blood Cells Mol Dis* 2012; **49**(3-4): 140-6.
61. Anasagasti A, Barandika O, Irigoyen C, et al. Genetic high throughput screening in Retinitis Pigmentosa based on high resolution melting (HRM) analysis. *Exp Eye Res* 2013; **116**: 386-94.
62. Quail MA, Smith M, Coupland P, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 2012; **13**: 341.
63. Erali M, Wittwer CT. High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods* 2010; **50**(4): 250-61.
64. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 2007; **8**(6): 597-608.
65. Aguirre-Lamban J, Riveiro-Alvarez R, Garcia-Hoyos M, et al. Comparison of high-resolution melting analysis with denaturing high-performance liquid chromatography for mutation scanning in the ABCA4 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; **51**(5): 2615-9.
66. Joly P, Lacan P, Garcia C, Delasaux A, Francina A. Rapid and reliable beta-globin gene cluster haplotyping of sickle cell disease patients by FRET Light Cycler and HRM assays. *Clin Chim Acta* 2011; **412**(13-14): 1257-61.
67. Vossen RH, Aten E, Roos A, den Dunnen JT. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Hum Mutat* 2009; **30**(6): 860-6.
68. van der Stoep N, van Paridon CD, Janssens T, et al. Diagnostic guidelines for high-resolution melting curve (HRM) analysis: an interlaboratory validation of BRCA1 mutation scanning using the 96-well LightScanner. *Hum Mutat* 2009; **30**(6): 899-909.
69. De Leeneer K, Coene I, Poppe B, De Paepe A, Claes K. Rapid and sensitive detection of BRCA1/2 mutations in a diagnostic setting: comparison of two high-resolution melting platforms. *Clin Chem* 2008; **54**(6): 982-9.
70. Takano EA, Mitchell G, Fox SB, Dobrovic A. Rapid detection of carriers with BRCA1 and BRCA2 mutations using high resolution melting analysis. *BMC Cancer* 2008; **8**: 59.
71. Audrezet MP, Dabricot A, Le Marechal C, Ferec C. Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *J Mol Diagn* 2008; **10**(5): 424-34.
72. Liew M, Pryor R, Palais R, et al. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin Chem* 2004; **50**(7): 1156-64.
73. Mundhofir FE, Wulandari CE, Prajoko YW, Winarni TI. BRCA1 Gene Mutation Screening for the Hereditary Breast and/or Ovarian Cancer Syndrome in Breast Cancer Cases: a First High Resolution DNA Melting Analysis in Indonesia. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016; **17**(3): 1539-46.
74. Sergouniotis PI, Li Z, Mackay DS, et al. A survey of DNA variation of C2ORF71 in probands with progressive autosomal recessive retinal degeneration and controls. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; **52**(3): 1880-6.
75. Xu W, Dai H, Lu T, Zhang X, Dong B, Li Y. Seven novel mutations in the long isoform of the USH2A gene in Chinese families with nonsyndromic retinitis pigmentosa and Usher syndrome Type II. *Mol Vis* 2011; **17**: 1537-52.
76. Hochstenbach R, Buizer-Voskamp JE, Vorstman JA, Ophoff RA. Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: lessons for diagnostic workflow and research. *Cytogenet Genome Res* 2011; **135**(3-4): 174-202.
77. Zhang L, Znoyko I, Costa LJ, et al. Clonal diversity analysis using SNP microarray: a new prognostic tool for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet* 2011; **204**(12): 654-65.
78. Dougherty MJ, Tooke LS, Sullivan LM, Hakonarson H, Wainwright LM, Biegel JA. Clinical utilization of high-resolution single nucleotide polymorphism based oligonucleotide arrays in diagnostic studies of pediatric patients with solid tumors. *Cancer Genet* 2012; **205**(1-2): 42-54.
79. Leone PE, Gonzalez MB, Elosua C, et al. Integration of global spectral karyotyping, CGH arrays, and expression arrays reveals important genes in the pathogenesis of glioblastoma multiforme. *Ann Surg Oncol* 2012; **19**(7): 2367-79.

80. Marzancola MG, Sedighi A, Li PC. DNA Microarray-Based Diagnostics. *Methods Mol Biol* 2016; **1368**: 161-78.
81. Keren B, Le Caignec C. Oligonucleotide microarrays in constitutional genetic diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2011; **11**(5): 521-32.
82. Tucker T, Schlade-Bartusiak K, Eydoux P, Nelson TN, Brown L. Uniparental disomy: can SNP array data be used for diagnosis? *Genet Med* 2012.
83. Palomo L, Xicoy B, Garcia O, et al. Impact of SNP array karyotyping on the diagnosis and the outcome of chronic myelomonocytic leukemia with low risk cytogenetic features or no metaphases. *Am J Hematol* 2016; **91**(2): 185-92.
84. Laqqan M, Solomayer EF, Hammad M. Aberrations in sperm DNA methylation patterns are associated with abnormalities in semen parameters of subfertile males. *Reprod Biol* 2017.
85. DeVaux RS, Kuentzel M, Herschkowitz J, Chittur SV. Determination of Alternate Splicing Events Using Transcriptome Arrays. *Methods Mol Biol* 2017; **1507**: 245-59.
86. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; **74**(12): 5463-7.
87. White SJ, Laros JFJ, Bakker E, et al. Critical points for an accurate human genome analysis. *Hum Mutat* 2017.
88. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2008; **26**(10): 1135-45.
89. Fox S, Filichkin S, Mockler TC. Applications of ultra-high-throughput sequencing. *Methods Mol Biol* 2009; **553**: 79-108.
90. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 2010; **11**(1): 31-46.
91. Garcia-Garcia G, Aparisi MJ, Jaijo T, et al. Mutational screening of the USH2A gene in Spanish USH patients reveals 23 novel pathogenic mutations. *Orphanet J Rare Dis* 2011; **6**: 65.
92. Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet* 2011; **52**(4): 413-35.
93. Kruglyak KM, Lin E, Ong FS. Next-Generation Sequencing and Applications to the Diagnosis and Treatment of Lung Cancer. *Adv Exp Med Biol* 2016; **890**: 123-36.
94. Pettersson E, Lundberg J, Ahmadian A. Generations of sequencing technologies. *Genomics* 2009; **93**(2): 105-11.
95. Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol* 2012; **30**(5): 434-9.
96. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 2011; **475**(7356): 348-52.
97. Marmor MF AG, Arden G, Berson E, Birch DG, Boughman JA et al. Retinitis Pigmentosa: A Symposium on Terminology and Methods of Examination. *Ophthalmology* 1983; **90**(2): 126-31.
98. Gartner S, Schlossman A. Retinitis pigmentosa associated with glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1949; **32**(10): 1337-50.
99. Ko YC, Liu CJ, Hwang DK, Chen TJ, Liu CJ. Increased risk of acute angle closure in retinitis pigmentosa: a population-based case-control study. *PLoS One* 2014; **9**(9): e107660.
100. Garcia-Martin E, Pinilla I, Sancho E, et al. Optical coherence tomography in retinitis pigmentosa: reproducibility and capacity to detect macular and retinal nerve fiber layer thickness alterations. *Retina* 2012; **32**(8): 1581-91.
101. Mitamura Y, Mitamura-Aizawa S, Nagasawa T, Katome T, Eguchi H, Naito T. Diagnostic imaging in patients with retinitis pigmentosa. *J Med Invest* 2012; **59**(1-2): 1-11.
102. Chen RW, Greenberg JP, Lazow MA, et al. Autofluorescence imaging and spectral-domain optical coherence tomography in incomplete congenital stationary night blindness and comparison with retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* 2012; **153**(1): 143-54 e2.
103. Sandberg MA, Weigel-DiFranco C, Rosner B, Berson EL. The relationship between visual field size and electroretinogram amplitude in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; **37**(8): 1693-8.
104. Colombo L, Melardi E, Ferri P, et al. Visual function improvement using photocromic and selective blue-violet light filtering spectacle lenses in patients affected by retinal diseases. *BMC Ophthalmol* 2017; **17**(1): 149.
105. Gouras P, Carr RE, Gunkel RD. Retinitis pigmentosa in abetalipoproteinemia: Effects of vitamin A. *Invest Ophthalmol* 1971; **10**(10): 784-93.
106. Sperling MA, Hiles DA, Kennerdell JS. Electroretinographic responses following vitamin A therapy in A-beta-lipoproteinemia. *Am J Ophthalmol* 1972; **73**(3): 342-51.

