



**TESIS DOCTORAL**  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS FORMAS PRECOCES DE  
DISTROFIA DE RETINA RECESIVAS Y ESPORÁDICAS EN  
POBLACIÓN ESPAÑOLA: AMAUROSIS CONGÉNITA DE LEBER Y  
RETINOSIS PIGMENTARIA DE INICIO PRECOZ**

SORINA DANIELA TATU  
Licenciada en Biología

Directoras:  
CARMEN AYUSO GARCÍA  
MARTA CORTÓN PÉREZ

Madrid, 2015

*A Antón*

*A mi familia*

## AGRADECIMIENTOS

A mis directoras de tesis, *Carmen Ayuso* y *Marta Cortón*; sin ellas esta tesis no habría sido posible. A *Carmen* por su ayuda, apoyo y confianza, y por darme la oportunidad de adentrarme en el fascinante mundo de las distrofias de retina. A *Marta* por su enorme paciencia, su ayuda con mis dudas, sus comentarios constructivos, y en suma, por estar siempre ahí.

A mi tutor de tesis *José Fernández Piqueras*, por su gran amabilidad y su atención.

Esta tesis se pudo realizar gracias a una beca concedida por la *Fundación Conchita Rábago*.

Gracias a los pacientes y sus familias por su colaboración. Esta tesis va dedicada sobre todo a ellos, con la esperanza de que los resultados puedan contribuir a mejorar su calidad de vida.

A mis *compañeros* del Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz por sus consejos y los muchos buenos y malos momentos que hemos compartido.

A mis amigos, *Delia, Mari, Mariana, Elena, Isma, Laura, Irene, Maite, Carmen* y *Corina* por su amistad y sus ánimos a lo largo de todos estos años.

## **RESUMEN**

Las distrofias hereditarias de la retina (DR) son un conjunto de trastornos que se producen por una degeneración primaria y progresiva de fotorreceptores. Entre ellas, la amaurosis congénita de Leber (LCA) representa la forma más precoz y severa, ocasionando discapacidad visual grave o ceguera antes del primer año de vida. Su prevalencia varía entre 1:30000-80000. La retinosis pigmentaria de inicio precoz (RP-IP) es una degeneración primaria de los bastones, apareciendo en la primera década de vida.

Estas enfermedades se deben a mutaciones en genes que se expresan en los fotorreceptores o en el epitelio pigmentario de la retina. Se pueden presentar con todos los tipos de herencia, y muestran una gran heterogeneidad clínica y genética.

El presente trabajo supone una continuación y ampliación de estudios anteriores, y en él se ha realizado el estudio molecular de 130 familias LCA y 290 familias RP-IP de origen español, tanto para caracterizarlas como para evaluar en mayor profundidad el espectro mutacional en la población española. Mediante el empleo de las técnicas de *microarray* APEX, secuenciación Sanger y MLPA, se han estudiado los genes *AIPL1*, *CEP290*, *LCA5*, *MERTK*, *RDH12*, *RPE65* y *RPGRIP1* en la cohorte LCA, y se ha realizado un estudio detallado de los genes *CRB1* y *NMNAT1* en la cohorte RP-IP y en la cohorte LCA, en el que además se usaron las técnicas de HRM y mapeo de homocigosidad.

Este trabajo constituye el primer estudio del gen *NMNAT1* en la población española. Asimismo, se trata del primer trabajo en el que se ha aplicado la técnica de HRM a pacientes LCA y RP-IP, para el cribado mutacional del gen *CRB1*.

Como resultado, se consiguió caracterizar el 30,8% de las familias LCA estudiadas, a lo que hay que añadir un 10% de familias en las que se encontró sólo una mutación, haciendo un total de 40,8% familias con mutaciones detectadas. Por genes, los más frecuentes fueron *CRB1*, *NMNAT1* y *CEP290*, detectados respectivamente en el 13,8%, el 7,7% y el 6,9% de las familias con mutaciones. Estos resultados confirman, como se vio en estudios anteriores, que *CRB1* es el gen más prevalente entre los afectados de LCA españoles, a la vez que muestran la importancia del gen *NMNAT1*. Las mutaciones más frecuentes fueron p.Cys948Tyr en *CRB1*, p.Glu257Lys en *NMNAT1* y p.Cys998\* en *CEP290*, y también han sido descritas en otras poblaciones, no existiendo mutaciones fundadoras específicas de la población española.

Entre las familias RP-IP, se detectaron dos mutaciones en el gen *CRB1* en el 9% de las familias, y una sola mutación en el 0,7%. La mutación más frecuente en *CRB1*, p.Cys948Tyr, ha sido descrita en otras poblaciones. Existen también otras mutaciones frecuentes, p.Ile1100Thr y p.Ile167\_Gly169del, que podrían ser específicas de la población española.

Tanto en el presente estudio como en estudios anteriores realizados en la población española se ha descrito un gran número de nuevas variantes, pero todas ellas con una baja frecuencia. Esto parece indicar que la población española tiene un espectro mutacional más heterogéneo que otras poblaciones. Serían necesarios más estudios para confirmar cuáles de estas mutaciones son específicas de la población española.

Inherited retinal dystrophies (RD) are a group of disorders caused by a primary and progressive photoreceptor cells degeneration. Among them, Leber congenital amaurosis (LCA) is the earliest and most severe form, causing severe visual impairment or blindness before the age one. Its prevalence varies between 1:30000-80000. Early-onset retinitis pigmentosa (EORP) is a rod primary degeneration, appearing during the first decade of life.

These diseases are caused by mutations in genes expressed in photoreceptor cells or in retinal pigment epithelium (RPE). They can appear with all patterns of inheritance and show a big genetic and clinical heterogeneity.

Being a continuation and extension of previous studies, 130 LCA and 290 EORP Spanish families have been studied in this work, with the aims of genetically characterize them and assess in deeper detail the mutation spectrum of Spanish population. APEX microarray, Sanger sequencing and MLPA were used to evaluate the genes *AIP1*, *CEP290*, *LCA5*, *MERTK*, *RDH12*, *RPE65*, *RPGRI1* in our LCA cohort. A detailed study has been carried out for *CRB1* and *NMNAT1* genes in out both LCA and EORP cohorts, for which HRM and homozygosity mapping techniques have been additionally used.

This work is the first one to study *NMNAT1* gene in Spanish population. Moreover, this is the first work where HRM technique has been used to perform a *CRB1* mutation screening in LCA and EORP patients.

As result, 30.8% of the studied LCA families were characterized and only one mutation was found in 10% of families, thus making a total of 40.8% of families with detected mutations. The most frequently mutated genes were *CRB1*, *NMNAT1* and *CEP290*, which were detected in 13.8%, 7.7% and 6.9% of families with mutations respectively. These results confirm, that *CRB1* is the most frequently mutated gene in Spanish LCA patients, and also show the importance of *NMNAT1* gene as seen in previous studies. The most frequent mutations were p.Cys948Tyr in *CRB1*, p.Glu257Lys in *NMNAT1* and p.Cys998\* in *CEP290*. These mutations have been described in other populations, and no Spanish population-specific founder mutations have been observed in our study.

Two *CRB1* mutations have been detected in 9% of EORP families, and one mutation in 0.7%. The most frequent *CRB1* mutation, p.Cys948Tyr, has been described in other populations. There are other frequent mutations, such as, p.Ile1100Thr and p.Ile167\_Gly169del, that could be specific to Spanish population.

In this study as well as in previous studies carried out in Spanish population many new variants have been described, but all of them have a low frequency. This seems to point out that Spanish population has a more heterogeneous mutation spectrum than other populations. More studies are needed in order to confirm which of these mutations are specific to Spanish population.

## ÍNDICE

## ÍNDICE

Clave de abreviaturas .....	7
1. Introducción.....	13
1.1. Anatomía del ojo humano .....	15
1.1.1. Estructura del globo ocular .....	15
1.2. Breve descripción de la anatomía y fisiología de la retina .....	15
1.2.1. Capa de conos y bastones.....	17
1.2.2. Fototransducción .....	18
1.3. Distrofias hereditarias de la retina.....	21
1.4. Amaurosis congénita de Leber (LCA) .....	22
1.5. Retinosis pigmentaria de inicio precoz (RP-IP) .....	23
1.6. Genes analizados en este trabajo.....	26
1.6.1. Gen <i>AIP1</i> .....	26
1.6.2. Gen <i>CEP290</i> .....	26
1.6.3. Gen <i>CRB1</i> .....	28
1.6.4. Gen <i>LCA5</i> .....	29
1.6.5. Gen <i>MERTK</i> .....	29
1.6.6. Gen <i>NMNAT1</i> .....	30
1.6.7. Gen <i>RDH12</i> .....	31
1.6.8. Gen <i>RPE65</i> .....	31
1.7. Estrategias para el estudio molecular de LCA y otras DR.....	32
1.8. Terapias oculares.....	32
1.8.1. Terapia génica.....	32
1.8.2. Células madre pluripotentes inducidas (iPSC).....	33
1.8.3. Farmacológica.....	34
1.8.4. Optogenética.....	34
2. Objetivos .....	35
3. Pacientes y métodos.....	39
3.1. Sujetos de estudio.....	41
3.1.1. Pacientes.....	41
3.1.2. Individuos control .....	42
3.2. Métodos.....	42
3.2.1. Extracción de ADN .....	42
3.2.2. <i>Microarrays</i> de genotipado.....	42
3.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa - PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) .....	44
3.2.4. Técnica de HRM ( <i>High Resolution Melting</i> ) .....	48
3.2.5. Secuenciación automática.....	51
3.2.6. Técnica de MLPA ( <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> ).....	51
3.2.7. Estudio genético indirecto.....	52
3.2.8. Valoración de la patogenicidad y clasificación de las nuevas variantes.....	53
3.2.9. Sensibilidad y especificidad .....	56
3.2.10. Herramientas bioinformáticas .....	56
3.2.11. Nomenclatura de genes y variantes.....	57
3.2.12. Protocolo para el estudio molecular .....	57
4. Resultados.....	59
4.1. Cribado mutacional mediante el <i>microarray</i> de genotipado específico de LCA.....	63
4.1.1. Otras variantes detectadas por el <i>microarray</i> .....	67
4.1.2. Discrepancias <i>microarray</i> de genotipado versus secuenciación. Sensibilidad y especificidad. ....	67
4.1.3. Gen <i>AIP1</i> : familias con mutación.....	69
4.1.4. Gen <i>CEP290</i> : familias con mutación .....	70
4.1.5. Gen <i>CRB1</i> : familias con mutación.....	72
4.1.6. Gen <i>LCA5</i> : familias con mutación.....	72
4.1.7. Gen <i>MERTK</i> : familias con mutación .....	73
4.1.8. Gen <i>RDH12</i> : familias con mutación .....	75
4.1.9. Gen <i>RPE65</i> : familias con mutación.....	76
4.1.10. Gen <i>RPGRIP1</i> : familias con mutación.....	80
4.2. Estudio mutacional del gen <i>CRB1</i> .....	81



4.2.1. Estudios previos.....	83
4.2.2. Hallazgos genéticos empleando el <i>microarray</i> de genotipado APEX como primera herramienta .....	83
4.2.3. Estudios adicionales en pacientes con un sólo alelo mutado detectado por el <i>microarray</i> . .....	84
4.2.4. Estudios indirectos en familias LCA y RP-IP con resultados negativos .....	84
4.2.5. Estudio mutacional del gen <i>CRB1</i> mediante HRM en pacientes españoles .....	94
4.2.6. Estudio mutacional del gen <i>CRB1</i> mediante secuenciación directa. ....	96
4.2.7. Nuevas variantes del gen <i>CRB1</i> consideradas como patógenas.....	96
4.2.8. Otras variantes detectadas en <i>CRB1</i> .....	97
4.2.9. Resumen de resultados en el gen <i>CRB1</i> .....	102
4.3. Estudio mutacional del gen <i>NMNAT1</i> .....	105
4.3.1. Familias con dos mutaciones en el gen <i>NMNAT1</i> .....	108
4.3.2. Familias con una mutación en el gen <i>NMNAT1</i> .....	111
4.3.3. Resumen de resultados del gen <i>NMNAT1</i> .....	111
4.4. Resumen global de los resultados.....	113
4.4.1. Resumen global de los resultados de la cohorte LCA .....	115
4.4.2. Resumen global de resultados en familias RP-IP .....	116
4.4.3. Resumen global de las nuevas variantes detectadas .....	117
5. Discusión.....	119
5.1. <i>Microarray</i> de genotipado específico de LCA .....	121
5.2. Estudio del gen <i>CRB1</i> .....	125
5.3. Estudio del gen <i>NMNAT1</i> .....	129
5.4. Otras variantes.....	131
5.4.1. Variantes en <i>CRB1</i> .....	132
5.4.2. Variantes en <i>AIPL1</i> .....	135
5.4.3. Variantes en <i>CRX</i> .....	136
5.4.4. Variantes en <i>RPGRIP1</i> .....	136
5.5. Evaluación global de los resultados .....	136
5.6. Técnicas de diagnóstico .....	137
6. Conclusiones .....	139
Bibliografía .....	143
Anexo I: Material suplementario.....	161
Tablas .....	163
Estructura de las 130 familias LCA estudiadas.....	165
Estructura de las 290 familias RP-IP estudiadas .....	173
Anexo II: Publicaciones .....	193

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. <i>Anatomía del ojo humano.</i> .....	15
Figura 1.2. <i>Representación esquemática de la retina humana mostrando su organización en capas.</i> .....	16
Figura 1.3. <i>Estructura de los fotorreceptores: bastón y cono.</i> .....	18
Figura 1.4. <i>Ciclo visual en los bastones.</i> .....	19
Figura 1.5. <i>Cascada de la fototransducción.</i> .....	20
Figura 1.6. <i>Solapamiento genético entre las distintas DR no sindrómicas.</i> .....	22
Figura 1.7. <i>Estructura de las proteínas codificadas por los genes estudiados en este trabajo.</i> .....	27
Figura 1.8. <i>Vías de síntesis de NAD<sup>+</sup> y participación de la proteína NMNAT1.</i> .....	30
Figura 3.1. <i>Funcionamiento de la técnica APEX.</i> .....	43
Figura 3.2. <i>Programa estándar de PCR.</i> .....	44
Figura 3.3. <i>Programa de PCR empleado para los exones 2 y 4 del gen NMNAT1.</i> .....	46
Figura 3.4. <i>Programa de PCR empleado para el gen RPE65.</i> .....	47
Figura 3.5. <i>Programa empleado en la técnica HRM.</i> .....	49
Figura 3.6. <i>Metodología de clasificación de las variantes detectadas en este estudio.</i> .....	55
Figura 4.1. <i>Representación gráfica de los resultados del microarray de LCA, por genes.</i> .....	66
Figura 4.2. <i>Análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen AIPL1.</i> .....	69
Figura 4.3. <i>Análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen CEP290.</i> .....	71
Figura 4.4. <i>Alineamiento múltiple de la secuencia de la proteína lebercilina en 23 especies.</i> .....	72
Figura 4.5. <i>Análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen LCA5.</i> .....	73
Figura 4.6. <i>Conservación evolutiva de la nueva variante missense p.Gly743Val en la proteína MERTK y sus ortólogas en 18 especies.</i> .....	74
Figura 4.7. <i>Análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen MERTK.</i> .....	74
Figura 4.8. <i>Análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen RDH12.</i> .....	76
Figura 4.9. <i>Conservación evolutiva de la nueva variante missense p.Gly48Glu en la proteína RPE65 y sus ortólogas en 18 especies.</i> .....	77
Figura 4.10. <i>Conservación evolutiva de la nueva variante missense p.Gly48Glu en la proteína RPE65 y sus ortólogas en 18 especies.</i> .....	78
Figura 4.11. <i>Análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen RPE65.</i> .....	79
Figura 4.12. <i>Estudio de cosegregación del gen RPGRIP1 en la familia LCA-0029.</i> .....	80
Figura 4.13. <i>Pedigrees de las familias LCA caracterizadas y análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen CRB1.</i> .....	88
Figura 4.14. <i>Pedigrees de las familias RP-IP caracterizadas y análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen CRB1.</i> .....	90
Figura 4.15. <i>Pedigrees de las familias con fenotipos LCA y RP-IP caracterizadas y análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen CRB1.</i> .....	92
Figura 4.16. <i>Curvas de disociación normalizadas y gráficas de diferencias de la técnica HRM.</i> .....	95
Figura 4.17. <i>Conservación evolutiva de variantes missense en la proteína CRB1 en 18 especies.</i> .....	99
Figura 4.18. <i>Variantes detectadas en el gen CRB1.</i> .....	101
Figura 4.19. <i>Prevalencia de las mutaciones en CRB1, por porcentaje de familias LCA y RP-IP, agrupadas por tipo de mutación y combinaciones.</i> .....	103
Figura 4.20. <i>Porcentaje de prevalencia de las mutaciones más frecuentes en la cohorte de este estudio, por familias LCA y RP-IP.</i> .....	104
Figura 4.21. <i>Electroferogramas que muestran las variantes detectadas en el gen NMNAT1.</i> .....	107
Figura 4.22. <i>Variantes detectadas en el gen NMNAT1.</i> .....	108
Figura 4.23. <i>Conservación evolutiva de la nueva variante missense p.Val151Ala en la proteína NMNAT1 y sus ortólogas en 16 especies.</i> .....	109
Figura 4.24. <i>Pedigrees de las familias portadoras de dos mutaciones detectadas en NMNAT1.</i> .....	110
Figura 4.25. <i>Pedigrees de las familias portadoras del primer alelo p.Glu257Lys en heterocigosis, y análisis de segregación.</i> .....	111
Figura 4.26. <i>Porcentaje de familias con mutaciones en genes LCA.</i> .....	116