107. Bishara S, Merin S, Cooper M, Azizi E, Delpre G, Deckelbaum RJ. Combined vitamin A and E therapy prevents retinal electrophysiological deterioration in abetalipoproteinaemia. *Br J Ophthalmol* 1982; **66**(12): 767-70.
108. Hungerbuhler JP, Meier C, Rousselle L, Quadri P, Bogousslavsky J. Refsum's disease: management by diet and plasmapheresis. *Eur Neurol* 1985; **24**(3): 153-9.
109. Yokota T, Shiojiri T, Gotoda T, et al. Friedreich-like ataxia with retinitis pigmentosa caused by the His101Gln mutation of the alpha-tocopherol transfer protein gene. *Ann Neurol* 1997; **41**(6): 826-32.
110. Yang Y, Mohand-Said S, Danan A, et al. Functional cone rescue by RdCVF protein in a dominant model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* 2009; **17**(5): 787-95.
111. Birch DG, Weleber RG, Duncan JL, Jaffe GJ, Tao W, Ciliary Neurotrophic Factor Retinitis Pigmentosa Study G. Randomized trial of ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* 2013; **156**(2): 283-92 e1.
112. Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, et al. A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 1993; **111**(6): 761-72.
113. Radu RA, Yuan Q, Hu J, et al. Accelerated accumulation of lipofuscin pigments in the RPE of a mouse model for ABCA4-mediated retinal dystrophies following Vitamin A supplementation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; **49**(9): 3821-9.
114. Charbel Issa P, Barnard AR, Herrmann P, Washington I, MacLaren RE. Rescue of the Stargardt phenotype in Abca4 knockout mice through inhibition of vitamin A dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; **112**(27): 8415-20.
115. Coco-Martín Rea. Guías de práctica para las Distrofias Hereditarias de Retina. Ministerio de Sanidad; 2017.
116. Fishman GA, Gilbert LD, Anderson RJ, Marmor MF, Weleber RG, Viana MA. Effect of methazolamide on chronic macular edema in patients with retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 1994; **101**(4): 687-93.
117. Pacella E, Arrico L, Santamaria V, et al. Dorzolamide chlorhydrate versus acetazolamide in the management of chronic macular edema in patients with retinitis pigmentosa: description of three case reports. *Ophthalmol Eye Dis* 2014; **6**: 21-6.
118. Liew G, Moore AT, Webster AR, Michaelides M. Efficacy and prognostic factors of response to carbonic anhydrase inhibitors in management of cystoid macular edema in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; **56**(3): 1531-6.
119. O'Reilly M, Millington-Ward S, Palfi A, et al. A transgenic mouse model for gene therapy of rhodopsin-linked Retinitis Pigmentosa. *Vision Res* 2008; **48**(3): 386-91.
120. O'Reilly M, Palfi A, Chadderton N, et al. RNA interference-mediated suppression and replacement of human rhodopsin in vivo. *Am J Hum Genet* 2007; **81**(1): 127-35.
121. Van Hooser JP, Aleman TS, He YG, et al. Rapid restoration of visual pigment and function with oral retinoid in a mouse model of childhood blindness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**(15): 8623-8.
122. Acland GM, Aguirre GD, Ray J, et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 2001; **28**(1): 92-5.
123. Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, et al. Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Arch Ophthalmol* 2012; **130**(1): 9-24.
124. Bennett J, Ashtari M, Wellman J, et al. AAV2 gene therapy readministration in three adults with congenital blindness. *Sci Transl Med* 2012; **4**(120): 120ra15.
125. Russell S, Bennett J, Wellman JA, et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2017; **390**(10097): 849-60.
126. MacLaren RE, Groppe M, Barnard AR, et al. Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet* 2014; **383**(9923): 1129-37.
127. LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, et al. Gene Therapy for MERTK-Associated Retinal Degenerations. *Adv Exp Med Biol* 2016; **854**: 487-93.
128. Ghazi NG, Abboud EB, Nowilaty SR, et al. Treatment of retinitis pigmentosa due to MERTK mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: results of a phase I trial. *Hum Genet* 2016; **135**(3): 327-43.
129. Zallocchi M, Binley K, Lad Y, et al. EIAV-based retinal gene therapy in the shaker1 mouse model for usher syndrome type 1B: development of UshStat. *PLoS One* 2014; **9**(4): e94272.

130. Petit L, Khanna H, Punzo C. Advances in Gene Therapy for Diseases of the Eye. *Hum Gene Ther* 2016; **27**(8): 563-79.
131. Deisseroth K. Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nat Neurosci* 2015; **18**(9): 1213-25.
132. Lagali PS, Balya D, Awatramani GB, et al. Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nat Neurosci* 2008; **11**(6): 667-75.
133. Doroudchi MM, Greenberg KP, Liu J, et al. Virally delivered channelrhodopsin-2 safely and effectively restores visual function in multiple mouse models of blindness. *Mol Ther* 2011; **19**(7): 1220-9.
134. Bi A, Cui J, Ma YP, et al. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* 2006; **50**(1): 23-33.
135. Cronin T, Vandenberghe LH, Hantz P, et al. Efficient transduction and optogenetic stimulation of retinal bipolar cells by a synthetic adeno-associated virus capsid and promoter. *EMBO Mol Med* 2014; **6**(9): 1175-90.
136. Mace E, Caplette R, Marre O, et al. Targeting channelrhodopsin-2 to ON-bipolar cells with vitreally administered AAV Restores ON and OFF visual responses in blind mice. *Mol Ther* 2015; **23**(1): 7-16.
137. Thyagarajan S, van Wyk M, Lehmann K, Lowel S, Feng G, Wassle H. Visual function in mice with photoreceptor degeneration and transgenic expression of channelrhodopsin 2 in ganglion cells. *J Neurosci* 2010; **30**(26): 8745-58.
138. Scalabrino ML, Boye SL, Franssen KM, et al. Intravitreal delivery of a novel AAV vector targets ON bipolar cells and restores visual function in a mouse model of complete congenital stationary night blindness. *Hum Mol Genet* 2015; **24**(21): 6229-39.
139. Lu Q, Ganjawala TH, Ivanova E, Cheng JG, Troilo D, Pan ZH. AAV-mediated transduction and targeting of retinal bipolar cells with improved mGluR6 promoters in rodents and primates. *Gene Ther* 2016; **23**(8-9): 680-9.
140. Busskamp V, Duebel J, Balya D, et al. Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science* 2010; **329**(5990): 413-7.
141. Jacobson SG, Sumaroka A, Luo X, Cideciyan AV. Retinal optogenetic therapies: clinical criteria for candidacy. *Clin Genet* 2013; **84**(2): 175-82.
142. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet* 2010; **11**(3): 181-90.
143. Goren MG, Yosef I, Auster O, Qimron U. Experimental definition of a clustered regularly interspaced short palindromic duplicon in Escherichia coli. *J Mol Biol* 2012; **423**(1): 14-6.
144. Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods* 2013; **10**(10): 957-63.
145. Hung SSC, McCaughey T, Swann O, Pebay A, Hewitt AW. Genome engineering in ophthalmology: Application of CRISPR/Cas to the treatment of eye disease. *Prog Retin Eye Res* 2016; **53**: 1-20.
146. Peng YQ, Tang LS, Yoshida S, Zhou YD. Applications of CRISPR/Cas9 in retinal degenerative diseases. *Int J Ophthalmol* 2017; **10**(4): 646-51.
147. Latella MC, Di Salvo MT, Cocchiarella F, et al. In vivo Editing of the Human Mutant Rhodopsin Gene by Electroporation of Plasmid-based CRISPR/Cas9 in the Mouse Retina. *Mol Ther Nucleic Acids* 2016; **5**(11): e389.
148. Bakondi B, Lv W, Lu B, et al. In Vivo CRISPR/Cas9 Gene Editing Corrects Retinal Dystrophy in the S334ter-3 Rat Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Mol Ther* 2016; **24**(3): 556-63.
149. Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, et al. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature* 2016; **540**(7631): 144-9.
150. Fuster-Garcia C, Garcia-Garcia G, Gonzalez-Romero E, et al. USH2A Gene Editing Using the CRISPR System. *Mol Ther Nucleic Acids* 2017; **8**: 529-41.
151. Cereso N, Pequignot MO, Robert L, et al. Proof of concept for AAV2/5-mediated gene therapy in iPSC-derived retinal pigment epithelium of a choroideremia patient. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2014; **1**: 14011.
152. Senis E, Fatouros C, Grosse S, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering: an adeno-associated viral (AAV) vector toolbox. *Biotechnol J* 2014; **9**(11): 1402-12.
153. Zheng A, Li Y, Tsang SH. Personalized therapeutic strategies for patients with retinitis pigmentosa. *Expert Opin Biol Ther* 2015; **15**(3): 391-402.

154. Bassuk AG, Zheng A, Li Y, Tsang SH, Mahajan VB. Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells. *Sci Rep* 2016; **6**: 19969.
155. Fernandes RA, Diniz B, Ribeiro R, Humayun M. Artificial vision through neuronal stimulation. *Neurosci Lett* 2012; **519**(2): 122-8.
156. Ho AC, Humayun MS, Dorn JD, et al. Long-Term Results from an Epiretinal Prosthesis to Restore Sight to the Blind. *Ophthalmology* 2015; **122**(8): 1547-54.
157. Duncan JL, Richards TP, Arditi A, et al. Improvements in vision-related quality of life in blind patients implanted with the Argus II Epiretinal Prosthesis. *Clin Exp Optom* 2017; **100**(2): 144-50.
158. Dagnelie G, Christopher P, Arditi A, et al. Performance of real-world functional vision tasks by blind subjects improves after implantation with the Argus(R) II retinal prosthesis system. *Clin Exp Ophthalmol* 2017; **45**(2): 152-9.
159. Kitiratschky VB, Stingl K, Wilhelm B, et al. Safety evaluation of "retina implant alpha IMS"--a prospective clinical trial. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015; **253**(3): 381-7.
160. Gabel VP. Artificial Vision. First ed. Switzerland: Springer; 2017.
161. Chow AY, Chow VY, Packo KH, Pollack JS, Peyman GA, Schuchard R. The artificial silicon retina microchip for the treatment of vision loss from retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 2004; **122**(4): 460-9.
162. Klauke S, Goertz M, Rein S, et al. Stimulation with a wireless intraocular epiretinal implant elicits visual percepts in blind humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; **52**(1): 449-55.
163. Dorn JD, Ahuja AK, Caspi A, et al. The Detection of Motion by Blind Subjects With the Epiretinal 60-Electrode (Argus II) Retinal Prosthesis. *JAMA Ophthalmol* 2013; **131**(2): 183-9.
164. Yanai D, Weiland JD, Mahadevappa M, Greenberg RJ, Fine I, Humayun MS. Visual performance using a retinal prosthesis in three subjects with retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* 2007; **143**(5): 820-7.
165. Comyn O, Lee E, MacLaren RE. Induced pluripotent stem cell therapies for retinal disease. *Curr Opin Neurol* 2010; **23**(1): 4-9.
166. West EL, Pearson RA, MacLaren RE, Sowden JC, Ali RR. Cell transplantation strategies for retinal repair. *Prog Brain Res* 2009; **175**: 3-21.
167. Das T, del Cerro M, Jalali S, et al. The transplantation of human fetal neuroretinal cells in advanced retinitis pigmentosa patients: results of a long-term safety study. *Exp Neurol* 1999; **157**(1): 58-68.
168. Radtke ND, Aramant RB, Seiler M, Petry HM. Preliminary report: indications of improved visual function after retinal sheet transplantation in retinitis pigmentosa patients. *Am J Ophthalmol* 1999; **128**(3): 384-7.
169. Humayun MS, de Juan E, Jr., del Cerro M, et al. Human neural retinal transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**(10): 3100-6.
170. Radtke ND, Seiler MJ, Aramant RB, Petry HM, Pidwell DJ. Transplantation of intact sheets of fetal neural retina with its retinal pigment epithelium in retinitis pigmentosa patients. *Am J Ophthalmol* 2002; **133**(4): 544-50.
171. Berger AS, Tezel TH, Del Priore LV, Kaplan HJ. Photoreceptor transplantation in retinitis pigmentosa: short-term follow-up. *Ophthalmology* 2003; **110**(2): 383-91.
172. Park SS, Bauer G, Abedi M, et al. Intravitreal autologous bone marrow CD34+ cell therapy for ischemic and degenerative retinal disorders: preliminary phase 1 clinical trial findings. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; **56**(1): 81-9.
173. Siqueira RC, Messias A, Voltarelli JC, Scott IU, Jorge R. Intravitreal injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells for hereditary retinal dystrophy: a phase I trial. *Retina* 2011; **31**(6): 1207-14.
174. 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. *Am J Ophthalmol* 2008; **146**(2): 172-82.
175. Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet* 2015; **385**(9967): 509-16.
176. Grover S, Fishman GA, Anderson RJ, et al. Visual acuity impairment in patients with retinitis pigmentosa at age 45 years or older. *Ophthalmology* 1999; **106**(9): 1780-5.
177. Holladay JT. Proper method for calculating average visual acuity. *J Refract Surg* 1997; **13**(4): 388-91.