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. <i>Comparación entre bastones y conos</i> .....	17
Tabla 1.2. <i>Genes involucrados en LCA</i> .....	24
Tabla 1.3. <i>Estudios de terapia génica en genes asociados a LCA</i> .....	33
Tabla 3.1. <i>Número de variantes incluidas en cada versión del microarray de LCA</i> .....	43
Tabla 3.2. <i>Condiciones generales PCR</i> .....	44
Tabla 3.3. <i>Cebadores empleados para amplificación del gen AIPL1</i> .....	45
Tabla 3.4. <i>Cebadores empleados para amplificación del gen CEP290</i> .....	45
Tabla 3.5. <i>Cebadores empleados para amplificación del gen LCA5</i> .....	46
Tabla 3.6. <i>Cebadores empleados para amplificación del gen MERTK</i> .....	46
Tabla 3.7. <i>Cebadores empleados para amplificación del gen NMNAT1</i> .....	46
Tabla 3.8. <i>Cebadores empleados para amplificación del gen RDH12</i> .....	47
Tabla 3.9. <i>Cebadores empleados para amplificación del gen RPE65</i> .....	47
Tabla 3.10. <i>Condiciones de PCR empleadas para el gen RPE65</i> .....	47
Tabla 3.11. <i>Componentes utilizados para la técnica de HRM</i> .....	49
Tabla 3.12. <i>Cebadores empleados para amplificación del gen CRB1</i> .....	50
Tabla 3.13. <i>Reactivos de la reacción de secuenciación</i> .....	51
Tabla 3.14. <i>Microsatélites del gen CRB1</i> .....	52
Tabla 3.15. <i>Microsatélites del gen RPGRIP1</i> .....	52
Tabla 3.16. <i>Programas para evaluación in silico</i> .....	54
Tabla 4.1. <i>Familias con señales anómalas</i> .....	65
Tabla 4.2. <i>Resultados del microarray de LCA, desglosados por genes</i> .....	66
Tabla 4.3. <i>Otras variantes detectadas por el microarray de LCA</i> .....	68
Tabla 4.4. <i>Mutaciones detectadas en el gen AIPL1</i> .....	69
Tabla 4.5. <i>Mutaciones detectadas en el gen CEP290</i> .....	70
Tabla 4.6. <i>Mutaciones detectadas en el gen LCA5</i> .....	72
Tabla 4.7. <i>Mutaciones detectadas en el gen RDH12</i> .....	75
Tabla 4.8. <i>Mutaciones detectadas en el gen RPE65</i> .....	77
Tabla 4.9. <i>Familias LCA con mutaciones detectadas en el gen CRB1</i> .....	85
Tabla 4.10. <i>Familias RP-IP con mutaciones detectadas en el gen CRB1</i> .....	86
Tabla 4.11. <i>Variantes detectadas en CRB1 mediante HRM</i> .....	96
Tabla 4.12. <i>Nuevas variantes missense patogénicas en CRB1: análisis in silico y conservación evolutiva</i> .....	98
Tabla 4.13. <i>Otras variantes detectadas en CRB1</i> .....	100
Tabla 4.14. <i>Desglose del número de familias caracterizadas, por técnica</i> .....	102
Tabla 4.15. <i>Número de familias con variantes encontradas en CRB1</i> .....	102
Tabla 4.16. <i>Familias con mutaciones en genes LCA. Cohorte estudiada: 130 familias</i> .....	115
Tabla 4.17. <i>Estado de las variantes encontradas en las familias caracterizadas</i> .....	116
Tabla 4.18. <i>Variantes nuevas detectadas en este estudio, por tipo y gen</i> .....	117
Tabla 5.1. <i>Comparación de resultados obtenidos con la versión 1 y la versión 2 del microarray de LCA</i> .....	122
Tabla I. <i>Comparación de resultados de diferentes estudios empleando el microarray de LCA</i> .....	163

## **CLAVE DE ABREVIATURAS**

## A

**aa:** Aminoácidos

**AD:** Autosómico dominante

**AR:** Autosómico recesivo

**ALMS:** Síndrome de Alström

**AV:** Agudeza visual

**AAV:** Virus adeno-asociados

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico (*DNA*)

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario

**ADNg:** ADN genómico (*gDNA*)

**AON:** Nucleótidos *antisense*

**APEX:** *Arrayed Primer Extension*

**ARN:** Ácido ribonucleico (*RNA*)

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**arRP:** Retinosis pigmentaria autosómica recesiva (*autosomal recessive Retinitis Pigmentosa*)

**AVC:** Alteración en la visión de los colores

## B

**BBS:** Síndrome de Bardet Biedl

## C

**CGH:** *Comparative Genomic Hybridization*

**cM:** centiMorgan

**CN:** Ceguera nocturna

**CNCE:** Ceguera nocturna congénita estacionaria

**CNV:** variación en el número de copias

**CV:** Campo visual

## D

**DBC:** Distrofia de bastones y conos

**DC:** Distrofia de conos

**DCB:** Distrofia de conos y bastones

**DM:** Distrofia macular

**DMAE:** Degeneración macular asociada a la edad

**dNTPs:** Deoxirribonucleótidos trifosfato

**ddNTPs:** Dideoxirribonucleótidos trifosfato

**dHPLC:** Cromatografía líquida de alto rendimiento (*denaturing High-Performance Liquid Chromatography*)

**DR:** Distrofia hereditaria de retina

## E

**EPR:** Epitelio Pigmentario de la Retina

**ERG:** Electrorretinograma

## F

**Fam.:** Familia

**FO:** Fondo de ojo

## H

**HRM:** Curvas de disociación de alta resolución (*High Resolution Melting*)

## I

**iPSC:** Células madre pluripotentes inducidas

## K

**kb:** Kilobase

## J

**JS:** Síndrome de Joubert

## L

**LCA:** Amaurosis congénita de Leber

## M

**Mb:** Megabase

**MIF:** Matriz interfotorreceptor

**MKS:** Síndrome de Meckel-Grüber

**MLPA:** (*Multiplex Ligation Probe Amplification*)

## N

**NaAD:** Ácido nicotínico adenina dinucleótido

**NADS:** Sintetasa NAD

**NaMN:** Ácido nicotínico mononucleótido

**nm:** Nanómetros

**NGS:** *Next Generation Sequencing*

**NPT:** Ácido nicotínico fosforribosiltransferasa

**NRK:** Quinasa nicotinamida ribosa

## P

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PEV:** Potenciales evocados visuales

**PNP:** Purina nucleósido fosforilasa

**PPRPE:** Preservación del epitelio pigmentario para-arteriolar

## R

**RAL:** Retinal

**ROL:** Retinol

**RP:** Retinosis pigmentaria

**RP-IP:** Retinosis pigmentaria de inicio precoz

**RT-PCR:** PCR con retrotranscripción inversa (*Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction*)

## S

**SE:** Segmento externo

**SLS:** Síndrome de Senior-Loken

**SNC:** Sistema nervioso central

**SNPs:** Polimorfismos de un sólo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*)

**SSCP:** Polimorfismo conformacional de cadena sencilla (*Single-Strand Conformational Analysis*)

**STRs:** Marcadores microsatélite (*short tandem repeats*)

## V

**VREF:** Vitreorretinopatía exudativa familiar

**VUS:** Variante de significado incierto (*variant of uncertain significance*)

## W

**WES:** *Whole Exome Sequencing*

## X

**XL:** Ligado al cromosoma X

# 1. INTRODUCCIÓN

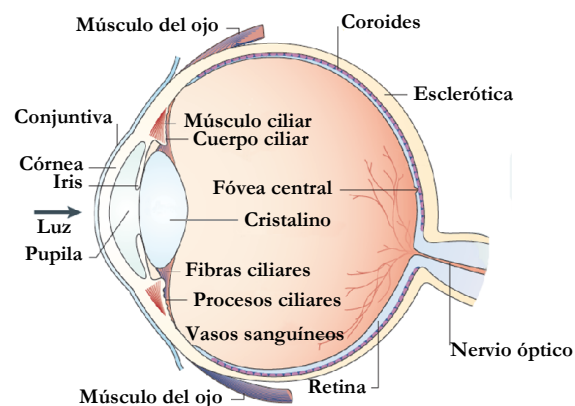


## 1.1. ANATOMÍA DEL OJO HUMANO

### 1.1.1. Estructura del globo ocular

Los ojos son, sin duda, las estructuras más delicadas del cuerpo humano a través de las cuales vemos el mundo que nos rodea. En el proceso de la visión están involucrados los ojos y el cerebro que actúan conjunta y coordinadamente para que podamos percibir objetos y escenas visuales. Anatómicamente el ojo está compuesto por el globo ocular y los órganos anexos (cejas, párpados, conjuntiva, aparato lagrimal y músculos oculares). El globo ocular está envuelto por tres capas de disposición concéntrica (**Figura 1.1**):

- La capa más externa o túnica fibrosa se compone de la esclerótica o “blanco del ojo” en la parte posterior, formada por fibras elásticas y colágeno, es la que se encarga de proteger todo el contenido ocular y mantener la forma esférica del ojo; y la córnea en la parte anterior, un tejido transparente avascular donde se refractan los rayos de luz que inciden en el ojo.
- La capa intermedia o túnica vascular está constituida por el iris y el cuerpo ciliar en la parte anterior, y la coroides en la parte posterior, siendo la encargada de la vascularización del ojo.
- La capa más interna o túnica neurosensorial es la retina y en ella se inicia el proceso de la visión, siendo la encargada de transformar las radiaciones electromagnéticas en señales nerviosas que son enviadas a través de las neuronas hacia el cerebro. Es un tejido delgado y transparente que recubre el interior de la pared ocular.



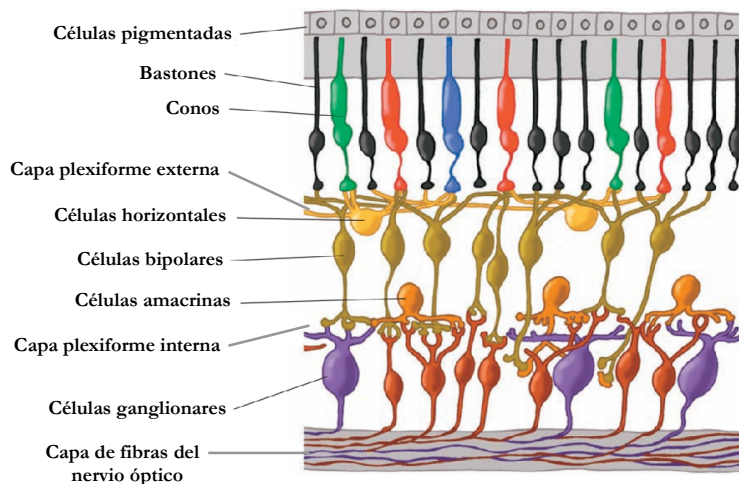
**Figura 1.1.** *Anatomía del ojo humano.* La luz atraviesa el ojo a través de la pupila, el sistema de lentes y el humor vítreo antes de llegar a la retina fotosensible. Adaptada de Wright *et al.*, 2010 [181].

## 1.2. BREVE DESCRIPCIÓN DE LA ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DE LA RETINA

En la retina se distinguen dos partes: una anterior o ciega que tapiza la cara posterior del cuerpo ciliar, los procesos ciliares y el iris, y otra posterior o visual que se extiende desde la papila del nervio óptico hasta la *ora serrata*. En la retina posterior, se observan dos áreas anatómicamente distinguibles, la papila del nervio óptico y la mácula. La papila o punto ciego es la zona a través de la cual salen los axones de las células ganglionares, que constituyen las fibras del nervio óptico y llegan al cerebro. La denominación “punto ciego” se debe a que en esta zona no existen fotorreceptores y por lo tanto, no hay

fotosensibilidad. La mácula se encuentra en la parte central de la retina posterior, tiene un diámetro de 5,5 mm y se especializa en la visión más precisa y detallada.

En la retina posterior existe gran diversidad celular, habiendo células neuronales y otros tipos celulares, que conforman una estructura estratificada compleja. (Figura 1.2). La retina de los vertebrados se divide en dos partes: el epitelio pigmentario y la neurorretina [125].



**Figura 1.2.** Representación esquemática de la retina humana mostrando su organización en capas. Adaptada de <http://webvision.med.utah.edu/>.

El epitelio pigmentario de la retina (EPR) constituye la parte más externa, y se encuentra adherido a la membrana de Bruch, que lo separa de la coroides. El EPR o retina no sensorial es una monocapa de células epiteliales que contienen melanina, teniendo una mayor concentración aquellas que se localizan en la zona macular. Estas células tienen su membrana apical en íntimo contacto con los segmentos externos de los fotorreceptores [149].

Las funciones más importantes del EPR son: 1) Degradar los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores, fagocitándolos y renovándolos; 2) Participar en el ciclo de la vitamina A, regenerando 11-*cis*-retinal a partir de todo-*trans*-retinal; 3) Sintetizar melanina para absorber la luz que no es capturada por los fotorreceptores, impidiendo que ésta se disperse dentro del ojo; 4) Proporcionar nutrientes como glucosa, retinol y ácidos grasos omega 3 desde el torrente sanguíneo a los fotorreceptores; 5) Transportar iones y agua desde el espacio subretinal; 6) Secretar factores de crecimiento que son esenciales para la integridad estructural de la retina.

La neurorretina forma parte del sistema nervioso central (SNC), y está constituida por células neuronales estructuradas en distintas capas: capa de fotorreceptores, limitante externa, nuclear externa, plexiforme externa o capa de Henle, nuclear interna, plexiforme interna, capa de células ganglionares, capa de fibras del nervio óptico y limitante interna (Figura 1.2).

Tres de estas capas están constituidas por los cuerpos de las células neuronales. La capa nuclear externa está formada por los cuerpos celulares de los fotorreceptores. La capa nuclear interna está constituida por los cuerpos celulares de las células bipolares, horizontales, amacrinas e interplexiformes. La capa de células ganglionares se compone tanto de los cuerpos de las células del mismo nombre como de cuerpos de células amacrinas, que se denominan células amacrinas desplazadas. Las tres capas anteriores están

separadas por dos capas plexiformes: la plexiforme externa, en donde los axones de los fotorreceptores establecen sinapsis con las dendritas de las células bipolares y horizontales; y la plexiforme interna, en la cual se producen las sinapsis entre los axones de las células bipolares con las dendritas de las células ganglionares y amacrinas. La capa de fibras ópticas está formada especialmente por los axones de las células ganglionares y astrocitos que constituyen el nervio óptico.

Los otros tipos de células que existen en la retina son:

- Células gliales, que realizan una función de sostén de las neuronas retinianas. Las principales células gliales son las células de Müller, de gran tamaño y que tienen sus núcleos en la capa nuclear interna y sus prolongaciones atraviesan transversalmente toda la retina desde la limitante externa hasta la limitante interna. Otros tipos de células gliales son las células de microglía y los astrocitos, estos últimos encontrándose de forma abundante en la capa de fibras ópticas.
- Células correspondientes a los vasos sanguíneos que forman una amplia red capilar que irriga la retina.

### 1.2.1. Capa de conos y bastones

El fotorreceptor es la primera neurona del ciclo visual, siendo el encargado de convertir señales luminosas en señales electroquímicas que son transmitidas por el nervio óptico hasta el lóbulo occipital del cerebro para su posterior procesamiento. Este proceso de conversión se denomina fototransducción (véase el apartado 1.2.2). Para llegar a los fotorreceptores, la luz ha de pasar por todas las capas más internas de la retina.

Existen dos tipos de fotorreceptores, los conos y los bastones, que se diferencian entre sí por varias características: a) la forma que adoptan sus segmentos externos, b) el tipo de pigmento visual que contienen, c) su distribución en la retina, d) su función; tal como queda recogido en la **Tabla 1.1**. Los bastones se llaman así por la forma cilíndrica que toman sus segmentos externos, mientras que los segmentos externos de los conos tienen forma cónica.

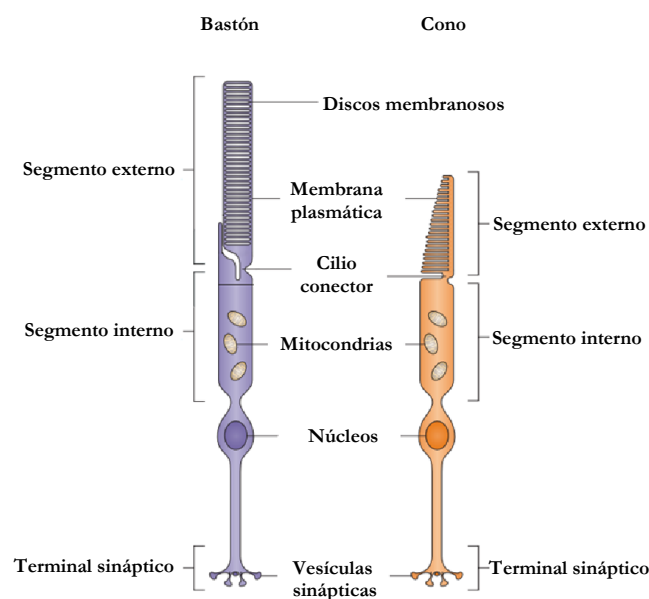
**Tabla 1.1.** Comparación entre bastones y conos.

	Bastones	Conos
<b>Estructura</b>	Discos no unidos a membrana 1 tipo fotopigmento	Discos unidos 3 fotopigmentos: rojo, verde, azul
<b>Localización</b>	Toda la retina No en fovea Representan el 95%	Mácula Concentrados en fovea Sólo 5%
<b>Función</b>	Visión nocturna Campo visual periférico Visión en blanco y negro	Visión diurna Agudeza visual (AV) Visión en color
<b>Lesión</b>	Ceguera nocturna (CN) Disminución del campo visual	Pérdida AV Discromatopsia Fotofobia

Los fotorreceptores son las células más abundantes de la retina y se estima que cada ojo contiene alrededor de 120 millones de bastones y 6 millones de conos. Ambos tipos celulares tienen una estructura básica común formada por el terminal sináptico, y un segmento externo y un segmento interno, conectados mediante un cilio conector que sirve de transporte entre ambos (**Figura 1.3**). En el segmento

interno se distinguen dos porciones, una escleral o elipsoide con numerosas mitocondrias alargadas en la región más próxima al cilio y una mioide con retículo endoplásmico y aparato de Golgi. En la parte más proximal del segmento interno se localizan el núcleo y un terminal sináptico donde hay vesículas que contienen el neurotransmisor glutamato. Los cuerpos celulares de conos y bastones se encuentran en la capa nuclear externa y los axones llegan a la plexiforme externa donde hacen sinapsis con las células horizontales y bipolares. El segmento interno tiene funciones metabólicas, genera la mayor parte de la energía celular necesaria para la fototransducción y es el lugar de la síntesis de proteínas necesarias en el segmento externo.

El segmento externo del fotorreceptor representa la porción sensorial de la célula, por lo que es el lugar donde comienza la cascada de la fototransducción. En el caso de los bastones, el segmento externo está formado por unos 1000 discos membranosos aislados de la membrana plasmática donde se encuentran los pigmentos sensibles a la luz. En el caso de los conos, no existen discos membranosos aislados sino múltiples repliegues de la membrana plasmática. Los discos se renuevan constantemente. Los segmentos externos de los fotorreceptores están en íntimo contacto con el EPR, cuyas células degradan los discos viejos fagocitándolos y aportan nutrientes a los fotorreceptores.



**Figura 1.3.** Estructura de los fotorreceptores: bastón y cono. Adaptada de Wright *et al.*, 2010 [181].

### 1.2.2. Fototransducción

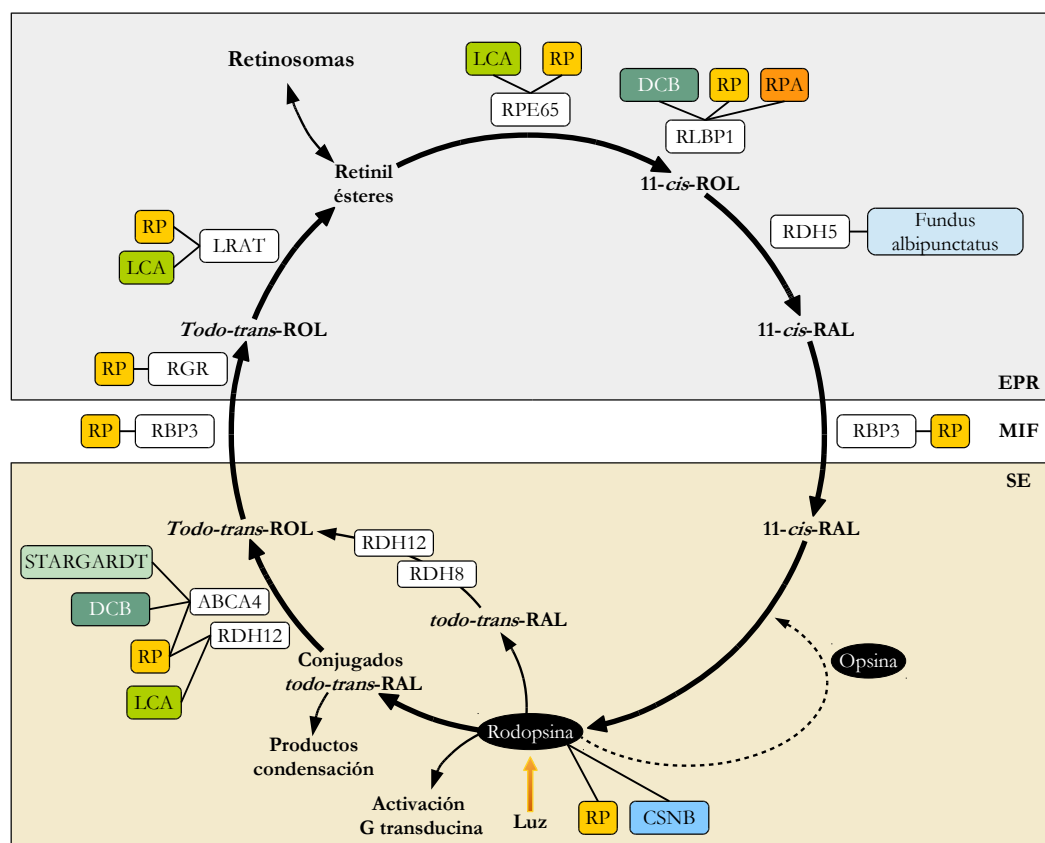
Tanto en los conos como en los bastones, el mecanismo de la fototransducción es similar y consiste básicamente en la existencia de unas moléculas llamadas fopigmentos, sensibles a los fotones del espectro visible de luz, es decir, sufren un cambio al incidir en ellas un fotón, y tras una serie de reacciones en cadena que se explicarán a continuación, este cambio da lugar a un cambio en el potencial eléctrico de la membrana del fotorreceptor.

Los fopigmentos se localizan en la membrana de los discos y están formados por una proteína opsina y el cromóforo 11-*cis*-retinal, un derivado de la vitamina A. En los bastones, el fopigmento se denomina rodopsina y la opsina es una escotopsina, que hace que los bastones tengan su máximo de

absorción en la longitud de onda de 507 nm. Por el contrario, en los conos, el fotopigmento se denomina conopsina y la opsina se denomina fotopsina, habiendo tres tipos de fotopsina (rojo, verde, azul) según la longitud de onda en la que tienen su máximo de absorción (558, 531 y 420 nm, respectivamente). En los conos, no coexisten los tres tipos de fotopigmento, sino que cada cono contiene sólo un único tipo, y de ahí, como se ha mencionado anteriormente, que existan tres tipos de conos, cada uno de ellos sensible a una longitud de onda.

La clave de la fototransducción está en el componente 11-*cis*-retinal, presente en todos los tipos de fotopigmento, y más concretamente, en su fotoisomerización. Cuando un fotón activa un fotopigmento, el 11-*cis*-retinal pasa a ser todo-*trans*-retinal, que es incompatible con la opsina y se separa de ella en un proceso progresivo. El todo-*trans*-retinal isomeriza a todo-*trans*-retinol, y éste a 11-*cis*-retinol, que finalmente pasa a ser 11-*cis*-retinal. El 11-*cis*-retinal se une de nuevo a la opsina, y completa así el ciclo que permite la regeneración del fotopigmento.

Este ciclo de descomposición y regeneración del fotopigmento, así como la activación que se produce en la cascada de la fototransducción, es lo que se conoce como “**ciclo visual**”. En la **Figura 1.4** se muestra el proceso en el caso de la rodopsina. Es de resaltar que una parte del proceso ocurre dentro del bastón, y otra parte dentro de las células del EPR.



**Figura 1.4.** Ciclo visual en los bastones. En los cuadros blancos se indican las proteínas que intervienen en el proceso. En los cuadros de colores se indican las enfermedades que derivan de mutaciones que afectan las proteínas indicadas. EPR: Epitelio pigmentario de la retina. MIF: Matriz interfotorreceptor. SE: Segmento externo de los bastones. *Todo-trans*-RAL: *todo-trans*-retinal. *Todo-trans*-ROL: *todo-trans*-retinol. 11-*cis*-ROL: 11-*cis* retinol. 11-*cis*-RAL: 11-*cis* retinal. CSNB: Ceguera nocturna congénita estacionaria. DCB: Distrofia de conos y bastones. LCA: Amaurosis congénita de Leber. RP: Retinosis pigmentaria. RPA: Retinosis *punctata albescens*. Adaptado de Kiser *et al.*, 2012 [85].

1.2.2.1. Cascada de la fototransducción

De los intermediarios del proceso de descomposición de la rodopsina, la metarrodopsina II, también llamada rodopsina activada ( $R^*$ ), es la que tiene la capacidad de desencadenar la llamada “cascada enzimática” o “cascada de la fototransducción” (Figura 1.5).

La metarrodopsina II activa la transducina, que es una proteína G, formada por tres subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  tiene asociada una molécula de GDP (guanosina difosfato), y la activación provoca el intercambio de GDP por una molécula de GTP (guanosina trifosfato), lo que a su vez causa la liberación de la subunidad  $\alpha$  ( $T\alpha$ -GTP).

La  $T\alpha$ -GTP interactúa con la siguiente proteína de la cascada, la enzima fosfodiesterasa (PDE o FDE). La PDE está formada por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , unidas cada una a una subunidad inhibidora  $\gamma$ . La  $T\alpha$ -GTP escinde las subunidades  $\gamma$ , activando la actividad enzimática de la PDE, que hidroliza el guanosín monofosfato cíclico (cGMP) a guanosín 5'-monofosfato (5'-GMP). El cGMP tiene la particularidad de que permite el paso de cationes  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  a través de la membrana citoplasmática.

En condiciones de oscuridad, el potencial de la membrana citoplasmática es de -40 mV. La transformación de cGMP a 5'-GMP provoca el cierre de los canales catiónicos, lo que hace que el potencial de la membrana pase a -70 mV [158]. Esta negativización del fotorreceptor es lo que se llama “hiperpolarización” y lleva a una disminución de la cantidad de glutamato, neurotransmisor que es liberado por el fotorreceptor en condiciones de oscuridad.

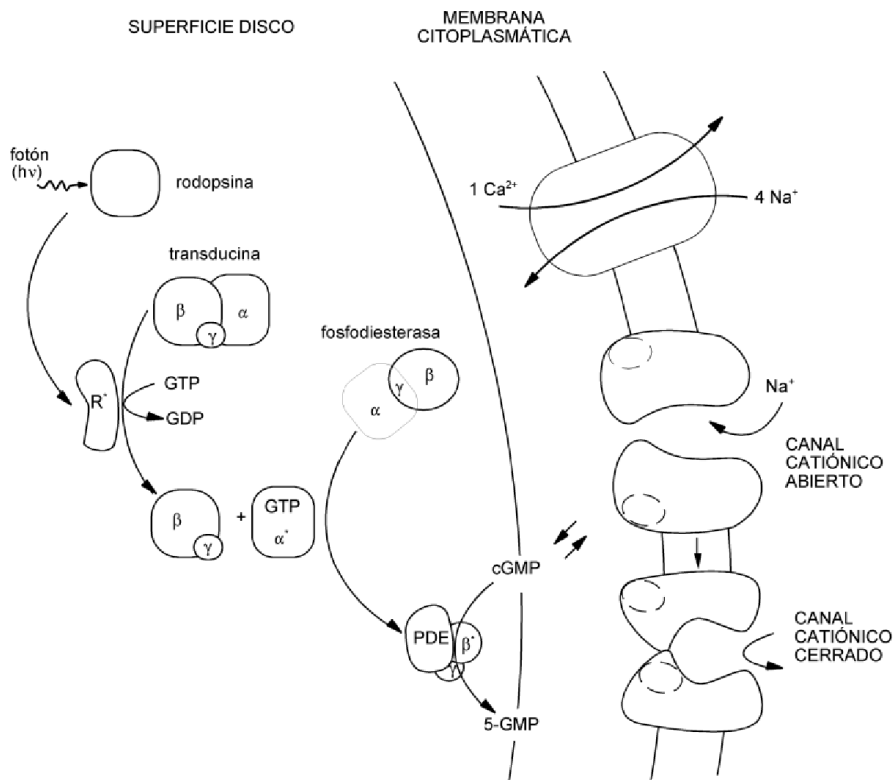


Figura 1.5. Cascada de la fototransducción. Fuente: Urtubia, 1999 [158].

### 1.3. DISTROFIAS HEREDITARIAS DE LA RETINA

Las distrofias hereditarias de la retina (DR) son un conjunto de trastornos que se producen por una degeneración primaria y progresiva de los fotorreceptores. Las DR se deben a mutaciones en distintos genes que se expresan en los fotorreceptores o en las células del EPR. Tanto desde el punto de vista clínico como genético las DR son enfermedades muy heterogéneas. Hasta el momento se han descrito 279 *loci* y se han identificado 240 genes responsables de estas enfermedades (<https://sph.uth.edu/retnet/>, octubre de 2015). Las DR forman parte del grupo de enfermedades raras pues afectan a 1 de cada 2000 personas. Entre las DR, la retinosis pigmentaria (RP; MIM #268000) es la forma más común con una prevalencia de un caso por 4000 individuos, suponiendo el 85-90% de todos los casos de DR [15]. La RP se caracteriza por una pérdida progresiva de la visión comenzando con una afectación primaria de los bastones. Los primeros síntomas que presentan los pacientes son la ceguera nocturna (CN) o hemeralopía, seguida por una pérdida progresiva del campo visual periférico que pueden conducir a la ceguera legal después de varias décadas. La clasificación de las DR se basa en los siguientes criterios: el patrón de herencia, la zona inicialmente afectada de la retina (bastones, conos, EPR o retina interna), la edad de aparición de la enfermedad y/o su posterior progresión, su asociación con síntomas extrarretinianos, y el gen responsable [150].

Las DR se pueden presentar asociados con todos los tipos de herencia: mendelianos (autosómico dominante (AD), autosómico recesivo (AR), ligado al cromosoma X (XL)) y mitocondrial. Se han descrito también algunos casos de digenismo producidos por mutaciones en dos genes diferentes y también casos de trialelismo. Un porcentaje importante son casos esporádicos en los que no se puede establecer un patrón de herencia claro.

En función de la zona retiniana afectada de forma primaria, las DR se dividen clínicamente en:

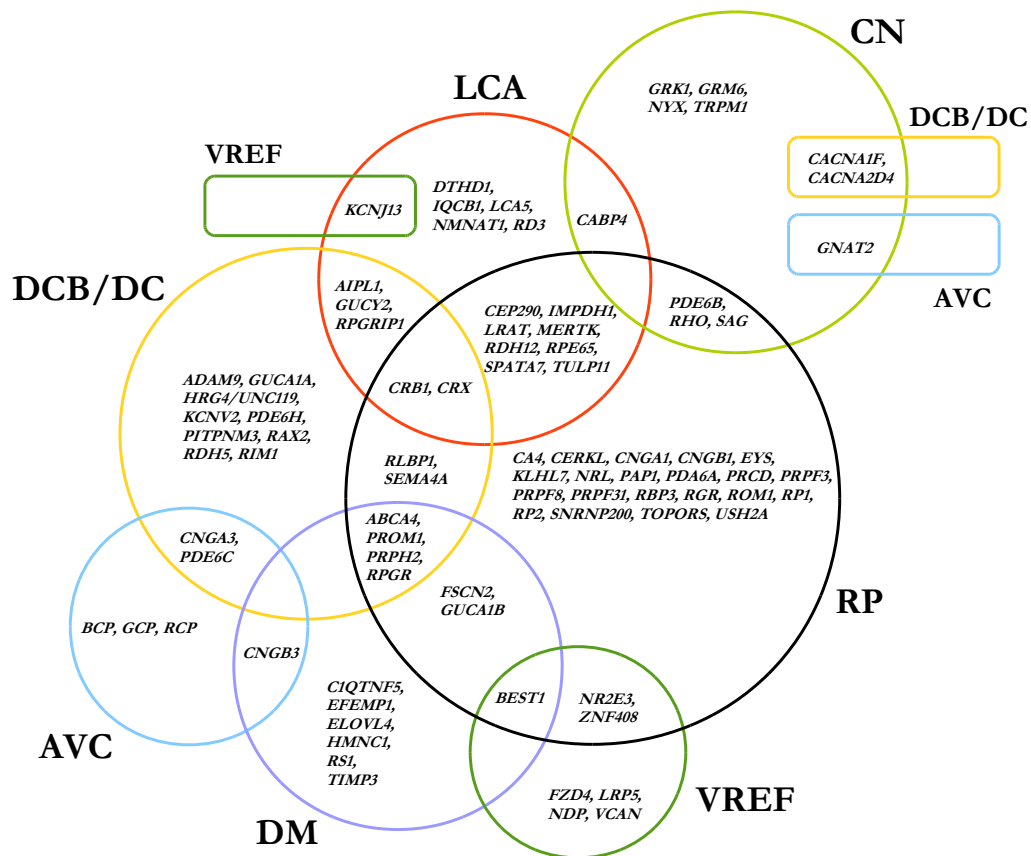
- Formas periféricas: están afectados inicial y predominantemente los bastones siendo un ejemplo típico la RP.
- Formas centrales: inicialmente, los conos resultan afectados, como ocurre en las distrofias maculares, y las distrofias de conos. En algunos casos existe la posibilidad de que los bastones también resulten afectados, como en la distrofia de conos y bastones (DCB).

Es reseñable que diferentes DR pueden tener manifestaciones clínicas muy similares, tanto en sus inicios como en fases posteriores, por lo que en la práctica resulta difícil diferenciarlas, a pesar de que en la literatura se describan como tipos de DR distintos [110]. Otra característica de las DR es su solapamiento genético, de modo que algunos genes pueden causar distintas formas clínicas (**Figura 1.6**).

La mayoría de las DR se presentan como formas no sindrómicas (70-80% de los casos), es decir, existe sólo una afectación ocular, pero también existen formas sindrómicas (20-30% de los casos) en donde la retinopatía se asocia a otras manifestaciones sistémicas. Se han descrito más de 30 formas sindrómicas de DR, siendo la más común el síndrome de Usher, caracterizado por RP y sordera neurosensorial (constituye el 15-20% de todos los casos de RP), seguida del síndrome de Bardet-Biedl (BBS; MIM #209900), caracterizado por DR con discapacidad intelectual variable, polidactilia, obesidad y anomalías renales, entre otros (constituye el 20-25% de los casos sindrómicos).