178. Schuerch K, Woods RL, Lee W, et al. Quantifying Fundus Autofluorescence in Patients With Retinitis Pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017; **58**(3): 1843-55.
179. Haim M. Retinitis pigmentosa: problems associated with genetic classification. *Clin Genet* 1993; **44**(2): 62-70.
180. Barandika O, Irigoyen C, Anasagasti A, et al. A Cost-Effective Mutation Screening Strategy for Inherited Retinal Dystrophies. *Ophthalmic Res* 2016; **56**(3): 123-31.
181. Beales PL, Badano JL, Ross AJ, et al. Genetic interaction of BBS1 mutations with alleles at other BBS loci can result in non-Mendelian Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet* 2003; **72**(5): 1187-99.
182. Mockel A, Perdomo Y, Stutzmann F, Letsch J, Marion V, Dollfus H. Retinal dystrophy in Bardet-Biedl syndrome and related syndromic ciliopathies. *Prog Retin Eye Res* 2011; **30**(4): 258-74.
183. Cruchaga C, Haller G, Chakraverty S, et al. Rare variants in APP, PSEN1 and PSEN2 increase risk for AD in late-onset Alzheimer's disease families. *PLoS One* 2012; **7**(2): e31039.
184. Vallania FL, Druley TE, Ramos E, et al. High-throughput discovery of rare insertions and deletions in large cohorts. *Genome Res* 2010; **20**(12): 1711-8.
185. Ezquerro-Inchausti M, Barandika O, Anasagasti A, Irigoyen C, Lopez de Munain A, Ruiz-Ederra J. High prevalence of mutations affecting the splicing process in a Spanish cohort with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Sci Rep* 2017; **7**: 39652.
186. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 2009; **4**(7): 1073-81.
187. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010; **7**(4): 248-9.
188. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One* 2012; **7**(10): e46688.
189. Mathe E, Olivier M, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Tavtigian SV. Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: a comparison of three sequence analysis based methods. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**(5): 1317-25.
190. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods* 2010; **7**(8): 575-6.
191. Alonso R, Salavert F, Garcia-Garcia F, et al. Babelomics 5.0: functional interpretation for new generations of genomic data. *Nucleic Acids Res* 2015; **43**(W1): W117-21.
192. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; **17**(5): 405-24.
193. Bell C, Converse CA, Hammer HM, Osborne A, Haites NE. Rhodopsin mutations in a Scottish retinitis pigmentosa population, including a novel splice site mutation in intron four. *Br J Ophthalmol* 1994; **78**(12): 933-8.
194. Cooper GM, Stone EA, Asimenos G, et al. Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Res* 2005; **15**(7): 901-13.
195. Corton M, Blanco MJ, Torres M, Sanchez-Salorio M, Carracedo A, Brion M. Identification of a novel mutation in the human PDE6A gene in autosomal recessive retinitis pigmentosa: homology with the nmf28/nmf28 mice model. *Clin Genet* 2010; **78**(5): 495-8.
196. Rio Frio T, McGee TL, Wade NM, et al. A single-base substitution within an intronic repetitive element causes dominant retinitis pigmentosa with reduced penetrance. *Hum Mutat* 2009; **30**(9): 1340-7.
197. Hollingsworth TJ, Gross AK. The severe autosomal dominant retinitis pigmentosa rhodopsin mutant Ter349Glu mislocalizes and induces rapid rod cell death. *J Biol Chem* 2013; **288**(40): 29047-55.
198. Keen TJ, Inglehearn CF, Lester DH, et al. Autosomal dominant retinitis pigmentosa: four new mutations in rhodopsin, one of them in the retinal attachment site. *Genomics* 1991; **11**(1): 199-205.
199. Zhao C, Lu S, Zhou X, Zhang X, Zhao K, Larsson C. A novel locus (RP33) for autosomal dominant retinitis pigmentosa mapping to chromosomal region 2cen-q12.1. *Hum Genet* 2006; **119**(6): 617-23.
200. Zhao C, Bellur DL, Lu S, et al. Autosomal-dominant retinitis pigmentosa caused by a mutation in SNRNP200, a gene required for unwinding of U4/U6 snRNAs. *Am J Hum Genet* 2009; **85**(5): 617-27.

201. de Castro-Miro M, Tonda R, Escudero-Ferruz P, et al. Novel Candidate Genes and a Wide Spectrum of Structural and Point Mutations Responsible for Inherited Retinal Dystrophies Revealed by Exome Sequencing. *PLoS One* 2016; **11**(12): e0168966.
202. Xia K, Zheng D, Pan Q, et al. A novel PRPF31 splice-site mutation in a Chinese family with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Vis* 2004; **10**: 361-5.
203. Audo I, Sahel JA, Mohand-Said S, et al. EYS is a major gene for rod-cone dystrophies in France. *Hum Mutat* 2010; **31**(5): E1406-35.
204. Barragan I, Borrego S, Pieras JL, et al. Mutation spectrum of EYS in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Mutat* 2010; **31**(11): E1772-800.
205. Habibi I, Chebil A, Falfoul Y, et al. Identifying mutations in Tunisian families with retinal dystrophy. *Sci Rep* 2016; **6**: 37455.
206. Sohocki MM, Daiger SP, Bowne SJ, et al. Prevalence of mutations causing retinitis pigmentosa and other inherited retinopathies. *Hum Mutat* 2001; **17**(1): 42-51.
207. Robson AG, Michaelides M, Luong VA, et al. Functional correlates of fundus autofluorescence abnormalities in patients with RPGR or RIMS1 mutations causing cone or cone rod dystrophy. *Br J Ophthalmol* 2008; **92**(1): 95-102.
208. Dryja TP, Hahn LB, Kajiwarra K, Berson EL. Dominant and digenic mutations in the peripherin/RDS and ROM1 genes in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; **38**(10): 1972-82.
209. Nishiguchi KM, Rivolta C. Genes associated with retinitis pigmentosa and allied diseases are frequently mutated in the general population. *PLoS One* 2012; **7**(7): e41902.
210. Audo I, Mohand-Said S, Dhaenens CM, et al. RP1 and autosomal dominant rod-cone dystrophy: novel mutations, a review of published variants, and genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat* 2012; **33**(1): 73-80.
211. Goldenberg-Cohen N, Banin E, Zalstein Y, et al. Genetic heterogeneity and consanguinity lead to a "double hit": homozygous mutations of MYO7A and PDE6B in a patient with retinitis pigmentosa. *Mol Vis* 2013; **19**: 1565-71.
212. Coppieters F, Van Schil K, Bauwens M, et al. Identity-by-descent-guided mutation analysis and exome sequencing in consanguineous families reveals unusual clinical and molecular findings in retinal dystrophy. *Genet Med* 2014; **16**(9): 671-80.
213. Tuson M, Marfany G, Gonzalez-Duarte R. Mutation of CERKL, a novel human ceramide kinase gene, causes autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP26). *Am J Hum Genet* 2004; **74**(1): 128-38.
214. Avila-Fernandez A, Riveiro-Alvarez R, Vallespin E, et al. CERKL mutations and associated phenotypes in seven Spanish families with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; **49**(6): 2709-13.
215. Rivolta C, Sweklo EA, Berson EL, Dryja TP. Missense mutation in the USH2A gene: association with recessive retinitis pigmentosa without hearing loss. *Am J Hum Genet* 2000; **66**(6): 1975-8.
216. Bernal S, Meda C, Solans T, et al. Clinical and genetic studies in Spanish patients with Usher syndrome type II: description of new mutations and evidence for a lack of genotype-phenotype correlation. *Clin Genet* 2005; **68**(3): 204-14.
217. Yan D, Ouyang X, Patterson DM, Du LL, Jacobson SG, Liu XZ. Mutation analysis in the long isoform of USH2A in American patients with Usher Syndrome type II. *J Hum Genet* 2009; **54**(12): 732-8.
218. Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, et al. Identification of 11 novel mutations in USH2A among Japanese patients with Usher syndrome type 2. *Clin Genet* 2009; **76**(4): 383-91.
219. Baux D, Blanchet C, Hamel C, et al. Enrichment of LOVD-USHbases with 152 USH2A genotypes defines an extensive mutational spectrum and highlights missense hotspots. *Hum Mutat* 2014; **35**(10): 1179-86.
220. Aller E, Larriue L, Jaijo T, et al. The USH2A c.2299delG mutation: dating its common origin in a Southern European population. *Eur J Hum Genet* 2010; **18**(7): 788-93.
221. Lenassi E, Saihan Z, Bitner-Glindzicz M, Webster AR. The effect of the common c.2299delG mutation in USH2A on RNA splicing. *Exp Eye Res* 2014; **122**: 9-12.
222. Vallespin E, Cantalapiedra D, Riveiro-Alvarez R, et al. Mutation screening of 299 Spanish families with retinal dystrophies by Leber congenital amaurosis genotyping microarray. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; **48**(12): 5653-61.
223. Lotery AJ, Jacobson SG, Fishman GA, et al. Mutations in the CRB1 gene cause Leber congenital amaurosis. *Arch Ophthalmol* 2001; **119**(3): 415-20.