El presente trabajo se enfoca al estudio de una DR de tipo congénito (LCA), así como de RP de inicio precoz (RP-IP), caracterizada por el inicio de los síntomas durante la primera década de vida. Ambas enfermedades se han estudiado tanto en sus formas autosómica recesiva y esporádicas.



**Figura 1.6.** Solapamiento genético entre las distintas DR no sindrómicas. AVC: Alteración en la visión de los colores, CN: Ceguera nocturna, DCB/DC: Distrofia de conos y bastones/Distrofia de conos, DM: Distrofia macular, LCA: Amaurosis congénita de Leber, RP: Retinosis pigmentaria, VREF: Vitreorretinopatía exudativa familiar. Modificada de Berger *et al.*, 2010 [20].

#### 1.4. AMAUROSIS CONGÉNITA DE LEBER (LCA)

La amaurosis congénita de Leber (LCA; MIM #204000), descrita por primera vez en 1869 por el oftalmólogo alemán Theodor Karl Gustav Leber como una forma congénita de RP, es la forma más precoz y severa de todas las distrofias hereditarias de la retina, ocasionando discapacidad visual grave o ceguera antes del primer año de vida. Se caracteriza por la degeneración primaria de los fotorreceptores y presenta una prevalencia que varía según la población de estudio entre 1:30000-81000 [86, 148], por lo que es considerada una enfermedad rara. Además, representa el 5% de los casos de DR y alrededor del 20% de los casos con ceguera congénita [86].

Las manifestaciones clínicas de la LCA no sindrómica incluyen pérdida de visión desde el nacimiento o desde los primeros meses de vida, nistagmo, pupilas amauroticas, disminución casi por completo del electroretinograma (ERG), signo óculo-digital (signo de Franceschetti) y un fondo de ojo (FO) con aspecto muy variable, que puede ir desde una apariencia normal hasta una retinopatía pigmentaria muy evidente, similar a una retinitis pigmentosa [92, 55, 91].



Algunos autores clasifican la LCA en dos subtipos diferenciados según la respuesta a la luz de los pacientes en sus dos primeros años de vida [116, 67, 68]:

- Tipo I: Formas congénitas y estacionarias de DCB, caracterizadas fundamentalmente por presencia de fotofobia.
- Tipo II: Formas progresivas de distrofias de bastones-conos (DBC), caracterizadas principalmente por el desarrollo de CN.

También se han descrito formas sindrómicas que son aquellas que junto con la LCA presentan otras manifestaciones sistémicas: Síndrome de Alström (ALMS; MIM #203800), Síndrome de Joubert (JS; MIM #213300), Síndrome de Senior-Loken (SLS; MIM #266900) y Síndrome de Meckel-Grüber (MKS; MIM #249000), entre otros.

Esta patología no sólo se caracteriza por presentar una elevada heterogeneidad clínica, sino también genética. Aunque la herencia autosómica recesiva es la forma más común, se han descrito casos con herencia autosómica dominante [138, 118].

Hasta el momento se han descrito mutaciones en 21 genes distintos, lo que explica un 70% [79] de los casos con LCA (<https://sph.uth.edu/retnet/>, octubre de 2015). Las mutaciones de algunos de estos genes pueden causar otros tipos de DR, principalmente formas precoces de RP (**Tabla 1.2**). Se cree que existen otros genes todavía no identificados que podrían causar la enfermedad, lo que representaría el 30% restante de los casos LCA. La mayoría de los genes asociados a LCA se expresan abundantemente en las células fotorreceptoras o en el EPR, codificando mayoritariamente para proteínas involucradas en el transporte de moléculas a través del cilio conector, fototransducción y el desarrollo de los fotorreceptores [79], tal como se resume en la **Tabla 1.2**.

Debido a la gran heterogeneidad genética y clínica de la enfermedad, el diagnóstico molecular de los pacientes resulta muy complicado. Sin embargo, el análisis molecular de los pacientes es crucial para el asesoramiento genético de las familias, proporcionando al paciente un pronóstico de la enfermedad, por lo que resulta la identificación de las mutaciones causantes.

### 1.5. RETINOSIS PIGMENTARIA DE INICIO PRECOZ (RP-IP)

La RP-IP se caracteriza por una pérdida del CV antes de los 10 años de vida, seguida de una reducción de la AV en estados avanzados de la enfermedad [161, 10]. Las mutaciones en algunos genes LCA, entre ellos *CEP290*, *CRB1*, *LRAT*, *MERTK*, *RDH12*, *RPE65*, *SPATA7* y *TULP1*, también pueden causar RP-IP [12].

Tabla 1.2. Genes involucrados en LCA.

Gen (tamaño)	Nº exones	Localización ( <i>locus</i> )	Proteína (tamaño)	Herencia	Función	Otras DR (herencia)	Nº mutaciones descritas*	Referencia
<b><i>AIPL1</i></b> (2959 pb)	6	17p13.2 (LCA4)	<i>Arylhydrocarbon-interacting receptor protein-like 1</i> (384 aa)	AR	Chaperona	DCB (AD)	68	[139]
<b><i>ALMS1</i></b> (12925 pb)	23	2p13.1 (ALMS)	<i>Alstrom syndrome protein 1</i> (4168 aa)	AR	Ciliar Control del ciclo celular Transporte intracelular	ALMS (AR)	268	[172, 173]
<b><i>CABP4</i></b> (2559 pb)	6	11q13.1	<i>Calcium binding protein 4</i> (275 aa)	AR	Sináptica	CNCE (AR) DCB (AR)	7	[6]
<b><i>CEP290</i></b> (7948 pb)	54	12q21.32 (LCA10)	<i>Centrosomal protein 290kDA</i> (2479 aa)	AR	Ciliar	BBS (AR) JS (AR) MKS (AR) SLS (AR)	216	[77]
<b><i>CRB1</i></b> (4932 pb)	12	1q31.3 (LCA8)	<i>Crumbs homolog 1</i> (1406 aa)	AR	Estructural: matriz extracelular	RP (AR) RP con PPRPE (AR) RP con vasculopatía exudativa tipo Coats (AR) DCB (AR) DM (AR)	252	[97]
<b><i>CRX</i></b> (4470 pb)	4	19q13.32 (LCA7)	<i>Cone-rod otx-like photoreceptor homeobox transcription factor</i> (299 aa)	AD	Factor de transcripción Desarrollo de la retina	DCB (AD) RP (AD)	74	[56]
<b><i>DTHD1</i></b> (3365 pb)	9	4p14	<i>Death domain containing 1</i> (781 aa)	AR	Desconocida	-	1	[2]
<b><i>GUCY2D</i></b> (3698 pb)	20	17p13.1 (LCA1)	<i>Retinal-specific guanylate cyclase</i> (1103 aa)	AR	Ciclo visual	DCB (AD) RP (AR)	186	[96]
<b><i>IMPDH1</i></b> (2881 pb)	17	7q32.1 (LCA11)	<i>Inosine monophosphate dehydrogenase 1</i> (599 aa)	AD	Biosíntesis de guanina	RP (AD)	19	[26]

(AD): herencia autosómica dominante. (AR): herencia autosómica recesiva. ALMS: Síndrome de Alström. CNCE: Ceguera nocturna congénita estacionaria. JS: Síndrome de Joubert. MKS: Síndrome de Meckel-Grüber. PPRPE: Preservación del epitelio pigmentario para-arteriolar SLS: Síndrome de Senior-Loken. \*: Según la base de datos de mutaciones HGMD.

Tabla 1.2. Continuación.

Gen (tamaño)	N° exones	Localización ( <i>locus</i> )	Proteína (tamaño)	Herencia	Función	Otras DR (herencia)	N° mutaciones descritas*	Referencia
<b><i>IQCB1</i></b> (2594 pb)	15	3q13.33	<i>IQ motif containing B1 protein</i> (598 aa)	AR	Transporte ciliar	SLS (AR)	31	[171]
<b><i>KCNJ13</i></b> (2950 pb)	3	2q37.1 (LCA16)	<i>Inwardly-rectifying potassium channel subfamily J member 13</i> (360 aa)	AR	Canal potasio	VREF (AD)	8	[132]
<b><i>LCA5</i></b> (4719 pb)	9	6q14.1 (LCA5)	<i>Lebercilin</i> (697 aa)	AR	Tráfico ciliar	-	41	[78]
<b><i>LRAT</i></b> (4928 pb)	3	4q32.1 (LCA14)	<i>Lecithin retinol acyltransferase</i> (230 aa)	AR	Ciclo visual	RP (AR)	17	[131]
<b><i>MERTK</i></b> (3954 pb)	19	2q14.1	<i>c-mer protooncogene receptor tyrosine kinase</i> (999 aa)	AR	Fagocitosis SE	RP (AR) DBC-IP (AR)	49	[58]
<b><i>NMNAT1</i></b> (3781 pb)	5	1p36.22 (LCA9)	<i>Nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 1</i> (279 aa)	AR	Neuroprotectora	-	53	[88, 33, 53, 122, 133, 134]
<b><i>RD3</i></b> (4266 pb)	3	1q32.3 (LCA12)	<i>RD3 protein</i> (195 aa)	AR	Desconocida	-	11	[16]
<b><i>RDH12</i></b> (1879 pb)	7	14q24.1 (LCA13)	<i>Retinol dehydrogenase 12</i> (316 aa)	AR	Ciclo visual	RP (AD) DR-IP	87	[83]
<b><i>RPE65</i></b> (2610 pb)	14	1p31.2 (LCA2)	<i>Retinal pigment epithelium-specific 65 kD protein</i> (533 aa)	AR	Ciclo visual	RP (AR)	154	[107]
<b><i>RPGRIP1</i></b> (3940 pb)	24	14q11.2 (LCA6)	<i>RP GTPase regulator-interacting protein 1</i> (1286 aa)	AR	Tráfico ciliar	DCB (AR)	101	[49]
<b><i>SPATA7</i></b> (2123 pb)	12	14q31.3 (LCA3)	<i>Spermatogenesis associated protein 7</i> (599)	AR	Desconocida	RP (AR)	27	[170]
<b><i>TULP1</i></b> (2162 pb)	15	6p21.31 (LCA15)	<i>Tubby-like protein 1</i> (542 aa)	AR	Funcionamiento fotorreceptores Fagocitosis	RP (AR)	55	[112]

(AD): herencia autosómica dominante. (AR): herencia autosómica recesiva. DCB-IP: DCB de inicio precoz. DR-IP: DR de inicio precoz. SLS: Síndrome de Senior-Loken. VREF: Vitreoretinopatía exudativa familiar. \*: Según la base de datos de mutaciones HGMD.

### 1.6. GENES ANALIZADOS EN ESTE TRABAJO

#### 1.6.1. Gen *AIPL1*

El *locus* LCA4 fue localizado mediante análisis de ligamiento en una gran familia consanguínea, de origen pakistaní y con cuatro afectados vivos, lo que llevó a la identificación del gen *AIPL1* [139, 63].

El gen *AIPL1* (*aryl hydrocarbon receptor interacting protein-like 1*) tiene una similitud de aproximadamente el 50% con la proteína aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) [139]. Pertenece a la familia de proteínas FK506-binding protein (FKBP). Este gen se expresa en las células fotorreceptoras y en la glándula pineal. En el período de desarrollo de la retina, *AIPL1* se expresa en la parte central y en la periferia de la retina, coincidiendo con el desarrollo de ambos tipos de fotorreceptores, tanto conos como bastones [143]. Sin embargo, en la retina humana adulta, *AIPL1* se expresa exclusivamente en los bastones [142].

Tanto en la AIP como en la *AIPL1* se conserva un dominio de repeticiones tetratricopeptídicas (TPR) comprendiendo tres motivos tetratricopéptidos (TRP), formados por una secuencia degenerada de 34 residuos, con un par de hélices  $\alpha$  anti-paralelas (**Figura 1.7**). Los dominios TPR funcionan como *scaffolds* moleculares que median en las interacciones proteína-proteína. Además, *AIPL1* presenta en su C-terminal una secuencia de 56 aa, rica en poli-prolina y específica de primates, con una función desconocida [79].

#### 1.6.2. Gen *CEP290*

El gen *CEP290* (*centrosomal protein 290kDa*) fue identificado como gen responsable de LCA10 en el año 2006 mediante un estudio de ligamiento con *microarrays* de SNPs y marcadores polimórficos en una gran familia consanguínea, de origen canadiense y con cuatro afectados de LCA [77]. Chang *et al.*, 2006, encontraron una delección *in frame* en *Cep290* en un modelo de ratón *rd16* cuya consecuencia es una degeneración retiniana de inicio precoz [31].

La proteína posee varios dominios altamente conservados a lo largo de la evolución (**Figura 1.7**): trece dominios *coiled-coil*, una región SMC (*structural maintenance of chromosomes*) con homología respecto a ATPasas de segregación cromosómica, una señal de localización nuclear NLS (*nuclear localization signal*) bipartita, seis motivos KID de proteínas RepA/Rep1, tres dominios *tropomyosin homology* y un motivo *ATP/GTP binding site motif A*.

*CEP290* es una proteína ubicua que se expresa en todos los cilios primarios y juega un papel importante en la ciliogénesis y el tráfico ciliar. Por ello, muchas de las mutaciones en este gen causan formas sindrómicas de LCA que afectan al SNC, los riñones y el hígado [35].

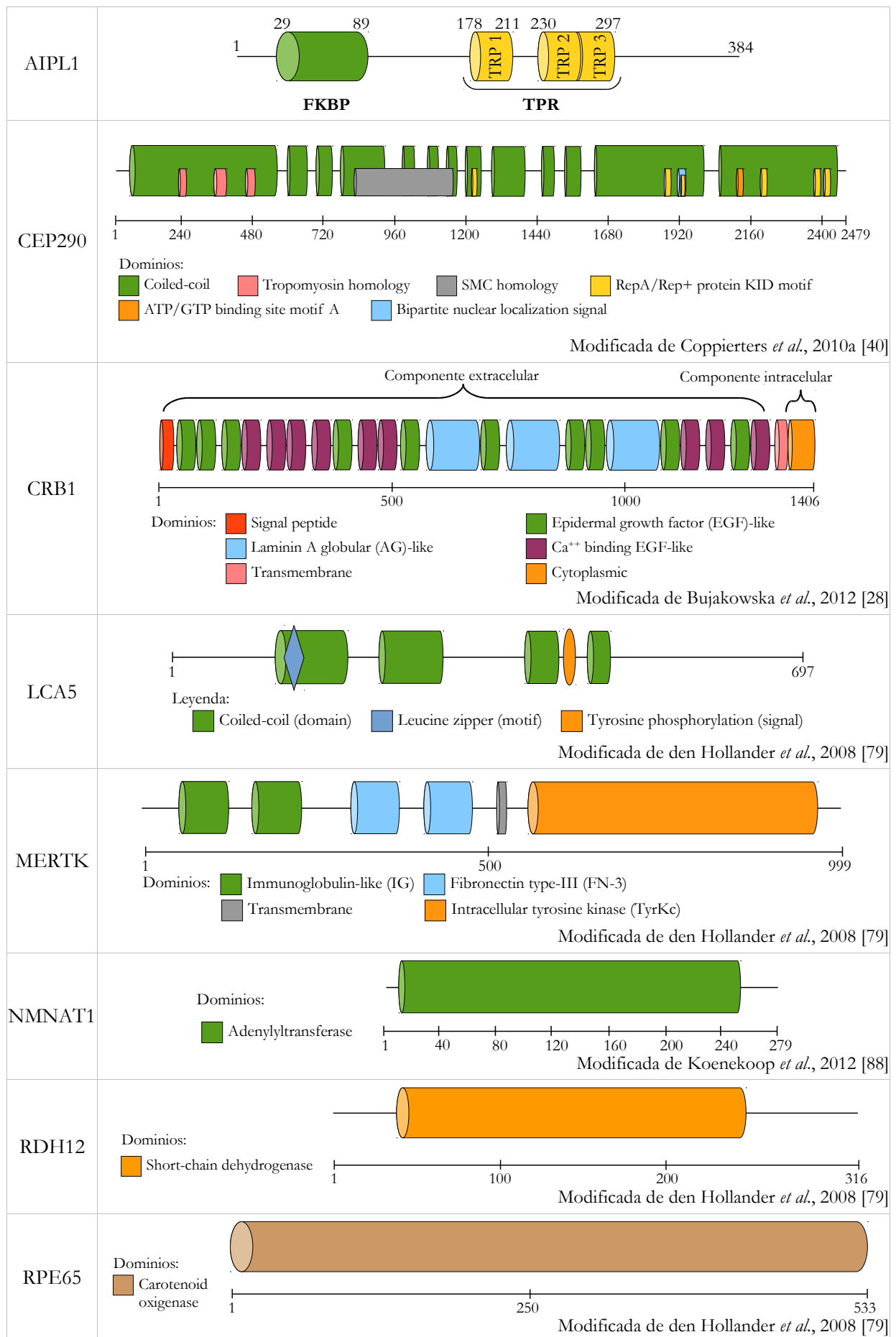


Figura 1.7. Estructura de las proteínas codificadas por los genes estudiados en este trabajo.

### 1.6.3. Gen *CRB1*

El gen *CRB1* (*Crumbs homolog 1*) se localiza en el *locus* RP12. Dicho *locus* fue inicialmente identificado mediante análisis de ligamiento en una familia holandesa y una familia paquistaní como asociado a una forma severa de RP autosómica recesiva [137, 93]. Den Hollander *et al.*, 1999, mediante la búsqueda de ADNc específica o mayoritariamente expresados en la retina y en el EPR, identificaron un ADNc que correspondía precisamente a la región RP12, lo que finalmente llevó a la identificación del gen *CRB1* y a la asociación de mutaciones en este gen con RP12 [72]. Posteriormente, Lotery *et al.*, 2001a, mostraron que mutaciones en el *CRB1* adicionalmente causan LCA [97].