224. Gerber S, Rozet JM, Takezawa SI, et al. The photoreceptor cell-specific nuclear receptor gene (PNR) accounts for retinitis pigmentosa in the Crypto-Jews from Portugal (Marranos), survivors from the Spanish Inquisition. *Hum Genet* 2000; **107**(3): 276-84.
225. Sharon D, Sandberg MA, Caruso RC, Berson EL, Dryja TP. Shared mutations in NR2E3 in enhanced S-cone syndrome, Goldmann-Favre syndrome, and many cases of clumped pigmentary retinal degeneration. *Arch Ophthalmol* 2003; **121**(9): 1316-23.
226. Escher P, Gouras P, Roduit R, et al. Mutations in NR2E3 can cause dominant or recessive retinal degenerations in the same family. *Hum Mutat* 2009; **30**(3): 342-51.
227. Wright AF, Reddick AC, Schwartz SB, et al. Mutation analysis of NR2E3 and NRL genes in Enhanced S Cone Syndrome. *Hum Mutat* 2004; **24**(5): 439.
228. Abid A, Ismail M, Mehdi SQ, Khaliq S. Identification of novel mutations in the SEMA4A gene associated with retinal degenerative diseases. *J Med Genet* 2006; **43**(4): 378-81.
229. Burstedt MS, Sandgren O, Holmgren G, Forsman-Semb K. Bothnia dystrophy caused by mutations in the cellular retinaldehyde-binding protein gene (RLBP1) on chromosome 15q26. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; **40**(5): 995-1000.
230. El Shamieh S, Boulanger-Scemama E, Lancelot ME, et al. Targeted next generation sequencing identifies novel mutations in RP1 as a relatively common cause of autosomal recessive rod-cone dystrophy. *Biomed Res Int* 2015; **2015**: 485624.
231. Fujinami K, Zernant J, Chana RK, et al. ABCA4 gene screening by next-generation sequencing in a British cohort. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; **54**(10): 6662-74.
232. Banerjee P, Kleyn PW, Knowles JA, et al. TULP1 mutation in two extended Dominican kindreds with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 1998; **18**(2): 177-9.
233. Pomares E, Riera M, Castro-Navarro J, Andres-Gutierrez A, Gonzalez-Duarte R, Marfany G. Identification of an intronic single-point mutation in RP2 as the cause of semidominant X-linked retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; **50**(11): 5107-14.
234. Mykytyn K, Nishimura DY, Searby CC, et al. Identification of the gene (BBS1) most commonly involved in Bardet-Biedl syndrome, a complex human obesity syndrome. *Nat Genet* 2002; **31**(4): 435-8.
235. Alvarez-Satta M, Castro-Sanchez S, Pereiro I, et al. Overview of Bardet-Biedl syndrome in Spain: identification of novel mutations in BBS1, BBS10 and BBS12 genes. *Clin Genet* 2014; **86**(6): 601-2.
236. Koestler FA. The unseen minority: A social history of blindness in America. First ed; 1976.
237. Garcia-Viso M. Diagnóstico y valoración de discapacidades. In: Minusvalía. RPdPyAaPc, editor. Madrid; 1992.
238. Na KH, Kim HJ, Kim KH, et al. Prevalence, Age at Diagnosis, Mortality, and Cause of Death in Retinitis Pigmentosa in Korea-A Nationwide Population-based Study. *Am J Ophthalmol* 2017; **176**: 157-65.
239. Sharon D, Banin E. Nonsyndromic retinitis pigmentosa is highly prevalent in the Jerusalem region with a high frequency of founder mutations. *Mol Vis* 2015; **21**: 783-92.
240. Boughman JA, Fishman GA. A genetic analysis of retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 1983; **67**(7): 449-54.
241. Alvarez AI, Arostegui E, Martin R, et al. Molecular study of the rhodopsin gene in retinitis pigmentosa patients in the Basque Country. *J Med Genet* 1998; **35**(5): 387-90.
242. Hu DN. Genetic aspects of retinitis pigmentosa in China. *Am J Med Genet* 1982; **12**(1): 51-6.
243. Greenberg J, Bartmann L, Ramesar R, Beighton P. Retinitis pigmentosa in southern Africa. *Clin Genet* 1993; **44**(5): 232-5.
244. Fishman GA. Retinitis pigmentosa. Genetic percentages. *Arch Ophthalmol* 1978; **96**(5): 822-6.
245. Jay M. On the heredity of retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 1982; **66**(7): 405-16.
246. Kaplan J, Bonneau D, Frezal J, Munnich A, Dufier JL. Clinical and genetic heterogeneity in retinitis pigmentosa. *Hum Genet* 1990; **85**(6): 635-42.
247. Najera C, Millan JM, Beneyto M, Prieto F. Epidemiology of retinitis pigmentosa in the Valencian community (Spain). *Genet Epidemiol* 1995; **12**(1): 37-46.
248. Ben-Yosef T, Ness SL, Madeo AC, et al. A mutation of PCDH15 among Ashkenazi Jews with the type 1 Usher syndrome. *N Engl J Med* 2003; **348**(17): 1664-70.
249. Ness SL, Ben-Yosef T, Bar-Lev A, et al. Genetic homogeneity and phenotypic variability among Ashkenazi Jews with Usher syndrome type III. *J Med Genet* 2003; **40**(10): 767-72.
250. Stone EM, Luo X, Heon E, et al. Autosomal recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the MAK gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; **52**(13): 9665-73.

251. Zelinger L, Banin E, Obolensky A, et al. A missense mutation in DHDDS, encoding dehydrodolichyl diphosphate synthase, is associated with autosomal-recessive retinitis pigmentosa in Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet* 2011; **88**(2): 207-15.
252. Zuchner S, Dallman J, Wen R, et al. Whole-exome sequencing links a variant in DHDDS to retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 2011; **88**(2): 201-6.
253. Chiang AP, Beck JS, Yen HJ, et al. Homozygosity mapping with SNP arrays identifies TRIM32, an E3 ubiquitin ligase, as a Bardet-Biedl syndrome gene (BBS11). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**(16): 6287-92.
254. Akawi N, McRae J, Ansari M, et al. Discovery of four recessive developmental disorders using probabilistic genotype and phenotype matching among 4,125 families. *Nat Genet* 2015; **47**(11): 1363-9.
255. Smedley D, Jacobsen JO, Jager M, et al. Next-generation diagnostics and disease-gene discovery with the Exomiser. *Nat Protoc* 2015; **10**(12): 2004-15.
256. Ellingford JM, Sergouniotis PI, Lennon R, et al. Pinpointing clinical diagnosis through whole exome sequencing to direct patient care: a case of Senior-Loken syndrome. *Lancet* 2015; **385**(9980): 1916.
257. Ye K, Schulz MH, Long Q, Apweiler R, Ning Z, Pindel: a pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from paired-end short reads. *Bioinformatics* 2009; **25**(21): 2865-71.
258. Plagnol V, Curtis J, Epstein M, et al. A robust model for read count data in exome sequencing experiments and implications for copy number variant calling. *Bioinformatics* 2012; **28**(21): 2747-54.
259. Ezquerro-Inchausti MA, A; Barandika, O; Irigoyen, C; López de Munain, A; Ruiz-Ederra, J. A new approach based on targeted pooled DNA sequencing identifies novel mutations in patients with Inherited Retinal Dystrophies. 2018. Enviado.
260. Fingert JH, Oh K, Chung M, et al. Association of a novel mutation in the retinol dehydrogenase 12 (RDH12) gene with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 2008; **126**(9): 1301-7.
261. Churchill JD, Bowne SJ, Sullivan LS, et al. Mutations in the X-linked retinitis pigmentosa genes RPGR and RP2 found in 8.5% of families with a provisional diagnosis of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; **54**(2): 1411-6.
262. Marth GT, Yu F, Indap AR, et al. The functional spectrum of low-frequency coding variation. *Genome Biol* 2011; **12**(9): R84.
263. Venturini G, Rose AM, Shah AZ, Bhattacharya SS, Rivolta C. CNOT3 is a modifier of PRPF31 mutations in retinitis pigmentosa with incomplete penetrance. *PLoS Genet* 2012; **8**(11): e1003040.
264. Fernandez-San Jose P, Blanco-Kelly F, Corton M, et al. Prevalence of Rhodopsin mutations in autosomal dominant Retinitis Pigmentosa in Spain: clinical and analytical review in 200 families. *Acta Ophthalmol* 2015; **93**(1): e38-44.
265. Bunge S, Wedemann H, David D, et al. Molecular analysis and genetic mapping of the rhodopsin gene in families with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Genomics* 1993; **17**(1): 230-3.
266. Ziviello C, Simonelli F, Testa F, et al. Molecular genetics of autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP): a comprehensive study of 43 Italian families. *J Med Genet* 2005; **42**(7): e47.
267. Audo I, Manes G, Mohand-Said S, et al. Spectrum of rhodopsin mutations in French autosomal dominant rod-cone dystrophy patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; **51**(7): 3687-700.
268. Sullivan LS, Bowne SJ, Birch DG, et al. Prevalence of disease-causing mutations in families with autosomal dominant retinitis pigmentosa: a screen of known genes in 200 families. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; **47**(7): 3052-64.
269. Martin-Merida I, Sanchez-Alcudia R, Fernandez-San Jose P, et al. Analysis of the PRPF31 Gene in Spanish Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa Patients: A Novel Genomic Rearrangement. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017; **58**(2): 1045-53.
270. Liu MM, Zack DJ. Alternative splicing and retinal degeneration. *Clin Genet* 2013; **84**(2): 142-9.
271. Cao H, Wu J, Lam S, et al. Temporal and tissue specific regulation of RP-associated splicing factor genes PRPF3, PRPF31 and PRPC8--implications in the pathogenesis of RP. *PLoS One* 2011; **6**(1): e15860.
272. Singh RK, Cooper TA. Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *Trends Mol Med* 2012; **18**(8): 472-82.