El gen *CRB1* es uno de los homólogos humanos del gen *crumbs* (*crb*) de *Drosophila melanogaster* [50]. Si bien se ha predicho la existencia de cuatro isoformas de la proteína (I-IV), sólo se ha observado la expresión de dos de ellas (I y II). La isoforma II, de 1406 aa, contiene un dominio péptido señal (*signal peptide*), 19 dominios tipo-factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor (EGF)-like*), 3 dominios tipo laminina A globular (*laminin A globular (AG)-like*), un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático (**Figura 1.7**). La isoforma I, de 1376 aa, es extracelular, y contiene los mismos dominios que la isoforma II, excepto el transmembrana y el citoplasmático [74]. Tanto la isoforma I como la isoforma II están altamente conservadas respecto a la proteína *Drosophila*, con el 55% y el 72% de similitud, respectivamente [72, 74]. El gen *Crb1* del ratón es idéntico en un 76% al *CRB1* humano, y codifica una proteína que tiene los mismos dominios que la isoforma II humana [75]. Es de resaltar que el dominio citoplasmático también está presente en *Crb1* del ratón, y de hecho, este dominio se conserva completamente en las tres especies: *Drosophila*, ratón y humanos [75].

A pesar de las similitudes y de que la *CRB1* humana y la *Crb* de *Drosophila* sean consideradas homólogas, sus patrones de expresión son completamente diferentes [75]. Mientras que en humanos *CRB1* se expresa en el cerebro, y en el segmento interno de los fotorreceptores, en *Drosophila* *Crb* se expresa en todos los epitelios que derivan del ectodermo, incluyendo epidermis, los tramos anterior y posterior del tubo digestivo, sistema traqueal, glándulas salivares y el lóbulo óptico. En ratones, *Crb1* se expresa en el SNC embrionario, y en el cerebro adulto, mientras que en la retina está presente en las membranas de las células epiteliales, en las células de Müller, y en los segmentos internos de los fotorreceptores, donde se concentra en los alrededores de la membrana limitante externa. Una distribución similar a la observada en la retina humana [75].

En *Drosophila* y el ratón, *Crb1* está involucrado en la morfogénesis de los fotorreceptores [74]. En embriones de *Drosophila* con mutaciones que alteran la expresión de *crumbs*, se han observado alteraciones en la polaridad de las células epiteliales que lleva a defectos en la construcción de las zónulas adherentes (ZA), las cuales tienen un papel fundamental en la adhesión célula-célula y en la comunicación intercelular [74]. Esto a su vez se manifiesta en forma de graves alteraciones epiteliales y muerte celular en el primordio epidérmico, lo que lleva a la creación de un cutículo discontinuo o en forma de migas (en inglés, *crumbs*) [115].

El análisis del *Crb1* mutante que se da de forma natural en ratones, muestra defectos en el desarrollo de la retina, donde se ha observado una alteración de la membrana limitante externa y la formación de

pliegues retinales [81]. La desorganización de las capas retinales también se ha observado en otros modelos de *Crb1* de ratón.

Estas observaciones son coherentes con las características de los pacientes con mutaciones en este gen, cuyas retinas están engrosadas y muestran una organización laminar alterada, que recuerda a una retina normal inmadura [81]. Todo esto sustenta la importancia de *CRB1* en el desarrollo de la retina y la morfogénesis de los fotorreceptores en humanos [75, 115, 114, 28].

#### 1.6.4. Gen *LCA5*

El *locus* del gen *LCA5* fue mapeado en 6q14 por análisis de ligamiento y mapeo de homocigosidad en una gran familia consanguínea de origen suizo [48]. Posteriormente, el gen *LCA5* (*Leber congenital amaurosis 5*) fue identificado por den Hollander *et al.*, 2007, mediante mapeo de homocigosidad [78].

La proteína codificada por el gen *LCA5* tiene cuatro dominios *coiled-coil* [78] (véase **Figura 1.7**). Su expresión ha sido detectada en multitud de tejidos y estructuras celulares [104], entre ellos los microtúbulos, el centrosoma y el cilio primario [78]. A pesar de esta expresión ubicua, el fenotipo de LCA se limita a la retina, y no conlleva afectaciones sistémicas, tal como se ha observado tanto en pacientes afectados de LCA como en el modelo de ratón *LCA5<sup>gt/gt</sup>* [78, 178]. En las células fotorreceptoras, la Lebercilin se encuentra únicamente en los cilios conectores, interactuando físicamente con un complejo proteico involucrado en transporte intraflagelar (IFT) [60, 24].

Los trabajos realizados con ratones mostraron que en embriones de 12,5 días, la expresión era ubicua y baja. A los 14,5 días, la expresión era más acentuada en el ojo, el oído interno, los riñones, regiones del SNC y periférico y el intestino, así como en los epitelios ciliares nasofaríngeos, traqueales y pulmonares. En el ojo adulto, la expresión se limitaba a la capa de células fotorreceptoras. En líneas de células ciliares, la Lebercilin se localiza en el axonema ciliar. En la retina de ratones y ratas, se localiza entre los segmentos interno y externo de los fotorreceptores [104].

#### 1.6.5. Gen *MERTK*

El gen *MERTK* (*MER proto-oncogene, tyrosine kinase*) fue localizado en 2q14.1 [176]. Este gen codifica una proteína que forma parte de la familia Axl/Mer/Tyro3. La proteína contiene cinco dominios (véase **Figura 1.7**) y se expresa en diversos tejidos como testículos, ovarios, próstata, pulmones y riñones, así como en el EPR.

Una mutación del gen *MERTK* fue identificada en el modelo de rata RCS (*Royal College of Surgeons*), un modelo clásico de degeneración retiniana hereditaria autosómica recesiva, en el cual se observa una disfunción en la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores mediada por el EPR, lo que en consecuencia, conduce a la muerte de los fotorreceptores [47].

### 1.6.6. Gen *NMNAT1*

El *locus* LCA9 fue localizado en el cromosoma 1p36 mediante análisis de ligamiento de genoma completo en una gran familia consanguínea de origen paquistaní, con 11 miembros de dos generaciones [84]. Tras la secuenciación de los genes candidatos de esta región, no se encontró ninguna mutación. Años después, gracias a la secuenciación del exoma completo utilizando técnicas de NGS (*next generation sequencing*), cuatro grupos de investigación distintos identificaron mutaciones asociadas a LCA9 en el gen *nicotinamide nucleotide adenyltransferase 1* (*NMNAT1*), en un total de 53 familias [88, 33, 53, 122]. Entre ellas se encontraba la familia paquistaní cuyo análisis permitió identificar originalmente el *locus* LCA9 [88].

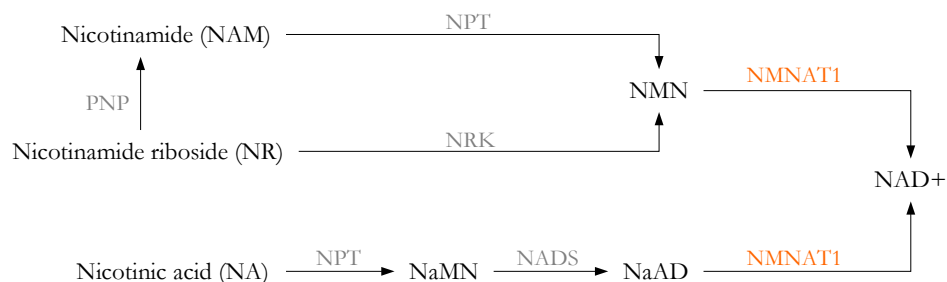
El gen codifica una de las tres isoformas de la proteína, la nicotinamide mononucleotide adenyltransferase 1 (*NMNAT1*), de expresión ubicua y localizada en el núcleo celular. Las otras dos isoformas, *NMNAT2* y *NMNAT3*, se localizan respectivamente en el complejo de Golgi y en la mitocondria, y son codificadas por otros genes.

*NMNAT1* contiene solamente un dominio denominado “*Adenyltransferase domain*” (véase **Figura 1.7**) y es una enzima que tiene una función catalizadora en el proceso de generación de NAD<sup>+</sup> tanto a partir de ácido nicotínico (NA), como a partir de nicotinamida mononucleótido (NMN). En el núcleo celular, NAD<sup>+</sup> interviene en la señalización celular y en el metabolismo del ADN (**Figura 1.8**).

En ratones y en *Drosophila melanogaster* se ha asociado *Nmnat1* a una función neuroprotectora, y se ha observado en ambas especies que mutaciones nulas en homocigosis son letales, lo que apoya la idea de que *Nmnat1* tiene una función esencial en ciertas especies. La inactivación de la enzima *Nmnat* en la retina de *Drosophila* en estado de adulto causa degeneración de inicio precoz severa en los fotorreceptores, lo que puede encuadrarse como una DR [122].

En los humanos, la *NMNAT1* parece ser una proteína esencial para la función neuronal de los fotorreceptores y su supervivencia. Los ensayos funcionales realizados por Koenekoop *et al.*, 2012, mostraron que las mutaciones *missense* reducen la actividad enzimática de la proteína *NMNAT1* en la biosíntesis de NAD, proceso en el cual esta enzima es fundamental, y afectan al plegamiento de la proteína [88].

Sin embargo, hay que mencionar que poco se sabe de la función endógena de *Nmnat1* en las células neuronales de los vertebrados en general. [88, 33].



**Figura 1.8.** Vías de síntesis de NAD<sup>+</sup> y participación de la proteína *NMNAT1*. Adaptada de Falk *et al.*, 2012, y Stein *et al.*, 2012 [53, 144].



### 1.6.7. Gen *RDH12*

Estudios iniciales realizados en una familia saudí por Stockton *et al.*, 1998, revelaron la existencia de un *locus* asociado a LCA en 14q24, que inicialmente se denominó LCA3 [147]. Trabajos posteriores identificaron la existencia del gen *RDH12* (*retinol dehydrogenase 12 (all-trans/9-cis/11-cis)*) asociado a la enzima del mismo nombre en 14q24.1, *locus* que finalmente ha recibido la denominación LCA13 [62].

El gen *RDH12* (*retinol dehydrogenase 12 (all-trans/9-cis/11-cis)*) se expresa en los segmentos internos de los fotorreceptores del ratón y el humano, así como en la capa externa del núcleo celular de los fotorreceptores [62]. Este gen codifica para una proteína (**Figura 1.7**) que tiene función enzimática y forma parte de una subfamilia de cuatro retinol-deshidrogenasas (RDH11-14) que intervienen en la transformación de retinoides. Déficits en la retina de retinoides y precursores de retinoides causan ceguera, defectos en el desarrollo e inmunodeficiencia.

En fotorreceptores *RDH12* interviene en el proceso transformación de todo-*trans*-retinal en 11-*cis*-retinal dentro del ciclo visual (**Figura 1.4**), siendo considerada una enzima clave y no reemplazable [62, 83]. La delección de *Rdh12* en ratones no conlleva degeneración retiniana como se ha observado en humanos, pero ralentiza la cinética de la reducción de todo-*trans*-retinal, retrasando la adaptación a la oscuridad [79].

### 1.6.8. Gen *RPE65*

El gen *RPE65* (*retinal pigment epithelium-specific protein 65kDa*) fue localizado por Hamel *et al.*, 1994, en 1p31, mientras que la proteína que codifica (**Figura 1.7**) fue identificada poco antes por el mismo equipo de investigación [64, 66].

*RPE65* es una proteína altamente expresada en el EPR, y muy conservada en vertebrados [65], y tiene un papel fundamental dentro del ciclo visual (**Figura 1.4**), ya que es la enzima isomerasa necesaria para la producción del 11-*cis*-retinol [37]. La actividad enzimática de la *RPE65* requiere la coexpresión de LRAT [79], otro gen asociado a LCA.

Las mutaciones en el gen *RPE65* causan ceguera y han sido asociadas a RP (RP20) y a LCA [37, 107], y de ahí que la denominación LCA2 se refiera tanto al *locus* donde se encontró el gen *RPE65* como al tipo de LCA producido debido a estas mutaciones.

La LCA asociada a las mutaciones de *RPE65* es una de las formas moleculares de retinopatía humana hereditaria más estudiadas, pero aún así, todavía quedan muchas lagunas en el conocimiento de la enfermedad tanto en humanos como en animales. Por ejemplo, actualmente no es posible realizar una predicción que relacione el tipo de mutaciones en *RPE65* y la severidad de la enfermedad resultante. Se desconoce por qué los pacientes afectados conservan algo de visión, como tampoco se sabe qué influencia tiene el buen funcionamiento del EPR en la degeneración de los fotorreceptores que soporta [37].

### 1.7. ESTRATEGIAS PARA EL ESTUDIO MOLECULAR DE LCA Y OTRAS DR

Como ya se ha expuesto, un correcto diagnóstico molecular resulta de gran importancia en las DR para pronosticar la enfermedad y también para diseñar posibles tratamientos, pero este hecho se ve complicado por la gran heterogeneidad genética de estas enfermedades, y en particular, de la LCA.

Esta heterogeneidad hace poco efectiva la aplicación de estrategias que consistan únicamente en un cribado directo, debido al gran tiempo y la gran cantidad de recursos necesarios para poder secuenciar el gran número de genes implicados. Por ello, las estrategias empleadas en la última década para el estudio de las DR han consistido en el uso de *microarrays* de genotipado como primera herramienta, que permiten detectar mutaciones ya conocidas, de forma rápida y a bajo coste. Existen diferentes *microarrays* para las distintas DR, incluyendo LCA [186], arRP [87], adRP [23], enfermedad de Stargardt [80] y BBS [116].

Tras ello, para los pacientes no caracterizados, se emplean métodos de estudio indirectos, que no permiten detectar nuevas mutaciones por sí mismos, pero sí sirven para señalar regiones donde podrían encontrarse las mutaciones responsables. Finalmente, se aplican métodos de estudio directos, que permiten detectar las mutaciones responsables, como la secuenciación Sanger o HRM. Los métodos de estudio directo también permiten confirmar los hallazgos de los *microarrays*.

La aparición de las técnicas de NGS están cambiando sustancialmente estas estrategias de estudio en patologías hereditarias, ya que tienen un rendimiento muchísimo mayor que la secuenciación Sanger, con unos costes por base muy inferiores. Sin embargo, el coste de los equipos NGS y el de los reactivos utilizados para su funcionamiento (es decir, para realizar la secuenciación de una muestra de ADN) sigue requiriendo una gran capacidad financiera. Además, dado que las técnicas de NGS generan una gran cantidad de información, requieren importantes recursos para el análisis de esa información.

### 1.8. TERAPIAS OCULARES

En la actualidad se han desarrollado distintos abordajes para sustituir la función retiniana perdida en los pacientes afectados por DR en general y particularmente por LCA. A continuación se resumen algunas de las aproximaciones terapéuticas que actualmente están en distintas fases de desarrollo.

#### 1.8.1. Terapia génica

La terapia génica consiste en corregir defectos en genes, reemplazar genes mutados o introducir nuevos genes, lo que normalmente se consigue mediante el empleo de vectores virales.

En 2001 se realizaron los primeros estudios de terapia dirigida a corregir defectos en el gen *RPE65* [2]. La elección de este gen se debió a que fue uno de los primeros genes asociados a LCA y también uno de los más mutados en las primeras cohortes estudiadas. Otros factores que se tuvieron en consideración fueron: 1) Mayor conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad causada por mutaciones en *RPE65*; 2) Menor degeneración de los fotorreceptores que presentan estos pacientes a pesar de gran afectación de su función visual; 3) La posibilidad de alcanzar físicamente el EPR para aplicar un tratamiento; 4) Existencia de modelos animales de LCA causada por *RPE65*.

En la **Tabla 1.3** se resumen los estudios de terapia génica realizados tanto en *RPE65* como en otros genes asociados a LCA.

**Tabla 1.3.** Estudios de terapia génica en genes asociados a LCA.

Gen	Estudio	Fase / Modelo	Vector	Vía	Observaciones
<i>RPE65</i>	[3, 4]	Preclínica / perro Briard	AAV	Inyección subretiniana	Importantes mejoras en las respuestas de ERG y pupilométrica. Mejoras visuales estables tres años después de la inyección.
<i>RPE65</i>	[19]	Preclínica / ratón knockout Rpe65	Lentivirus	Inyección subretiniana	Función de los conos restaurada durante al menos 4 meses.
<i>RPE65</i>	[105, 106]	Fase 1	AAV2	Inyección subretiniana	12 pacientes LCA. Mejora de la sensibilidad retiniana, nistagmus, pupilometría, CV y AV.
<i>RPE65</i>	[17, 18]	Fase 1	AAV2	Inyección subretiniana	12 pacientes LCA. Mejora de la sensibilidad retiniana y de la pupilometría. Duración máxima de la mejora 1 año. La degeneración de los fotorreceptores sigue progresando
<i>RPE65</i>	[36, 38]	Fase 1	AAV2	Inyección subretiniana	15 pacientes LCA. Mejora de la sensibilidad retiniana y de la pupilometría. Duración máxima de la mejora 3 años. La degeneración de los fotorreceptores sigue progresando.
<i>CEP290</i>	[39]	Preclínica / Estudio <i>in vitro</i> en células humanas	-	-	Mediante nucleótidos <i>antisense</i> (AON) se consiguió un ARNm maduro normal, sin el exón críptico causado por la variante intrónica c.2991+1655A>G
<i>CEP290</i>	[29]	Preclínica / Estudio <i>in vitro</i> en células humanas	Lentivirus	-	La ciliogénesis fue restaurada completamente.
<i>AIPL1</i>	[151, 152]	Preclínica / ratón <i>Aipl1<sup>h/h</sup></i> , <i>Aipl1<sup>hypo</sup></i> y <i>Aipl1<sup>-/-</sup></i>	AAV	Inyección subretiniana	Preservación y restauración de la función de bastones y conos. La degeneración de los fotorreceptores se ralentiza pero no se detiene. Mejoría todavía presente tras 1 año.
<i>AIPL1</i>	[89]	Preclínica / ratón <i>Aipl1<sup>-/-</sup></i>	AAV	Inyección subretiniana	Preservación y restauración de la función visual.