273. Nakajima H, Sato B, Fujita T, Takase S, Terano H, Okuhara M. New antitumor substances, FR901463, FR901464 and FR901465. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* 1996; **49**(12): 1196-203.
274. Glaus E, Schmid F, Da Costa R, Berger W, Neidhardt J. Gene therapeutic approach using mutation-adapted U1 snRNA to correct a RPGR splice defect in patient-derived cells. *Mol Ther* 2011; **19**(5): 936-41.
275. Berger A, Lorain S, Josephine C, et al. Repair of rhodopsin mRNA by spliceosome-mediated RNA trans-splicing: a new approach for autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Ther* 2015; **23**(5): 918-30.
276. Wang DY, Chan WM, Tam PO, et al. Gene mutations in retinitis pigmentosa and their clinical implications. *Clin Chim Acta* 2005; **351**(1-2): 5-16.
277. Rakoczy EP, Kiel C, McKeone R, Stricher F, Serrano L. Analysis of disease-linked rhodopsin mutations based on structure, function, and protein stability calculations. *J Mol Biol* 2011; **405**(2): 584-606.
278. al-Maghteh M, Gregory C, Inglehearn C, Hardcastle A, Bhattacharya S. Rhodopsin mutations in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mutat* 1993; **2**(4): 249-55.
279. Nathans J. Rhodopsin: structure, function, and genetics. *Biochemistry* 1992; **31**(21): 4923-31.
280. Sandberg MA, Weigel-DiFranco C, Dryja TP, Berson EL. Clinical expression correlates with location of rhodopsin mutation in dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; **36**(9): 1934-42.
281. van Soest S, Westerveld A, de Jong PT, Bleeker-Wagemakers EM, Bergen AA. Retinitis pigmentosa: defined from a molecular point of view. *Surv Ophthalmol* 1999; **43**(4): 321-34.
282. Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Weigel-DiFranco C, Dryja TP. Ocular findings in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa and rhodopsin, proline-347-leucine. *Am J Ophthalmol* 1991; **111**(5): 614-23.
283. Tsui I, Chou CL, Palmer N, Lin CS, Tsang SH. Phenotype-genotype correlations in autosomal dominant retinitis pigmentosa caused by RHO, D190N. *Curr Eye Res* 2008; **33**(11): 1014-22.
284. Avila-Fernandez A, Cantalapiedra D, Aller E, et al. Mutation analysis of 272 Spanish families affected by autosomal recessive retinitis pigmentosa using a genotyping microarray. *Mol Vis* 2010; **16**: 2550-8.
285. Mowat FM, Occelli LM, Bartoe JT, et al. Gene Therapy in a Large Animal Model of PDE6A-Retinitis Pigmentosa. *Front Neurosci* 2017; **11**: 342.
286. Blanco-Kelly F, Garcia Hoyos M, Lopez Martinez MA, et al. Dominant Retinitis Pigmentosa, p.Gly56Arg Mutation in NR2E3: Phenotype in a Large Cohort of 24 Cases. *PLoS One* 2016; **11**(2): e0149473.
287. Chang S, Vaccarella L, Olatunji S, Cebulla C, Christoforidis J. Diagnostic challenges in retinitis pigmentosa: genotypic multiplicity and phenotypic variability. *Curr Genomics* 2011; **12**(4): 267-75.
288. Hebrard M, Manes G, Bocquet B, et al. Combining gene mapping and phenotype assessment for fast mutation finding in non-consanguineous autosomal recessive retinitis pigmentosa families. *Eur J Hum Genet* 2011; **19**(12): 1256-63.
289. Klevering BJ, Yzer S, Rohrschneider K, et al. Microarray-based mutation analysis of the ABCA4 (ABCR) gene in autosomal recessive cone-rod dystrophy and retinitis pigmentosa. *Eur J Hum Genet* 2004; **12**(12): 1024-32.
290. Weng J, Mata NL, Azarian SM, Tzekov RT, Birch DG, Travis GH. Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice. *Cell* 1999; **98**(1): 13-23.
291. Klevering BJ, Deutman AF, Mauerer A, Cremers FP, Hoyng CB. The spectrum of retinal phenotypes caused by mutations in the ABCA4 gene. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005; **243**(2): 90-100.
292. Fishman GA, Roberts MF, Derlacki DJ, et al. Novel mutations in the cellular retinaldehyde-binding protein gene (RLBP1) associated with retinitis punctata albescens: evidence of interfamilial genetic heterogeneity and fundus changes in heterozygotes. *Arch Ophthalmol* 2004; **122**(1): 70-5.
293. Burstedt M, Jonsson F, Kohn L, Burstedt M, Kivitalo M, Golovleva I. Genotype-phenotype correlations in Bothnia dystrophy caused by RLBP1 gene sequence variations. *Acta Ophthalmol* 2013; **91**(5): 437-44.

294. Burstedt MS, Forsman-Semb K, Golovleva I, Janunger T, Wachtmeister L, Sandgren O. Ocular phenotype of bothnia dystrophy, an autosomal recessive retinitis pigmentosa associated with an R234W mutation in the RLBP1 gene. *Arch Ophthalmol* 2001; **119**(2): 260-7.
295. Eichers ER, Green JS, Stockton DW, et al. Newfoundland rod-cone dystrophy, an early-onset retinal dystrophy, is caused by splice-junction mutations in RLBP1. *Am J Hum Genet* 2002; **70**(4): 955-64.
296. Hardcastle AJ, Thiselton DL, Van Maldergem L, et al. Mutations in the RP2 gene cause disease in 10% of families with familial X-linked retinitis pigmentosa assessed in this study. *Am J Hum Genet* 1999; **64**(4): 1210-5.
297. Jayasundera T, Branham KE, Othman M, et al. RP2 phenotype and pathogenetic correlations in X-linked retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 2010; **128**(7): 915-23.
298. Vervoort R, Lennon A, Bird AC, et al. Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 2000; **25**(4): 462-6.
299. Branham K, Othman M, Brumm M, et al. Mutations in RPGR and RP2 account for 15% of males with simplex retinal degenerative disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; **53**(13): 8232-7.
300. Souied E, Segues B, Ghazi I, et al. Severe manifestations in carrier females in X linked retinitis pigmentosa. *J Med Genet* 1997; **34**(10): 793-7.
301. Grover S, Fishman GA, Anderson RJ, Lindeman M. A longitudinal study of visual function in carriers of X-linked recessive retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 2000; **107**(2): 386-96.
302. Ruddle JB, Ebenezer ND, Kearns LS, Mulhall LE, Mackey DA, Hardcastle AJ. RPGR ORF15 genotype and clinical variability of retinal degeneration in an Australian population. *Br J Ophthalmol* 2009; **93**(9): 1151-4.
303. Bader I, Brandau O, Achatz H, et al. X-linked retinitis pigmentosa: RPGR mutations in most families with definite X linkage and clustering of mutations in a short sequence stretch of exon ORF15. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**(4): 1458-63.
304. Corton M, Tatu SD, Avila-Fernandez A, et al. High frequency of CRB1 mutations as cause of Early-Onset Retinal Dystrophies in the Spanish population. *Orphanet J Rare Dis* 2013; **8**: 20.
305. Zudaire HC. Coeficiente de consanguinidad en zonas de Alava, Guipuzcoa y Vizcaya. *Munibe* 1981; (3-4): 245-54.
306. Zudaire HC. La consanguinidad en Guipuzcoa y su capital. De 1918 a1966. Kobie (Serie Antropología Cultural). 1992:45-79.
307. Najera C, Beneyto M, Blanca J, et al. Mutations in myosin VIIA (MYO7A) and usherin (USH2A) in Spanish patients with Usher syndrome types I and II, respectively. *Hum Mutat* 2002; **20**(1): 76-7.
308. Boughman JA, Vernon M, Shaver KA. Usher syndrome: definition and estimate of prevalence from two high-risk populations. *J Chronic Dis* 1983; **36**(8): 595-603.
309. Hallgren B. Retinitis pigmentosa combined with congenital deafness; with vestibulo-cerebellar ataxia and mental abnormality in a proportion of cases: A clinical and genético-statistical study. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 1959; **34**(138): 1-101.
310. Tamayo ML, Bernal JE, Tamayo GE, et al. Usher syndrome: results of a screening program in Colombia. *Clin Genet* 1991; **40**(4): 304-11.
311. Haim M. Prevalence of retinitis pigmentosa and allied disorders in Denmark. II. Systemic involvement and age at onset. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1992; **70**(4): 417-26.
312. Hope CI, Bunday S, Proops D, Fielder AR. Usher syndrome in the city of Birmingham--prevalence and clinical classification. *Br J Ophthalmol* 1997; **81**(1): 46-53.
313. Rosenberg T, Haim M, Hauch AM, Parving A. The prevalence of Usher syndrome and other retinal dystrophy-hearing impairment associations. *Clin Genet* 1997; **51**(5): 314-21.
314. Pakarinen L, Karjalainen S, Simola KO, Laippala P, Kaitalo H. Usher's syndrome type 3 in Finland. *Laryngoscope* 1995; **105**(6): 613-7.
315. Espinos C, Millan JM, Beneyto M, Najera C. Epidemiology of Usher syndrome in Valencia and Spain. *Community Genet* 1998; **1**(4): 223-8.
316. Vernon M. Usher's syndrome--deafness and progressive blindness. Clinical cases, prevention, theory and literature survey. *J Chronic Dis* 1969; **22**(3): 133-51.
317. Blanco-Kelly F, Jaijo T, Aller E, et al. Clinical aspects of Usher syndrome and the USH2A gene in a cohort of 433 patients. *JAMA Ophthalmol* 2015; **133**(2): 157-64.
318. Weston MD, Eudy JD, Fujita S, et al. Genomic structure and identification of novel mutations in usherin, the gene responsible for Usher syndrome type IIa. *Am J Hum Genet* 2000; **66**(4): 1199-210.