### 1.8.2. Células madre pluripotentes inducidas (iPSC)

Actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos y estudios basados en la regeneración de tejidos mediante iPSC para tratar enfermedades como RP, degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y la enfermedad de Stargardt, pero hasta el momento no hay publicaciones sobre estudios o ensayos similares específicamente enfocados al tratamiento de LCA. [59, 7].

La generación de tejidos a partir de iPSC para estudio *in vitro* sobre LCA fue usada por Burnight *et al.*, 2014, para el desarrollo de una terapia génica para *CEP290*, por Lustremant *et al.*, 2013, para identificar nuevos genes candidatos a ser causantes de la enfermedad, y por Tucker *et al.*, 2015, para confirmar la patogenicidad de una variante en *RPE65* [29, 101, 157]. Lukovic *et al.*, 2015, usaron las iPSC para la

generación de células del EPR a partir de células de un paciente con RP-IP, con el fin de estudiar en detalle los efectos de una variante en el gen *MERTK* [100].

### 1.8.3. Farmacológica

El *9-cis-retinal* se ha mostrado como un eficaz reemplazo para la ausencia de 11-cis-retinal en modelos de ratón con deficiencias en *Rpe65* y en *Lrat* y en un modelo canino con deficiencias en *Rpe65*, mejorando en todos los casos la función visual. En el caso de los ratones, se suministró por vía oral, lo que abre interesantes expectativas de tratamiento en humanos [123].

Los estudios de Fu *et al.*, 2014, y Ma *et al.*, 2014, han mostrado que es posible reducir la degeneración de los conos en modelos de ratón similares a la LCA humana mediante terapias farmacológicas [57, 102]. En el primer caso, se realizaron inyecciones subcutáneas de TUDCA (ácido tauroursodesoxicólico) en ratones con deficiencias en *Lrat*, mientras que en el segundo caso a ratones con deficiencias en *Rpe65* se suministró por vía oral en forma de disolución acuosa un tratamiento que reduce la producción de hormona tiroidea, y que combina metimazol (MMI) con perclorato de sodio monohidrato (PM).

### 1.8.4. Optogenética

Se han realizado ensayos en retinas de ratones afectados por RP que han mostrado que mediante la aplicación de esta técnica es posible devolver la sensibilidad a la luz. La aproximación mediante células ganglionares no resultó muy exitosa debido a que no reproducía bien el funcionamiento del circuito visual. Estudios sucesivos se han enfocado, con mayor éxito, hacia las células bipolares y hacia los cuerpos celulares de conos que habían perdido su segmento externo (y por lo tanto la sensibilidad a la luz) pero que seguían vivos.

Uno de los problemas de esta técnica es que para obtener una respuesta es necesaria una gran intensidad lumínica y una alta concentración de proteínas, debido a la ausencia de mecanismos de amplificación como los que existen en la cascada de la fototransducción que se da en los fotorreceptores originales. Otro de los problemas es reproducir adecuadamente el funcionamiento del circuito visual. A pesar de estos problemas, la aplicación de esta técnica para los tratamientos oculares sigue siendo prometedora [46].

## **2. OBJETIVOS**

Los objetivos del estudio han sido los siguientes:

1. Caracterizar desde el punto de vista genético a una cohorte de pacientes españoles con sospecha clínica de LCA.
2. Evaluar la aplicabilidad en la práctica clínica de un algoritmo de diagnóstico molecular para el estudio de estos pacientes.
3. Conocer el papel de genes ya identificados o candidatos en la etiopatogenia de la LCA en nuestra población mediante distintas aproximaciones metodológicas (*microarrays* de genotipado, mapeo de homocigosidad, y secuenciación directa).
4. Estudio de la prevalencia de mutaciones en el gen *CRB1* en una cohorte grande de pacientes con LCA y RP-IP, con el fin de validar estudios anteriores, así como determinar con mayor precisión posibles correlaciones genotipo-fenotipo.
5. Estudiar la carga mutacional del gen *NMNAT1*, gen recientemente identificado, en pacientes con LCA y RP-IP para conocer su prevalencia en la población española afectada.

### **3. PACIENTES Y MÉTODOS**

### 3.1. SUJETOS DE ESTUDIO

#### 3.1.1. Pacientes

Se seleccionaron individuos no emparentados entre sí, pertenecientes a la población española, con sospecha clínica de: a) amaurosis congénita de Leber (LCA) y b) retinosis pigmentaria de inicio precoz (RP-IP), que acudieron a las consultas de Oftalmología y Genética del Hospital Fundación Jiménez Díaz durante el periodo de 1990-2013. Estos pacientes incorporados en el estudio pertenecen a un total de 420 familias, incluyendo 130 familias LCA y 290 familias RP-IP, que cumplían los criterios de selección especificados más abajo. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de la FJD y en él se siguieron las recomendaciones de la Declaración de Helsinki y sus posteriores actualizaciones.

Los pacientes fueron seleccionados en base a los datos oftalmológicos obtenidos mediante pruebas específicas: medición de la agudeza visual (AV), campimetría, fundoscopia y pruebas de electrofisiología.

##### 3.1.1.1. Criterios de inclusión

La clasificación clínica de los pacientes se efectuó de acuerdo con los siguientes criterios:

###### **Criterios de diagnóstico clínico para LCA (De Laey, 1991 [91])**

- Pérdida severa de la visión desde el nacimiento o durante el primer año de vida.
- Reacción pupilar lenta.
- Nistagmo.
- Signo óculo-digital de Franceschetti.
- ERG muy alterado o abolido.
- FO variable (normal, sal y pimienta...).

###### **Criterios de diagnóstico clínico para RP-IP (Vallespín *et al*, 2007a; Ávila-Fernández *et al*, 2010 [161, 10])**

- Ceguera nocturna o hemeralopía.
- Inicio de la pérdida del CV en los primeros años de vida (< 10 años).
- Reducción de la AV en estados avanzados de la enfermedad.

En este trabajo, solamente se han estudiado familias con herencia autosómica recesiva y casos esporádicos. Todos los pacientes que participaron en el estudio, previamente informados, firmaron su consentimiento para ser incluidos en el mismo.



### 3.1.1.2. Criterios de exclusión

Aquellos pacientes con árbol genealógico compatible con herencia autosómica dominante o ligada al cromosoma X, no fueron incluidos en el estudio.

### 3.1.2. Individuos control

Se utilizaron muestras anónimas de ADN obtenidas a partir de sangre, procedentes de individuos españoles sanos, sin síntomas ni signos de enfermedades oculares del Banco de Sangre del Hospital Fundación Jiménez Díaz (FJD, Madrid). Todos los individuos que participaron en este estudio firmaron un consentimiento informado específico y sus muestras fueron anonimizadas desde su origen.

En el caso del estudio del gen *CRB1* se utilizaron 165 individuos control, mientras que en el caso del gen *NMNAT1* se utilizaron 192 controles.

## 3.2. MÉTODOS

Se describen a continuación los procesos moleculares que se usaron secuencialmente según el apartado 3.2.12.

### 3.2.1. Extracción de ADN

El ADN genómico (ADNg) fue extraído a partir de 350 µl de sangre periférica de cada sujeto de estudio, utilizando el kit *EZ1 DNA blood* de Qiagen o el kit *MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation* de Roche. Tras la lisis celular, el ADN se aísla del resto de componentes celulares mediante la tecnología de partículas magnéticas y tras varios lavados, finalmente se eluye en 200 µl de tampón de elución. Para ello, se utilizaron los equipos automáticos *BioRobot EZ1* (Qiagen) y *MagNA Pure Compact Instrument* (Roche), respectivamente, siguiendo los protocolos de los fabricantes.

En algunos casos, el ADNg fue extraído a partir de células de la mucosa bucal, mediante el método manual por “precipitación con etanol”, siguiendo las instrucciones del protocolo *Oragene DNA Purification* (DNA Genotek).

La concentración y pureza del ADN extraído se determinó por medio de un espectrofotómetro *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Una vez medida la concentración, el ADN se almacenó a -20 °C.

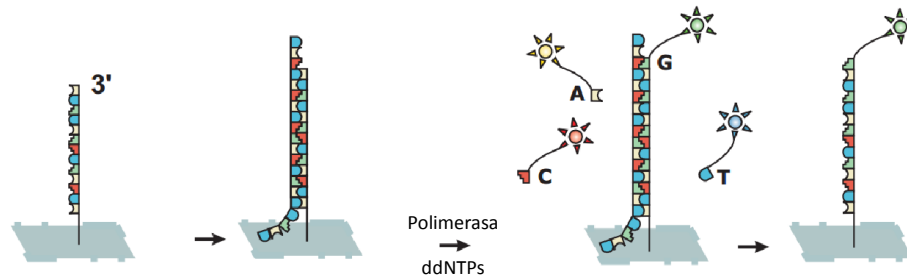
### 3.2.2. Microarrays de genotipado

Un *microarray* consiste en una serie de fragmentos sintéticos de ADN (denominados sondas) que están inmovilizados por un extremo, unidos a un substrato sólido o portaobjeto. Se han utilizado unos *microarrays* de genotipado que permiten la detección de mutaciones conocidas diseñados por la casa *Asper Biotech* (Tartu, Estonia), y que se basan en la técnica APEX (*Arrayed Primer EXtension*),

La técnica APEX consiste en el empleo de sondas complementarias a la zona adyacente a la variante en concreto, dejando sin aparear la base que se quiere detectar, con el fin de que hibride con las muestras de ADN de los pacientes, que se añaden después de ser amplificadas por PCR mediante miniselección. La extensión de la secuencia se consigue mediante el empleo de 4 dideoxirribonucleótidos trifosfato

(ddNTPs) marcados con distintos fluoróforos, de forma que se van realizando extensiones de un sólo nucleótido en el extremo 3' de la sonda (**Figura 3.1**).

Posteriormente, los portaobjetos se escanean con el detector fluorescence *Genorama™ QuattroImager*, y las imágenes así obtenidas se analizan mediante el programa *Genorama™ Genotyping Software*. La descripción completa de la metodología se encuentra disponible en la página web de Asper Biotech: [www.asperbio.com](http://www.asperbio.com).



**Figura 3.1.** Funcionamiento de la técnica APEX.

En este trabajo se utilizaron dos tipos de array para detectar mutaciones específicas de LCA y arRP:

### 3.2.2.1. *Microarray* de LCA

En un estudio anterior (Vallespín, 2008 [164]) se utilizó una versión inicial del *microarray* de genotipado específico que permitía la identificación de 417 variantes descritas en diez genes de LCA: *AIPL1*, *CEP290*, *CRB1*, *CRX*, *GUCY2D*, *LRAT*, *MERTK*, *RDH12*, *RPE65* y *RPGRIP1*. Para distinguirla en el presente trabajo, esta versión de ahora en adelante se denominará “versión 1” (nótese que esta denominación no corresponde con la del fabricante).

En ese estudio anterior, y con la versión 1 del *microarray*, se analizaron 44 familias LCA (LCA-0001 a LCA-0050).

Cuando se realizó el presente estudio, estaba disponible una versión actualizada de este *microarray*, que aquí denominaremos “versión 2”, que detectaba 781 mutaciones y polimorfismos en 15 genes asociados a LCA y RP-IP (**Tabla 3.1**).

**Tabla 3.1.** Número de variantes incluidas en cada versión del *microarray* de LCA.

Gen	Nº de variantes	
	Versión 1	Versión 2
<i>AIPL1</i>	32	47
<i>CEP290</i>	23	127
<i>CRB1</i>	81	152
<i>CRX</i>	31	41
<i>GUCY2D</i>	76	116
<i>IQCB1</i>	-	9
<i>LCA5</i>	-	12
<i>LRAT</i>	2	3
<i>MERTK</i>	3	13
<i>RD3</i>	-	1
<i>RDH12</i>	34	50
<i>RPE65</i>	88	116
<i>RPGRIP1</i>	47	57
<i>SPATA7</i>	-	11
<i>TULP1</i>	-	26
<b>Total</b>	<b>417</b>	<b>781</b>

Con la versión 2 del *microarray* se analizaron 118 familias afectadas de LCA. Dentro de estas familias analizadas, se incluyeron 32 de las 44 familias del análisis anterior que no habían podido ser completamente caracterizadas en su día. Por lo tanto, un total de 130 familias LCA fueron analizadas con alguna o con ambas de las dos versiones del *microarray* de LCA.

Asimismo, con este *microarray* se analizaron 181 familias afectadas de RP-IP, de un total de 290 familias estudiadas en este trabajo.

### 3.2.2.2. *Microarray* de ARRP

La versión del *microarray* de genotipado específico de ARRP empleada en este estudio permitía la detección de 501 variantes (mutaciones y polimorfismos) descritas previamente en 16 genes: *CERKL*, *CNGA1*, *CNGB1*, *CRB1*, *MERTK*, *NR2E3*, *PDE6A*, *PDE6B*, *RDH12*, *RGR*, *RLBP1*, *RPE65*, *SAG*, *TULP1*, *USH2A* y *USH3A*.

Con esta versión se analizaron aquellas familias afectadas de RP-IP que no fueron analizadas con el *microarray* de LCA, es decir, 109 familias, de un total de 290 familias.

### 3.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa - PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

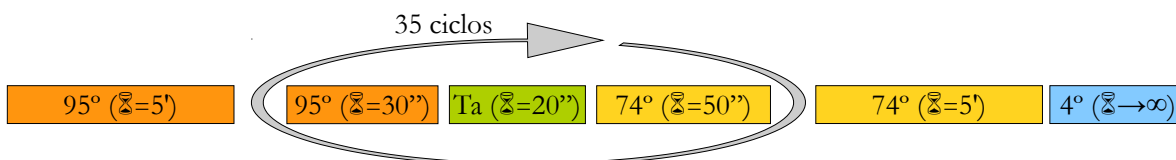
La amplificación del ADN se llevó a cabo en los termocicladores *Veriti® Thermal Cycler* y *GeneAmp PCR System 2700* (Applied Biosystems). Para comprobar la posible contaminación de los reactivos de PCR, en todas las amplificaciones se preparó un control negativo de PCR en el que, en lugar de ADN, se sustituyó por agua milliQ estéril de la misma alícuota que la utilizada en la preparación del mix de reactivos para la PCR.

Se utilizaron las condiciones generales indicadas en la **Tabla 3.2** y el programa estándar indicado en la **Figura 3.2**.

**Tabla 3.2.** *Condiciones generales PCR.*

Agua	Buffer 10x	dNTPs	Cebadores	ADN	Enzima
15,3 µl	2,5 µl	3 µl	1,5 µl/1,5 µl	1 µl	0,2 µl
-	(+MgCl <sub>2</sub> )	1,25 mM	10 pmol/µl	50 ng/µl	-
<i>Braun</i>	<i>Roche</i>	<i>Invitrogen</i>	<i>Metabion</i>		<i>FastStart Taq Roche</i>

Volumen total de reacción: 25 µl.



**Figura 3.2.** Programa estándar de PCR. El símbolo °, se refiere a °C.

Los casos en los que estas condiciones fueron modificadas, se detallan debajo de la tabla correspondiente.

Los cebadores para los cuales no se indica referencia, fueron diseñados con la ayuda del programa Primer3, procurando que el producto amplificado fuese lo más pequeño posible, que el tamaño de los cebadores fuese de alrededor de 20 pb, que la  $T_m$  fuese de alrededor de 60 °C, que el porcentaje de GC estuviese alrededor del 50% y que los índices que estiman la tendencia a que se den fenómenos no deseados (complementariedad, horquillas *-hairpins-*, unión con fragmentos no deseados) fuesen lo más bajos posibles.

Los productos de PCR obtenidos se comprobaron mediante migración electroforética en gel de agarosa 2% en solución TBE 1X.

A continuación se detallan las secuencias de los cebadores empleados. Para el gen *CRB1*, se emplearon las secuencias de los cebadores que se muestran en la **Tabla 3.12**, que se halla en el apartado **3.2.4**.

**Tabla 3.3.** Cebadores empleados para amplificación del gen *AIPL1* (RefSeq NM\_014336).

Exón	Secuencia <i>Forward</i> (5'→3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'→3')	Ta (°C)	Tam. (pb)	Referencia
1	GACACCTCCCTTTCTCCT	AATGTTGAAAGCTGCTGTGG	60	174	[67]
2	GGCCCTTGAACAGTGTGTC	TTTCCCGAAACACAGCAGC	60	316	[67]
3	AGTGAGGGAGCAGGATCC	TGCCCATGATGCCCGCTGTC	60	367	[67]
4	TCGGGTCTCTGATGGGGTG	GTCAGCGCCACTTCCCACC	55	282	Este estudio
5	AGCTGCCTGAGGTCATGG	GTGGGGTGGAAAGAAAAGTCC	55	277	Este estudio
6	GTAGCTGGATGCTCCCTG	CCACTTGCTCCCTGCCTG	60	440	[67]

Ta: Temperatura de “anillamiento”. Tam: Tamaño.