319. Dreyer B, Tranebjaerg L, Rosenberg T, Weston MD, Kimberling WJ, Nilssen O. Identification of novel USH2A mutations: implications for the structure of USH2A protein. *Eur J Hum Genet* 2000; **8**(7): 500-6.
320. Lenassi E, Vincent A, Li Z, et al. A detailed clinical and molecular survey of subjects with nonsyndromic USH2A retinopathy reveals an allelic hierarchy of disease-causing variants. *Eur J Hum Genet* 2015; **23**(10): 1318-27.
321. Beales PL, Warner AM, Hitman GA, Thakker R, Flinter FA. Bardet-Biedl syndrome: a molecular and phenotypic study of 18 families. *J Med Genet* 1997; **34**(2): 92-8.
322. Klein D, Ammann F. The syndrome of Laurence-Moon-Bardet-Biedl and allied diseases in Switzerland. Clinical, genetic and epidemiological studies. *J Neurol Sci* 1969; **9**(3): 479-513.
323. Farag TI, Teebi AS. Bardet-Biedl and Laurence-Moon syndromes in a mixed Arab population. *Clin Genet* 1988; **33**(2): 78-82.
324. Moore SJ, Green JS, Fan Y, et al. Clinical and genetic epidemiology of Bardet-Biedl syndrome in Newfoundland: a 22-year prospective, population-based, cohort study. *Am J Med Genet A* 2005; **132A**(4): 352-60.
325. Teebi AS. Autosomal recessive disorders among Arabs: an overview from Kuwait. *J Med Genet* 1994; **31**(3): 224-33.
326. Hjortshoj TD, Gronskov K, Brondum-Nielsen K, Rosenberg T. A novel founder BBS1 mutation explains a unique high prevalence of Bardet-Biedl syndrome in the Faroe Islands. *Br J Ophthalmol* 2009; **93**(3): 409-13.
327. Estrada-Cuzcano A, Koenekoop RK, Senechal A, et al. BBS1 mutations in a wide spectrum of phenotypes ranging from nonsyndromic retinitis pigmentosa to Bardet-Biedl syndrome. *Arch Ophthalmol* 2012; **130**(11): 1425-32.
328. Nachury MV, Loktev AV, Zhang Q, et al. A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell* 2007; **129**(6): 1201-13.
329. Stoetzel C, Muller J, Laurier V, et al. Identification of a novel BBS gene (BBS12) highlights the major role of a vertebrate-specific branch of chaperonin-related proteins in Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet* 2007; **80**(1): 1-11.
330. Stoetzel C, Laurier V, Davis EE, et al. BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. *Nat Genet* 2006; **38**(5): 521-4.
331. Mykytyn K, Nishimura DY, Searby CC, et al. Evaluation of complex inheritance involving the most common Bardet-Biedl syndrome locus (BBS1). *Am J Hum Genet* 2003; **72**(2): 429-37.
332. Castro-Sanchez S, Alvarez-Satta M, Corton M, Guillen E, Ayuso C, Valverde D. Exploring genotype-phenotype relationships in Bardet-Biedl syndrome families. *J Med Genet* 2015; **52**(8): 503-13.
333. Billingsley G, Bin J, Fieggen KJ, et al. Mutations in chaperonin-like BBS genes are a major contributor to disease development in a multiethnic Bardet-Biedl syndrome patient population. *J Med Genet* 2010; **47**(7): 453-63.
334. Imhoff O, Marion V, Stoetzel C, et al. Bardet-Biedl syndrome: a study of the renal and cardiovascular phenotypes in a French cohort. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; **6**(1): 22-9.
335. Daniels AB, Sandberg MA, Chen J, Weigel-DiFranco C, Fielding Hejtmancic J, Berson EL. Genotype-phenotype correlations in Bardet-Biedl syndrome. *Arch Ophthalmol* 2012; **130**(7): 901-7.
336. Deveault C, Billingsley G, Duncan JL, et al. BBS genotype-phenotype assessment of a multiethnic patient cohort calls for a revision of the disease definition. *Hum Mutat* 2011; **32**(6): 610-9.
337. Tsujikawa M, Wada Y, Sukegawa M, et al. Age at onset curves of retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 2008; **126**(3): 337-40.
338. den Hollander AI, van Lith-Verhoeven JJ, Arends ML, Strom TM, Cremers FP, Hoyng CB. Novel compound heterozygous TULP1 mutations in a family with severe early-onset retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 2007; **125**(7): 932-5.
339. Benayoun L, Spiegel R, Auslender N, et al. Genetic heterogeneity in two consanguineous families segregating early onset retinal degeneration: the pitfalls of homozygosity mapping. *Am J Med Genet A* 2009; **149A**(4): 650-6.
340. Sohocki MM, Sullivan LS, Mintz-Hittner HA, et al. A range of clinical phenotypes associated with mutations in CRX, a photoreceptor transcription-factor gene. *Am J Hum Genet* 1998; **63**(5): 1307-15.
341. Sieving PA, Fishman GA. Refractive errors of retinitis pigmentosa patients. *Br J Ophthalmol* 1978; **62**(3): 163-7.

342. Kranich H, Bartkowski S, Denton MJ, et al. Autosomal dominant 'sector' retinitis pigmentosa due to a point mutation predicting an Asn-15-Ser substitution of rhodopsin. *Hum Mol Genet* 1993; **2**(6): 813-4.
343. Fagerholm PP, Philipson BT. Cataract in retinitis pigmentosa. An analysis of cataract surgery results and pathological lens changes. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1985; **63**(1): 50-8.
344. Yoshida N, Ikeda Y, Murakami Y, et al. Factors affecting visual acuity after cataract surgery in patients with retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 2015; **122**(5): 903-8.
345. Heckenlively J. The frequency of posterior subcapsular cataract in the hereditary retinal degenerations. *Am J Ophthalmol* 1982; **93**(6): 733-8.
346. Jackson H, Garway-Heath D, Rosen P, Bird AC, Tuft SJ. Outcome of cataract surgery in patients with retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 2001; **85**(8): 936-8.
347. Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng CY. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* 2014; **121**(11): 2081-90.
348. Vizzeri G, Weinreb RN, Gonzalez-Garcia AO, et al. Agreement between spectral-domain and time-domain OCT for measuring RNFL thickness. *Br J Ophthalmol* 2009; **93**(6): 775-81.
349. Milam AH, Li ZY, Fariss RN. Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res* 1998; **17**(2): 175-205.
350. Fariss RN, Li ZY, Milam AH. Abnormalities in rod photoreceptors, amacrine cells, and horizontal cells in human retinas with retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* 2000; **129**(2): 215-23.
351. Newman NM, Stevens RA, Heckenlively JR. Nerve fibre layer loss in diseases of the outer retinal layer. *Br J Ophthalmol* 1987; **71**(1): 21-6.
352. Yildirim MA, Erden B, Tetikoglu M, Kuru O, Elcioglu M. Analysis of the Retinal Nerve Fiber Layer in Retinitis Pigmentosa Using Optic Coherence Tomography. *J Ophthalmol* 2015; **2015**: 157365.
353. Xue K, Wang M, Chen J, Huang X, Xu G. Retinal nerve fiber layer analysis with scanning laser polarimetry and RTVue-OCT in patients of retinitis pigmentosa. *Ophthalmologica* 2013; **229**(1): 38-42.
354. Garcia-Martin E, Rodriguez-Mena D, Dolz I, et al. Influence of cataract surgery on optical coherence tomography and neurophysiology measurements in patients with retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* 2013; **156**(2): 293-303 e2.
355. Hwang YH, Kim SW, Kim YY, Na JH, Kim HK, Sohn YH. Optic nerve head, retinal nerve fiber layer, and macular thickness measurements in young patients with retinitis pigmentosa. *Curr Eye Res* 2012; **37**(10): 914-20.
356. Hood DC, Lin CE, Lazow MA, Locke KG, Zhang X, Birch DG. Thickness of receptor and post-receptor retinal layers in patients with retinitis pigmentosa measured with frequency-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; **50**(5): 2328-36.
357. Oishi A, Otani A, Sasahara M, et al. Retinal nerve fiber layer thickness in patients with retinitis pigmentosa. *Eye (Lond)* 2009; **23**(3): 561-6.
358. Pinilla I, Garcia-Martin E, Fernandez-Larripa S, Fuentes-Broto L, Sanchez-Cano AI, Abecia E. Reproducibility and repeatability of Cirrus and Spectralis Fourier-domain optical coherence tomography of healthy and epiretinal membrane eyes. *Retina* 2013; **33**(7): 1448-55.
359. Rangaswamy NV, Patel HM, Locke KG, Hood DC, Birch DG. A comparison of visual field sensitivity to photoreceptor thickness in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; **51**(8): 4213-9.
360. Lupo S, Grenga PL, Vingolo EM. Fourier-domain optical coherence tomography and microperimetry findings in retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* 2011; **151**(1): 106-11.
361. Fischer MD, Fleischhauer JC, Gillies MC, Sutter FK, Helbig H, Barthelmes D. A new method to monitor visual field defects caused by photoreceptor degeneration by quantitative optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; **49**(8): 3617-21.
362. Hood DC, Ramachandran R, Holopigian K, Lazow M, Birch DG, Greenstein VC. Method for deriving visual field boundaries from OCT scans of patients with retinitis pigmentosa. *Biomed Opt Express* 2011; **2**(5): 1106-14.
363. Sandberg MA, Brockhurst RJ, Gaudio AR, Berson EL. The association between visual acuity and central retinal thickness in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; **46**(9): 3349-54.
364. Aizawa S, Mitamura Y, Baba T, Hagiwara A, Ogata K, Yamamoto S. Correlation between visual function and photoreceptor inner/outer segment junction in patients with retinitis pigmentosa. *Eye (Lond)* 2009; **23**(2): 304-8.

365. Wolsley CJ, Silvestri G, O'Neill J, Saunders KJ, Anderson RS. The association between multifocal electroretinograms and OCT retinal thickness in retinitis pigmentosa patients with good visual acuity. *Eye (Lond)* 2009; **23**(7): 1524-31.
366. Mitamura Y, Mitamura-Aizawa S, Katome T, et al. Photoreceptor impairment and restoration on optical coherence tomographic image. *J Ophthalmol* 2013; **2013**: 518170.
367. Sugita T, Kondo M, Piao CH, Ito Y, Terasaki H. Correlation between macular volume and focal macular electroretinogram in patients with retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; **49**(8): 3551-8.
368. Hajali M, Fishman GA. The prevalence of cystoid macular oedema on optical coherence tomography in retinitis pigmentosa patients without cystic changes on fundus examination. *Eye (Lond)* 2009; **23**(4): 915-9.
369. Hajali M, Fishman GA, Anderson RJ. The prevalence of cystoid macular oedema in retinitis pigmentosa patients determined by optical coherence tomography. *Br J Ophthalmol* 2008; **92**(8): 1065-8.
370. Testa F, Rossi S, Colucci R, et al. Macular abnormalities in Italian patients with retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 2014; **98**(7): 946-50.
371. Hirakawa H, Iijima H, Gohdo T, Tsukahara S. Optical coherence tomography of cystoid macular edema associated with retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* 1999; **128**(2): 185-91.
372. Makiyama Y, Oishi A, Otani A, et al. Prevalence and spatial distribution of cystoid spaces in retinitis pigmentosa: investigation with spectral domain optical coherence tomography. *Retina* 2014; **34**(5): 981-8.
373. Sugahara M, Miyata M, Ishihara K, et al. Optical Coherence Tomography Angiography to Estimate Retinal Blood Flow in Eyes with Retinitis Pigmentosa. *Sci Rep* 2017; **7**: 46396.
374. Phadikar P, Saxena S, Ruia S, Lai TY, Meyer CH, Elliott D. The potential of spectral domain optical coherence tomography imaging based retinal biomarkers. *Int J Retina Vitreous* 2017; **3**: 1.
375. Birch DG, Locke KG, Wen Y, Locke KI, Hoffman DR, Hood DC. Spectral-domain optical coherence tomography measures of outer segment layer progression in patients with X-linked retinitis pigmentosa. *JAMA Ophthalmol* 2013; **131**(9): 1143-50.
376. Birch DG, Locke KG, Felius J, et al. Rates of decline in regions of the visual field defined by frequency-domain optical coherence tomography in patients with RPGR-mediated X-linked retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 2015; **122**(4): 833-9.
377. Hagiwara A, Yamamoto S, Ogata K, et al. Macular abnormalities in patients with retinitis pigmentosa: prevalence on OCT examination and outcomes of vitreoretinal surgery. *Acta Ophthalmol* 2011; **89**(2): e122-5.
378. Giusti C, Forte R, Vingolo EM. Clinical pathogenesis of macular holes in patients affected by retinitis pigmentosa. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2002; **6**(2-3): 45-8.
379. Gorovoy IR, Gallagher DS, Eller AW, Mayercik VA, Friberg TR, Schuman JS. Cystoid macular edema in retinitis pigmentosa patients without associated macular thickening. *Semin Ophthalmol* 2013; **28**(2): 79-83.
380. Robson AG, Saihan Z, Jenkins SA, et al. Functional characterisation and serial imaging of abnormal fundus autofluorescence in patients with retinitis pigmentosa and normal visual acuity. *Br J Ophthalmol* 2006; **90**(4): 472-9.
381. Robson AG, El-Amir A, Bailey C, et al. Pattern ERG correlates of abnormal fundus autofluorescence in patients with retinitis pigmentosa and normal visual acuity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**(8): 3544-50.
382. Robson AG, Michaelides M, Saihan Z, et al. Functional characteristics of patients with retinal dystrophy that manifest abnormal parafoveal annuli of high density fundus autofluorescence; a review and update. *Doc Ophthalmol* 2008; **116**(2): 79-89.
383. Lima LH, Cella W, Greenstein VC, et al. Structural assessment of hyperautofluorescent ring in patients with retinitis pigmentosa. *Retina* 2009; **29**(7): 1025-31.
384. Greenstein VC, Duncker T, Holopigian K, et al. Structural and functional changes associated with normal and abnormal fundus autofluorescence in patients with retinitis pigmentosa. *Retina* 2012; **32**(2): 349-57.
385. Robson AG, Lenassi E, Saihan Z, et al. Comparison of fundus autofluorescence with photopic and scotopic fine matrix mapping in patients with retinitis pigmentosa: 4- to 8-year follow-up. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; **53**(10): 6187-95.
386. Hood DC, Lazow MA, Locke KG, Greenstein VC, Birch DG. The transition zone between healthy and diseased retina in patients with retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; **52**(1): 101-8.

387. Cai CX, Locke KG, Ramachandran R, Birch DG, Hood DC. A comparison of progressive loss of the ellipsoid zone (EZ) band in autosomal dominant and x-linked retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; **55**(11): 7417-22.
388. Lee TJ, Hwang JC, Chen RW, et al. The role of fundus autofluorescence in late-onset retinitis pigmentosa (LORP) diagnosis. *Ophthalmic Genet* 2014; **35**(3): 170-9.
389. Lorentzen SE. Drusen of the optic disk. A clinical and genetic study. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1966: Suppl 90:1-180.
390. Boloc D, Castillo-Lara S, Marfany G, Gonzalez-Duarte R, Abril JF. Distilling a Visual Network of Retinitis Pigmentosa Gene-Protein Interactions to Uncover New Disease Candidates. *PLoS One* 2015; **10**(8): e0135307.

Anexos

1. Informe de evaluación por el comité de ética



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL ÁREA SANITARIA DE GIPUZKOA

D. JOSÉ IGNACIO EMPARANZA KNÖRR, Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Área Sanitaria de Gipuzkoa,

CERTIFICA

Que este Comité Ético de Investigación Clínica del Área Sanitaria de Gipuzkoa ha recibido el siguiente Proyecto de Investigación:

“Caracterización molecular de la Retinitis Pigmentosa en Gipuzkoa: identificación de biomarcadores”

Dicho Proyecto ha sido evaluado en la reunión del CEIC celebrada en el día de la fecha, resultado aprobado según consta en Acta nº 11/2010.

Lo que firmo en San Sebastián, a 14 de Diciembre de 2010

Fdo.: Jose Ignacio Emparanza

Presidente del CEIC del
Hospital Donostia

2. Consentimiento informado para el estudio genético



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Responsable clínico: Dra. Cristina Irigoyen Laborra

Yo.....con
DNI..... declaro bajo mi responsabilidad que he leído la Hoja de Información al paciente, de la que se me ha entregado una copia. Se me han explicado las características y el objetivo de la donación. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.

Sé que se mantendrá en secreto mi identidad y que se identificarán mis muestras con un sistema de codificación. Soy libre de revocar mi consentimiento en cualquier momento y por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre cualquier tratamiento médico presente o futuro.

Yo **DOY MI CONSENTIMIENTO** para que se utilicen mis muestras y los datos de salud asociados como parte del **proyecto de investigación: "Estudio Epidemiológico y molecular de la Retinosis Pigmentaria en Guipúzcoa"**. Consiento participar voluntariamente y renuncio a reclamar cualquier beneficio económico por mi participación en el estudio.

Por la presente afirmo haber obtenido información adecuada sobre la posibilidad de transferir la muestra y la información clínica relacionada con la muestra almacenada en el Hospital Donostia, al Biobanco Vasco para la Investigación coordinado por la Fundación pública BIOEF, para la gestión de la información y disponibilidad para la investigación biomédica de muestras biológicas almacenadas, con criterios de coordinación de recursos.