**Tabla 3.4.** Cebadores empleados para amplificación del gen *CEP290* (RefSeq NM\_025114).

Exón	Secuencia <i>Forward</i> (5'→3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'→3')	Ta (°C)	Tam. (pb)	Referencia
16-17	CATTTTTCAGCCTTATTGAATG	ATATCCAGACAACCTCACTTATC	60	380	Este estudio
int26	CGATCTCCTGAACTCGTGATCCA	GAGTCACATGGGAGTCACAGGGT	60	259	[163]

Ta: Temperatura de “anillamiento”. Tam: Tamaño.

**Tabla 3.5.** Cebadores empleados para amplificación del gen *LCA5* (RefSeq NM\_181714).

Exón	Secuencia <i>Forward</i> (5'→3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'→3')	Ta (°C)	Tam. (pb)	Referencia
1	CAATGGGAGCTCGGGTAG	TCCCTGCTTTAAGAACCACC	58	449	[78]
2	TCCTAGGAGTGGTCTCATTTCC	TCTGTTCTCGCATTACTGAGG	58	248	[78]
3	TGTGGAGAAAAATAGATTGCACAG	CCTATAAAAACGTAAAATCAGCCAC	58	465	[78]
4a	ACGGACCCACTTGTGTTAGG	GTTGCCCGTCTTTCTCTTG	62	447	[78]
4b	AGGTCAAAGTTAGCTGAGCTGC	TCCAAGCAAATACCAAATGCTGC	62	457	[78]
5	TTGGTAAATCTGTTTCCCAGC	TTATACCAACAAACCTTTTCTAAGTG	60	461	[78]
6	TGACAAAAGTGAGGGGTTTTG	TCAATGAGGTTCTTTTCTTCC	58	269	[78]
7	CCAAGCTGAGCAAAACATGC	TTAGGTATATCTCCTAAAAGCCAAAAG	58	538	[78]
8	TCTGTGTTGCTTAGTTCCCC	TTTCTTTCTCAAGGGATGCTG	58	256	[78]
9a	AAATATGGTGGTTTTATGAAAGTTG	TTTTGACTAAATGGATTTGACCTC	58	578	[78]
9b	GAAGCCCCAAAACATACAGG	TTGGCAAATCTATGTGGTG	60	765	[78]

Ta: Temperatura de “anillamiento”. Tam: Tamaño. La concentración empleada de MgCl<sub>2</sub> fue de 3 mM.

**Tabla 3.6.** Cebadores empleados para amplificación del gen *MERTK* (RefSeq NM\_006343).

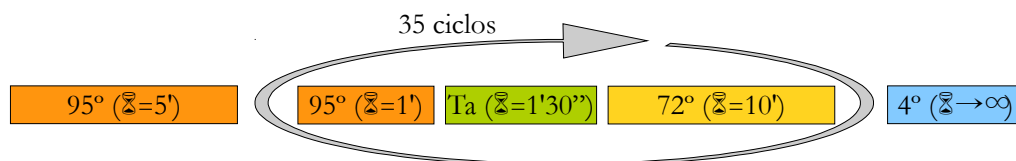
Exón	Secuencia <i>Forward</i> (5'→3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'→3')	Ta (°C)	Tam. (pb)	Referencia
16	GCAATGCGTGTGCTCTGTC	CTGCAGCTTCCTTGCCTATCT	60	547	[12]
17	TCCTCACTTGTCTGCCATT	GCTGCCAACCCCTCAGTTTATC	60	446	[12]

Ta: Temperatura de “anillamiento”. Tam: Tamaño. Se emplearon condiciones estándar, pero con el mismo programa modificado que para los cebadores del gen *RPE65* (Figura 3.4).

**Tabla 3.7.** Cebadores empleados para amplificación del gen *NMNAT1* (RefSeq NM\_022787).

Exón	Secuencia <i>Forward</i> (5'→3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'→3')	Ta (°C)	Tam. (pb)	Referencia
1	GTAGCCGTAAAACCATGGTC	CAAACCTGAATATGAGCTTG	58	437	Este estudio
2	GCTGTGGTTGCATCACTACAC	GGTCTCGATCTCTTGACCTTG	64	441	Este estudio
3	ATTGATCGTAATATTTCTGTGC	CAACACACGTGACAGTTTTGC	60	380	Este estudio
4	TGATATATTCTAATGGAGCATGTGAG	GGGTTTGCTCAGCTACAGAATC	62	264	Este estudio
5_1	AAAGTAAACCCCTTCCACTTG	ACCAAGTAGCGAATGCTCTG	58	358	Este estudio
5_2	TATGAATCGGATGTGCTGTG	TGTGCCAGACGATTTTTAC	54	484	Este estudio

Ta: Temperatura de “anillamiento”. Tam: Tamaño. Exones 2 y 4: se emplearon 2,5 µl de buffer y 1 µl de MgCl<sub>2</sub>, y se aplicó el programa modificado que se indica en la Figura 3.3.



**Figura 3.3.** Programa de PCR empleado para los exones 2 y 4 del gen *NMNAT1*. El símbolo °, se refiere a °C.

**Tabla 3.8.** Cebadores empleados para amplificación del gen RDH12 (RefSeq NM\_152443).

Exón	Secuencia <i>Forward</i> (5'→3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'→3')	Ta (°C)	Tam. (pb)	Referencia
3	CAGGAACCTGAGCCAGAGC	TTTCTCCTCTGTTCAGCCTCC	60	250	[120]
4	CGTATCTTAGTGTGAGCTCG	GAATTTCTAGTCAGAGCCCC	60	298	[120]
5	CCAGTCCCAAGCTCACTTAC	AGGGTGGAGCAGCCACTC	60	298	[120]
6	ATTATGCAGGTCTGTTACAG	CTCCACATTTACACAGTGTC	60	258	[120]
7	TCCTCTTGGCTCCACATGC	CCCAAGTTGCTGTGGACCTC	60	352	[120]
8	TGTGTATTTTGTGCAGGAG	GATGAACAGCCCAGCGAG	60	344	[120]
9	GGGACCATAAAGATTTCAG	GATCAGAGCAGGCAGGATTC	60	298	[120]

Ta: Temperatura de “anillamiento”. Tam: Tamaño.

**Tabla 3.9.** Cebadores empleados para amplificación del gen RPE65 (RefSeq NM\_000329).

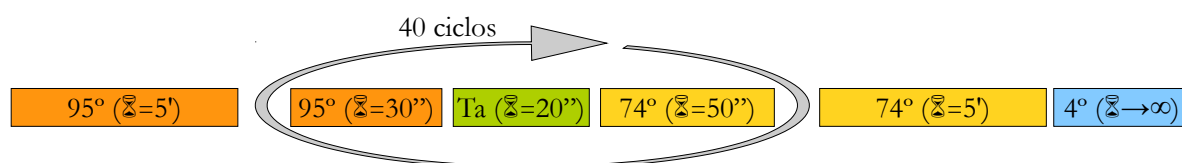
Exón	Secuencia <i>Forward</i> (5'→3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'→3')	Ta (°C)	Tam. (pb)	Referencia
1	GCTCCCAAAGCCATAACTC	AATCAATGCCTTCTCTTCAGG	58	221	Este estudio
2	CCAGCCCTAGAGTGCCTTC	CCTCTCCCTGTGACCCAC	63	292	Este estudio
3	GCCCAATCAGGCTGCTG	AAGTGGGTATATAGGTTGCCTCC	62	357	Este estudio
4+5	CCCTTTATTCTTCATGTTGTGC	ATTTGGAGCTTGAATGGTC	60	622	Este estudio
6	TTCAAGGGGTAGTGATGACC	GAGTAATTTAACTATGCACAAAATGC	60	355	Este estudio
7+8	CTGCTATTTGGATTTTCCTG	TCTTCAGAATCACAAACTTG	55	693	Este estudio
8+9	CATGTAGGCACGTGTTGATTC	CTCTTGCTGTTTTAGATGTGATTC	60	600	Este estudio
10	ATGGCTCTGATACACCTGGC	GCTTTTGCTAAGTCACAGTACTCTTC	60	471	Este estudio
11+12	TAGCTTCCTGCAGTTCCCTCC	TCTGATGGGTATGAATCAGGC	63	607	Este estudio
13	CACACGGGAGTGAACAAATG	AAGGATCGTTTTTGTAGTATTACGG	60	494	Este estudio
14.1	TCAGGTCATATGGTTTTCTATATTTG	GGCCTGTCTCACAGAGGAAG	63	499	Este estudio
14.2	AGCACTGAGTTGAGCAAGCA	TTGGTTGAGAGGCCTCAGTT	62	497	Este estudio

Ta: Temperatura de “anillamiento”. Tam: Tamaño. Se emplearon las condiciones de la **Tabla 3.10**, con la mención de que para los exones 4+5 y 10, se añadió 1 µl de MgCl<sub>2</sub> a los 2 µl de buffer con MgCl<sub>2</sub>. Se aplicó el programa modificado que se indica en la **Figura 3.4**.

**Tabla 3.10.** Condiciones de PCR empleadas para el gen RPE65.

Agua	Buffer 10x	dNTPs	Cebadores	ADN	Enzima
12 µl	2 µl	3,2 µl	0,8 µl/0,8 µl	1 µl	0,2 µl
-	(+MgCl <sub>2</sub> )	1,25 mM	10 pmol/µl	50 ng/µl	-
<i>Braun</i>	<i>Roche</i>	<i>Invitrogen</i>	<i>Metabion</i>		<i>FastStart Taq Roche</i>

Volumen total de reacción: 20 µl.



**Figura 3.4.** Programa de PCR empleado para el gen RPE65. El símbolo °, se refiere a °C.

### 3.2.3.1. Purificación post-PCR

Los productos de PCR fueron procesados por el método de purificación enzimática ExoSAP-IT de USB Corporation (Affymetrix).

Se emplearon 2,5  $\mu$ l de amplificado con 1  $\mu$ l de ExoSAP-IT. La purificación se llevó a cabo en un termociclador *GeneAmp PCR System 2700* (Applied Biosystems), con una incubación a 37 °C durante 15 minutos, y una inactivación a 80 °C también durante 15 minutos.

### 3.2.4. Técnica de HRM (*High Resolution Melting*)

*High Resolution Melting* es un método de *screening* mutacional post-PCR que tiene dos aplicaciones fundamentales. La primera es el genotipado de variantes previamente conocidas, mientras que la segunda es el cribado de nuevas mutaciones [179].

Esta técnica sólo es aplicable a muestras de ADN de cadena doble y consiste primeramente en el uso un agente intercalante, que se introduce entre las dos cadenas de ADN de una muestra, y emite fluorescencia sólo cuando está situado entre las dos hebras. Posteriormente, las muestras se calientan, y al aportar energía, las cadenas comienzan a disociarse progresivamente, a la vez que el agente intercalante, lógicamente, deja de estar intercalado en la parte disociada de una misma muestra. Con ello, el agente deja de ser fluorescente, y el efecto que se obtiene, es que la fluorescencia de una muestra va variando, desde un nivel de luminosidad máximo cuando la muestra todavía no ha comenzado a disociarse, hasta un nivel mínimo, que es cuando la muestra se ha disociado completamente.

Midiendo la temperatura y la luminosidad, y representándolas en una gráfica se obtiene una curva (curva de disociación o curva de fusión) que representa el proceso de disociación de una muestra, y lo interesante es que dicha curva es característica de esa muestra, y que si hay alguna variación en la muestra, dado que el aporte de energía necesario para disociarla cambiará, la curva obtenida también lo haría. Las diferencias en las curvas de fusión se deben a variaciones en la secuencia de los amplicones, en la longitud y/o el contenido en GC.

En ocasiones, en vez de hablarse de una curva, se habla de una temperatura de disociación o temperatura de fusión (*melting temperature*,  $T_m$ ). Esta temperatura se define como la temperatura a la que el 50% de la muestra se ha disociado, y como la curva es característica de la muestra, el punto donde se ha disociado la mitad de la muestra puede ser suficiente para caracterizarla.

Mediante esta técnica se pueden analizar amplificados de hasta 300 bp, es decir, no permite detectar grandes inversiones, deleciones o inserciones [180, 8]. Comparada con las técnicas SSCP y dHPLC, la HRM es más simple, rápida y económica, a la vez que ofrece una mejor sensibilidad y especificidad [8]. Además, dado que la amplificación y el análisis se realizan en un sólo equipo, se reduce la posibilidad de cometer errores de análisis o introducir contaminaciones.

El equipo de HRM empleado fue el *LightCycler 480 Real-Time PCR System* (Roche), junto con el kit *LightCycler 480 High Resolution Melting Master* que contiene como agente intercalante el R27, también de la casa Roche Diagnostics. El software *LightCycler 480 Gene Scanning Software* se utilizó para el procesamiento de los datos, así como el análisis de las curvas resultantes.

Se emplearon las mismas parejas de cebadores utilizadas en la PCR convencional, pero se realizó un estudio previo, para optimizar los parámetros de estos cebadores para la técnica de HRM, en la cual se realiza una PCR a tiempo real previa (Tabla 3.12). Es conveniente añadir que, dada la gran sensibilidad de esta técnica, para el proceso de validación se realizó una sola ejecución del análisis, pero con todas las reacciones por duplicado.

Los reactivos que se utilizaron en esta técnica fueron los indicados en los protocolos de la casa comercial Roche, que se exponen en la Tabla 3.11, excepto en algunos exones, donde con el fin de optimizar la PCR, se variaron las cantidades de MgCl<sub>2</sub>.

Tabla 3.11. Componentes utilizados para la técnica de HRM.

H <sub>2</sub> O, PCR-grade	Master Mix	MgCl <sub>2</sub>	Oligos	ADN
X µl	10 µl	2 µl	1 µl/1 µl	2 µl
-	1x	2,5 mmol/l	200 nmol/l	30 ng/µl
Roche	Roche	Roche	Metabion	

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- Desnaturalización del ADN a 95 °C durante 10 minutos.
- 45 ciclos de: pre-incubación a 95 °C durante 20 segundos, tras ello, 20 segundos a la temperatura de hibridación seleccionada para cada pareja de cebadores, y finalmente, otros 20 segundos a 72 °C para la elongación.

Después de la amplificación, los productos de la PCR fueron desnaturalizados a 95 °C durante 1 minuto, y enfriados a 40 °C para permitir la formación hetero-duplex. Finalmente, se realizó la etapa de HRM propiamente dicha, con un gradiente de temperatura de 40 a 95 °C, a una velocidad de 1 °C/s, tomando 25 lecturas por °C. Las curvas obtenidas fueron normalizadas, se ajustaron los valores de temperatura y finalmente, se obtuvo una gráfica de diferencias.

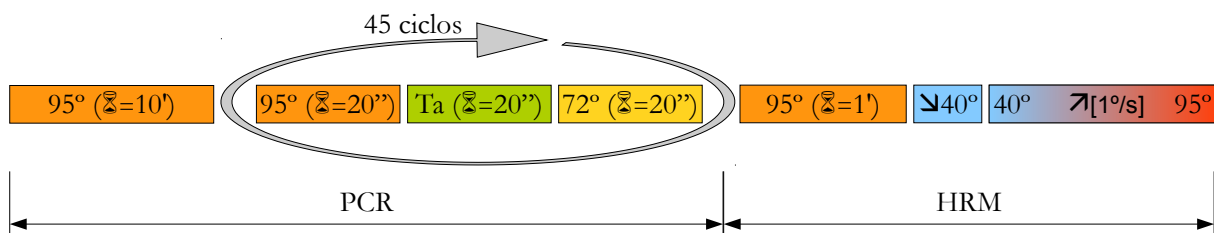


Figura 3.5. Programa empleado en la técnica HRM. El símbolo °, se refiere a °C.



**Tabla 3.12** *Cebadores empleados para amplificación del gen CRB1.*

Exón	Secuencia <i>Forward</i> (5'→3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'→3')	Ta PCR (°C)	Ta Real Time PCR (°C)	Tamaño (pb)	Referencia
1	CAGCAACACACCAGAGGATG	ATAATAAGCCAGAAATAAACCCAG	55	55	158	Este estudio
2a	GCAGCACAAAGGTCACAAAG	TCCTGATGGCAAATACCTCC	60	58	395	Este estudio
2b	GTACAGTGGGACAATCTGTG	CCAAGTCGCAGTGTCTGCC	60	60	254	[67]
2c	GATGGAATTGATGGTTACTCC	CTTAGAAAAGAGCTAACTACACC	58	58	211	[67]
3a	GCTCTGGTAAACAAAGCATTG	GAATCCAGGGGCACAGTCG	58	58	200	[67]
3b	GACGAATGTTGGTCCCAGC	CAGAGTGGTAAAAATAGTTCATG	60	60	240	[67]
4	GAAACAGTATAAAGATATCTGATC	GCTATAAGCGATATGTGTATTC	55	55	275	[67]
5	TAATTC AACACCTTTGACTTAGC	TGCCATAAAATACCAGAAAAGTC	55	55	282	Este estudio
6a	ACAAGTAAATTACGTGAAACTTC	AGTGAGGGATGCATGTTCC	60	60	281	[67]
6b	ATTCTCCTGGGCTGTACC	GCTATGTTACAAACTGAGCC	60	60	212	[67]
6c	GCGATGGCTTCCTGTGGG	TGCCACTCTCCATCGCTCC	60	60	235	[67]
6d	CAGGTCAATAATCAGTCAAAGG	CAAACGAAGGTGTGGATGGC	58	58	280	[67]
6e	ACCAGTGGGAATGACCAGC	CTGTGGCAGTCACACTGG	60	60	252	[67]
6f	CAACCTTGTC AAAGCAGAGG	CTCTGAGGCATGGCACTCC	60	58	140	[67]
7a	TTCTCCTCCTCCTCTATTTTG	ACACGGATATATTGATAAGTGC	58	58	196	[67]
7b	CTCCATGTTTGTCCGAACGC	TCTTGCTTGT CAGGTAGGC	60	60	303	[67]
7c	TCAGTCTTCACAAAACCTAGG	ATAAAGTAAAAGTTTAGCATAACAG	56	56	308	[67]
8	CAACATTTTTCTATTTAGTTGCC	CTCAAATGTCGCAACTTAACTG	56	56	276	[67]
9a	AATGATCATTACTATTAATAACGG	GTGCCATCATTCACTGACTG	55	55	339	[67]
9b	GTGGCAACAGCTTTTATATGC	CATGAACATTTTCAAAGTAAGAG	56	56	303	[67]
9c	ATATAAAGGGCCTGCAAGGG	GCTGCAACTCTGTCAGAGC	56	58	325	[67]
9d	GAACTCAACATCGATGAATGC	CAGTGATGCAGAGTATAGCTTC	56	56	282	[67]
10	CTTGAATGAGATGAACAAGATG	GAGGAGAAAATGAACTTTGAG	56	58	261	[67]
11	ACTTTTTCTTCCCATTTCAC	ACAACCTGGCTCGTCATTCAT	55	55	298	Este estudio
12	GCCTTIGCTATAGAATTCGC	AGTACAGTCATCACATTCACA	55	55	318	[67]

Ta: temperatura de anillamiento.