Por la presente afirmo haber obtenido información adecuada sobre la finalidad de la **conservación**, el lugar de conservación y la seguridad y garantías de cumplimiento de la legalidad vigente que me proporciona el centro encargado de conservar y, en su caso, ceder a terceros las muestras para futuros proyectos de investigación.

Yo **DOY** mi consentimiento (MARCAR LO QUE PROCEDA)
Yo **NO DOY** mi consentimiento

para que, una vez finalizada la investigación, mis muestras y datos de salud se **conserven** en las instalaciones del Hospital Donostia para su utilización en futuras investigaciones relacionadas con el **conocimiento de la Línea de investigación de "Retinosis Pigmentaria"** y con la posibilidad de que se cedan datos clínicos sobre la muestra, excepto los que me identifiquen.

Yo **DOY** mi consentimiento (MARCAR LO QUE PROCEDA)
Yo **NO DOY** mi consentimiento

para que el Hospital Donostia transfiera mis muestras y los datos de salud relevantes de la patología asociada a la **Retinosis Pigmentaria**, al Biobanco Vasco para la Investigación de cara a facilitar y coordinar la cesión de muestras idóneas a futuros proyectos de investigación relevantes.

Yo **DOY** mi consentimiento (MARCAR LO QUE PROCEDA)
Yo **NO DOY** mi consentimiento

para que, mis muestras y datos clínicos asociados, excepto los que me identifiquen, se puedan ceder para ser utilizados en futuras investigaciones relacionadas en el desarrollo de **conocimiento en Retinosis Pigmentaria**.

Fecha Firma del paciente
Fecha Firma representante legal (si procede).....
Nombre representante legal:

Constato que he explicado las características de la cesión de muestras y la posible utilización de las mismas, así como las condiciones de conservación y seguridad que se aplicarán a la muestra y a los datos conservados.

Nombre del Investigador o la persona designada para proporcionar la información:

Fecha Firma
Nombre:


Proyecto de investigación + depósito en Biobanco

3. Volante para la toma de muestra para el biobanco.

 Osakidetza	BIOBANKUA / BIOBANCO		 <small>INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN</small>
	PAZIENTEAREN DATUAK / DATOS DEL PACIENTE	PROBAREN DATUAK / DATOS DE LA PRUEBA	
JARRI HEMEN BARRA-KODEDUN ETIKETA PEGAR ACUÍ ETIQUETA CON CÓDIGO DE BARRAS	Abizenak / Apellidos: Izaia / Nombre: Jaioteguna / Fecha de nacimiento: Sexua / Sexo: GSKo zk. / N° S.S.: Helbidea / Domicilio: Herria / Población: Jaioterrria / Población de nacimiento: HK zk. / N° HC:	Arrazoia / Indicación: Dagokion ikerketa-proiektua / Proyecto de investigación asociado: Data / Fecha realización: Medikua / Doctor: Elkargokide-zk. / N° Colegiado: Zerbitzua / Servicio: Zentroa / Centro:	
<input type="checkbox"/> Biobankuko gordailua / Depósito Biobanco <input type="checkbox"/> Proiektua / Proyecto <input type="checkbox"/> Diagnostikoa / Diagnóstico			
HISTORIA KLINIKOA / HISTORIA CLÍNICA Datu klinikoak / Datos clínicos asociados a la muestra: Erreferentziako patologia, hasierako adina, bigarren mailako diagnostikoak, etab. / Patología de referencia, edad de inicio, diagnósticos secundarios, etc.			
ZUHAITZ GENEALOGIKOAK / ÁRBOL GENEALÓGICO Argi adierazi familiako zein kidek duen gaixotasuna / Indicar claramente los individuos afectados de la familia			
ATERATZE-ESKARIA / PETICIÓN DE EXTRACCIÓN			
ODOLA / SANGRE <input type="checkbox"/> Biobankuko profila / Perfil Biobanco ●● <input type="checkbox"/> ADN ● <input type="checkbox"/> ARN ● <input type="checkbox"/> SERUMA / SUERO ● <input type="checkbox"/> Zelula mononuklearrak / Células mononucleares ● <input type="checkbox"/> Linfotzitoen hilezkortzea / Inmortalización linfocitos ●		LISTUA / SALIVA <input type="checkbox"/> ADN ◆	
		BESTE BATZUK / OTROS <input type="checkbox"/> LZR / LCR <input type="checkbox"/> Beste batzuk (zehaztu) / Otros especificar	
Sinboloen esanahia / Significado de símbolos EDTA (10 ml) ● Seruma / Suero ● EDTA (4 ml) ● Kit Oragene-DNA ◆			
Abisatu lehenballehen Biobankuko Laborategira (ordu erdi bat baino lehen) / Avisar inmediatamente al Laboratorio del Biobanco (antes de 1/2 hora).			

Zalantzak argitzeko, deitu laborategiko telefono edo luzapen hauetara: 943 006 021 - 6021
 En caso de dudas contacte con el laboratorio en el teléfono 943 006 021 o ext. 6021

4. Plantilla Access de obtención de datos clínicos de pacientes y familiares asintomáticos

		ESTUDIO DE RETINOSIS PIGMENTARIA			
NOMBRE:	<input type="text"/>	APELLIDOS:	<input type="text"/>	SEXO:	<input type="text"/>
NºH:	<input type="text"/>	TELÉFONO:	<input type="text"/>	POBLACIÓN:	<input type="text"/>
FECHA NACIMIENTO	<input type="text"/>	FECHA DX:	<input type="text"/>		
EXPLORACIÓN OFTALMOLÓGICA					
AV	OD: <input type="text"/>	PALIDEZ PAPILAR:	<input type="text"/>	TEST COLORES:	<input type="text"/>
	OI: <input type="text"/>	ATENUACIÓN VASCULAR:	<input type="text"/>		<input type="text"/>
CATARATA SCP:	<input type="text"/>	PIGMENTO (ESPÍCULAS):	<input type="text"/>	CAMPO VISUAL:	<input type="text"/>
PIO	OD: <input type="text"/> mmHg	EMQ:	<input type="text"/>	ERG:	<input type="text"/>
	OI: <input type="text"/> mmHg	OTRA P MACULAR:	<input type="text"/>		<input type="text"/>
ASOCIACIONES SISTÉMICAS	AUDIOMETRÍA:	<input type="text"/>	otras:	<input type="text"/>	
GENÉTICA					
HERENCIA:	<input type="text"/>	GENOTIPADO:	<input type="text"/>	CONSANGUINIDAD:	<input type="text"/>
Nº FAMILIARES:	<input type="text"/>	MUTACIONES:	<input type="text"/>	EXTRACCIÓN MUESTRA:	<input type="text"/>

5. Becas concedidas

1. Título del proyecto: Caracterización genético-molecular de los pacientes con distrofias hereditarias de la retina de la C.A. del País Vasco.

Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III/Ministerio de Economía y Competitividad (PI17/01413).

Subvención concedida: 99.220€

Fechas: 2017-2019

Investigador principal: Cristina Irigoyen Laborra

2. Título del proyecto: Caracterización Genético-Molecular de los Pacientes de Retinosis Pigmentaria de la C.A. de Euskadi Mediante un Nuevo Método basado en el Secuenciado Masivo de Última Generación.

Entidad financiadora: Fundación Mutua Madrileña.

Subvención concedida: 42.750 €

Fechas: 2016-2017

Investigador principal: Cristina Irigoyen Laborra

3. Título del proyecto: Caracterización clínica y molecular de los pacientes con distrofias retinianas en la OSI Donostialdea.

Entidad financiadora: Osakidetza. Convocatoria Bottom up 2017.

Subvención concedida: 9.000€

Fechas: 1/04/2017- 31/12/2017

Investigador responsable: Cristina Irigoyen Laborra

4. Título del proyecto: Creación de Unidad de Distrofias Retinianas en la OSI Donostialdea. Centro de referencia para el estudio clínico y genético de las enfermedades hereditarias de la retina.

Entidad financiadora: Osakidetza. Convocatoria Bottom up 2016.

Subvención concedida: 18.000€

Fechas: 1/01/2016- 31/12/2016

Investigador responsable: Cristina Irigoyen Laborra

5. Beca intensificación actividad investigadora. Colegio de Médicos de Guipuzcoa-Biodonostia.

Subvención concedida: importe correspondiente a la liberación de media jornada.

Fechas: 1/06/2015-1/12/2015

6. Título del proyecto: Estudio de los microRNAs en pacientes y en modelos murinos de retinosis pigmentaria: nuevas dianas terapéuticas.

Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III/Ministerio de Economía y Competitividad (PI/02621).

Subvención concedida: 57.475 €

Puesto desempeñado: Investigadora colaboradora

Fecha inicio: 01/01/2014 Fecha fin: 31/12/2016

Investigador/a responsable: Javier Ruiz-Ederra

7. Título del proyecto: Caracterización genético-molecular de la Retinosis Pigmentaria en Guipúzcoa.

Entidad financiadora: Asociación de Afectados por la Retinosis Pigmentaria de Gipuzkoa (BEGISARE)(BIOD10/011).

Subvención concedida: 49.410 €

Puesto desempeñado: Investigadora clínica

Fecha inicio: 01/01/2011 Fecha fin: 31/12/2013

Investigador principal: Javier Ruiz-Ederra

Colaboradores: Anasagasti A, Barandika O

8. Título del proyecto: Caracterización molecular de la retinitis pigmentosa en Gipuzkoa: búsqueda de biomarcadores y desarrollo de abordajes terapéuticos genético-celulares en modelos murinos.

Entidad financiadora: Departamento de Industria, Gobierno Vasco (SAIOTEK:SAIO11-PE11BN002)

Puesto desempeñado: Investigadora colaboradora

Subvención concedida: 58.953€

Fechas: 2011-2012

Investigador/a responsable: Javier Ruiz Ederra