### 3.2.5. Secuenciación automática

La reacción se realizó empleando el kit comercial (premix) *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* de Applied Biosystems. La reacción de secuenciación se realizó en un volumen total de 12  $\mu$ l y a cada tubo se le añadieron las cantidades indicadas a continuación:

**Tabla 3.13.** Reactivos de la reacción de secuenciación.

Reactivos del mix	Volumen por muestra ( $\mu$ l)
Premix	0,5
Buffer de Premix	2,4
Cebador <i>Fw</i> o <i>Rv</i> (10 pmoles)	1,2
H <sub>2</sub> O	4,4
Producto de PCR amplificado	3,5

*Fw*: Forward. *Rv*: Reverse.

Una vez preparada la reacción, el termociclador se programó con una desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos, seguida de 25 ciclos compuestos por una desnaturalización a 96 °C durante 10 segundos, una hibridación a 55 °C durante 5 segundos y una extensión a 60 °C durante 4 minutos.

La purificación del producto de secuenciación se realizó utilizando el kit comercial *Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup* de Millipore, basado en placas de filtración y una solución que permite eliminar sales contaminantes, terminadores marcados, ddNTPs y otros reactivos de la reacción de secuenciación.

Una vez purificado, el producto se introdujo en un analizador automático de ADN *ABI Prism 3130* de Applied Biosystem. El análisis de las secuencias se realizó mediante el programa informático *Staden Package*.

### 3.2.6. Técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

MLPA es un método de cribado que fue desarrollado por primera vez por Schouten *et al.*, 2002 [130], y comercializado por MRC-Holland, que permite detectar deleciones o duplicaciones de material genético. Se utilizan sondas de distintos tamaños, específicamente diseñadas para que hibriden en zonas adyacentes dentro de la secuencia de ADN de interés. Una vez hibridadas, las sondas se unen mediante una ligasa termoestable y posteriormente se amplifican mediante una PCR multiplex utilizando una única pareja de oligos. Todas las sondas contienen las mismas secuencias en sus extremos, lo cual permite la amplificación simultánea.

Se emplearon dos kits comerciales de la casa MRC-Holland para el estudio de ocho de los genes asociados a LCA: SALSA MLPA KIT P221 LCA mix-1 y MLPA KIT P222 LCA mix-2. El primero de ellos, contiene sondas para los genes *AIPL1*, *CRB1*, *CRX* y *RPE65*, mientras que el segundo, contiene sondas para los genes *CEP290*, *GUCY2D*, *RDH12* y *RPGRIP1*.

Los productos de PCR obtenidos se procesaron por electroforesis capilar (*ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer*, Applied Biosystems) mediante el programa informático *GeneMapper Software v3.5*, y los datos fueron analizados mediante el programa informático *Coffalyser.Net* (MRC Holland).

### 3.2.7. Estudio genético indirecto

#### 3.2.7.1. Construcción de haplotipos mediante STR

Los marcadores microsatélite son también conocidos como *Short Tandem Repeats* o STR debido a su pequeño tamaño y su composición en bloques repetidos en tándem. Cada bloque está formado por unidades de repetición entre 1 y 6 pares de bases que se repiten entre 3 y 50 veces. Desde su descubrimiento en 1989, estos marcadores han tenido un gran impacto en el estudio de la variabilidad genética de los individuos debido a las ventajas que presentan frente a otro tipo de marcadores, entre las que destacan el elevado número de alelos presente en cada locus en la población (es decir, son regiones altamente polimórficas), lo que hace que la probabilidad de que un individuo sea heterocigoto sea generalmente superior al 70%, y que son fáciles de analizar.

Los haplotipos son conjuntos de alelos de múltiples *loci* que se transmiten juntos de padres a hijos. La construcción de haplotipos se refiere al estudio de la transmisión de haplotipos dentro de una familia, es decir, cuáles ha podido recibir un hijo de su padre y cuáles de su madre. Esto permite descartar a un gen como candidato a causar la enfermedad, siempre que la familia sea lo suficientemente informativa.

Uno de los métodos más habituales para la construcción de haplotipos es el empleo de marcadores microsatélites que sean lo más informativos posible, es decir, que estén lo más cerca posible o dentro de las regiones de interés, y que tengan una elevada heterocigosidad.

Para la construcción de haplotipos se utilizaron los marcadores microsatélite que se indican en las tablas 3.14-3.15. Estos marcadores polimórficos se amplificaron mediante una PCR *multiplex* utilizando parejas de cebadores, con el cebador *forward* marcado con un fluorocromo específico para su posterior detección automática. Para todos los marcadores se utilizó un mismo protocolo de amplificación, descrito en Vallespín *et al.*, 2007a [161]. La detección de los productos amplificados se realizó en el secuenciador automático *ABI 3130xl Genetic Analyzer*, y el análisis de fragmentos se realizó con el programa *GeneMapper*, ambos de la casa Applied Biosystems.

**Tabla 3.14.** *Microsatélites del gen CRB1 [161]*

Marcador	Fluorocromo	Rango alélico (pb)	Distancia (cM)
D1S408	NED	170-186	3,29 (anterior)
D1S2757	6FAM	223-271	2,49 (anterior)
D1S2816	NED	210-252	0,58 (anterior)
D1S1660	PET	226-250	1,2 (posterior)

**Tabla 3.15.** *Microsatélites del gen RPGRIP1 [164]*

Marcador	Fluorocromo	Rango alélico (pb)	Distancia (cM)
D14S72	6FAM	257-271	0,38 (anterior)
D14S122	PET	144-174	0,37 (anterior)
D14S283	VIC	125-153	0,29 (posterior)
D14S1003	NED	134-174	0,86 (posterior)

### 3.2.7.2. Mapeo de homocigosidad por *microarrays* de SNP

Los SNP (*single nucleotide polymorphisms*) son el tipo de polimorfismos más frecuentes en humanos y como su nombre indica, consisten en el cambio de un nucleótido por otro. Son menos informativos que los microsátélites, pero son mucho más frecuentes, tienen una distribución regular a lo largo de todo el genoma, no mutan con facilidad, y las tecnologías existentes permiten un genotipado relativamente sencillo y rápido [128].

Los *microarrays* de SNP de alta resolución son capaces de genotipar miles de SNP a lo largo de todo el genoma, lo que permite identificar SNP homocigotos, y cuando hay grupos de SNP consecutivos en homocigosis, esto a su vez permite identificar regiones homocigotas en el genoma, que es el fin del mapeo de homocigosidad.

Las regiones homocigotas son de especial interés en las enfermedades recesivas, ya que una misma mutación responsable puede confluir en un individuo afecto, como parte de regiones idénticas del genoma que se heredan por descendencia (IBD, por sus siglas en inglés) a partir de un antepasado común. Esto ocurre con mayor frecuencia en familias consanguíneas o poblaciones aisladas. En afectos procedentes de este tipo de familias, existe una mayor probabilidad de que la patología sea debida a una mutación homocigota heredada por IBD. En estos casos, el análisis de homocigosidad representa una estrategia muy útil para mapear estas regiones. Una vez identificadas, éstas se pueden analizar por otras técnicas como secuenciación automática en busca de mutaciones homocigotas en genes relacionados con la patología estudiada o en busca de nuevos genes candidatos.

En este estudio, el mapeo de homocigosidad se llevó a cabo en 66 familias (43 LCA y 23 RP-IP) tanto consanguíneas como no consanguíneas, utilizando *arrays* comerciales de alta resolución de Affymetrix (*Genome Wide Human SNP array 6.0* y *GeneChip Human Mapping 500K ArraySet*). El genotipado con el *array* de Affymetrix fue realizado por el Centro Nacional de Genotipado (CEGEN-ISCIH), nodo Universidad de Santiago de Compostela, siguiendo los protocolos de la casa comercial.

Las regiones de homocigosidad se calcularon mediante desequilibrio de ligamiento, utilizando el algoritmo *Hidden Markov Model* (LD-HMM), en el software dCHIP [95].

### 3.2.8. Valoración de la patogenicidad y clasificación de las nuevas variantes

La patogenicidad de las variantes que previamente no habían sido descritas en la literatura se estableció aplicando distintos criterios según el tipo de mutación: predicción *in silico*, conservación evolutiva del residuo, segregación familiar y frecuencia poblacional. Estos criterios se han resumido de forma esquematizada en la **Figura 3.6**.

Las variantes nulas o de pérdida de función (*loss-of-function*, LOF), fueron consideradas patogénicas. En este grupo se incluyeron variantes *nonsense* y *frame-shift*, así como las variantes en sitios canónicos de *splicing*. Para estas últimas, se comprobó su efecto sobre el *splicing* mediante el programa *Human Splicing Finder* (HSF).

En el caso de nuevas variantes *missense* o *in-frame*, su patogenicidad fue evaluada mediante distintos criterios:

1. Frecuencia en una población de individuos control sanos, de origen español. En el caso de que la variante estuviera presente, se clasificaba como no causante de la enfermedad, ya que podía tratarse de un polimorfismo o una variante rara.
2. Conservación proteica en ortólogos mediante los programas BLINK y Jalview 2 [175] y el algoritmo Clustal Omega [135]. Si un residuo no cambiaba en ninguna de las especies, se consideraba “altamente conservado”. Si cambiaba en menos de tres especies, se consideraba “moderadamente conservado”, mientras que si lo hacía en entre tres y cinco especies, se consideraba “débilmente conservado”. En los demás casos, el residuo era considerado como “no conservado”.
3. Evaluación *in silico* de patogenicidad mediante los programas Polyphen-2, SIFT, Align GVGD, PROVEAN, cuyos sistemas de clasificación se exponen en la **Tabla 3.16**. Como resultado global del análisis *in silico*, las variantes clasificadas como dañinas por dos o más programas fueron consideradas como patogénicas; en caso contrario, se consideraron como de baja probabilidad patogénica.
4. Segregación familiar compatible con herencia autosómica recesiva.
5. Presencia/ausencia de un segundo alelo patogénico.

Siguiendo estos criterios, las variantes *missense* no descritas previamente fueron clasificadas como:

- Mutaciones causales: aquellas variantes ausentes en población control, segregando correctamente en la familia junto con un segundo alelo patogénico y clasificadas como deletéreas mediante programas *in silico*.
- Variantes de significado incierto: aquellas variantes predichas como probablemente patogénicas mediante análisis *in silico*, sin presencia de un segundo alelo patogénico.
- Variantes raras no causales: aquellas presentes en población control, sin conservación evolutiva, sin segregación en la familia y/o predichas como no patogénicas en estudios *in silico*.

**Tabla 3.16.** Programas para evaluación *in silico*.

Programa	Sistema de clasificación	Clasificación variantes
Polyphen-2 [5]	Score [0..1]	Score < 0.4 ⇒ Benigna 0.4 ≤ Score ≤ 0.85 ⇒ Posiblemente patogénica Score > 0.85 ⇒ Probablemente patogénica
SIFT [90]	Score [0..1]	Score < 0.05 ⇒ Deletérea Score ≥ 0.05 ⇒ Tolerada
Align GVGD [154]	Seis categorías (C0-C65)	C0 ⇒ Menor probabilidad patogénica C65 ⇒ Mayor probabilidad patogénica
PROVEAN [34]	Score numérico	Score ≤ -2.5 ⇒ Deletérea Score > -2.5 ⇒ Tolerada

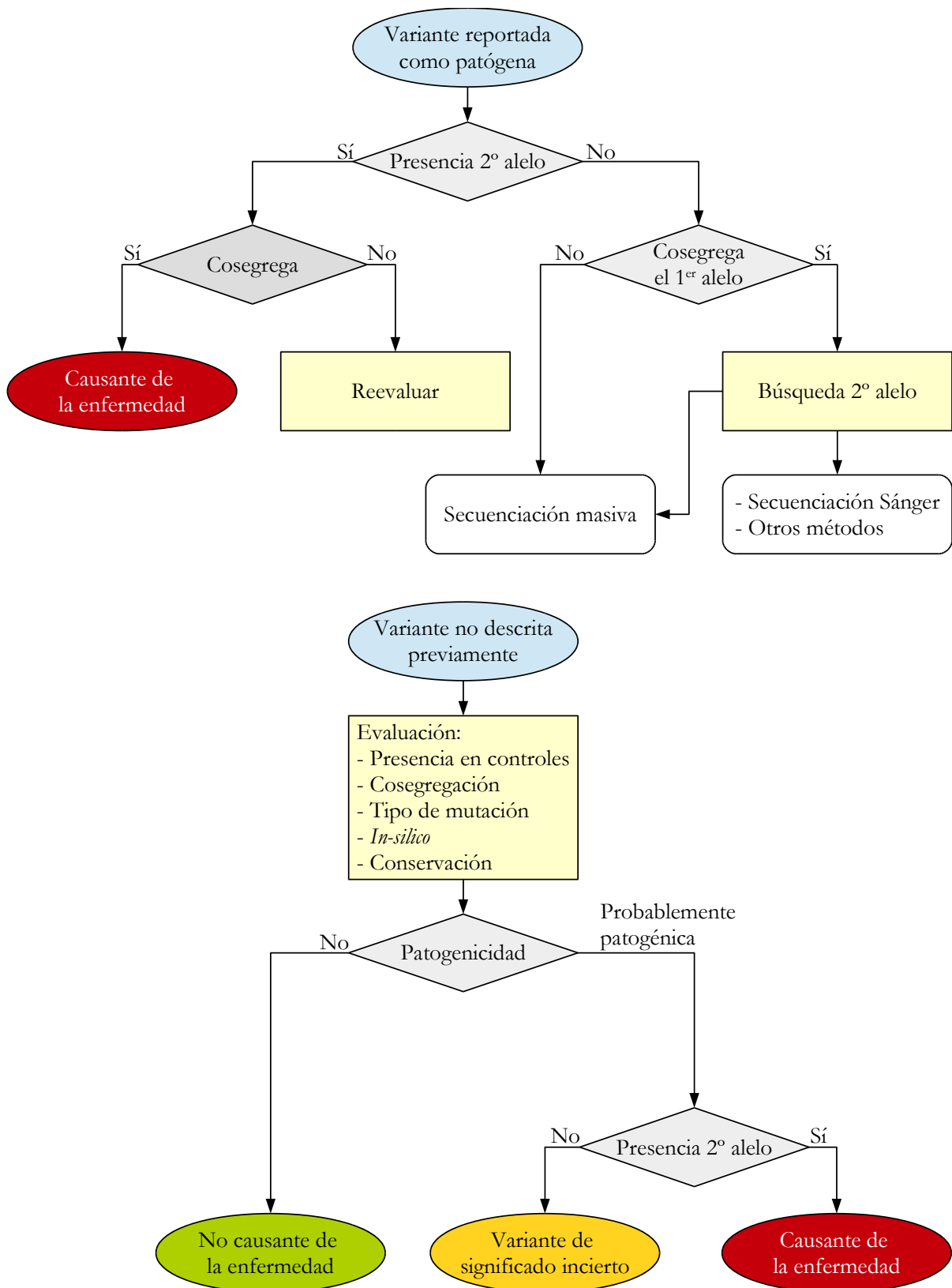


Figura 3.6. Metodología de clasificación de las variantes detectadas en este estudio.

### 3.2.9. Sensibilidad y especificidad

La sensibilidad y la especificidad son indicadores de la fiabilidad de una técnica a la hora de detectar variantes (positivos) o de descartar candidatos (negativos). Sus fórmulas son las siguientes:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}}$$

### 3.2.10. Herramientas bioinformáticas

Bases de datos:

- RetNet: <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>
- Ensembl: <http://www.ensembl.org>
- NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- UCSC Genome Browser: <http://genome.ucsc.edu>
- UniProtKB: <http://www.uniprot.org>
- HGMD Professional (*Human Gene Mutation Database*): <http://www.hgmd.cf.ac.uk>
- dbSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

Programas informáticos:

- Primer3: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>
- Staden Package: <http://sourceforge.net/projects/staden/>
- Cyrillic: <http://www.apbenson.com/about-cyrillic-2/>
- dCHIP: <http://www.hsph.harvard.edu/cli/complab/dchip/>
- HSF (*Human Splicing Finder*): <http://www.umd.be/HSF3/>
- Polyphen-2: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
- SIFT: <http://sift.jcvi.org/>
- Align GVGD: [http://agvgd.iarc.fr/agvgd\\_input.php](http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php)
- PROVEAN: <http://provean.jcvi.org/index.php>
- BLINK: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>
- Jalview 2: <http://www.jalview.org>
- Clustal Omega: <http://www.clustal.org/omega/>
- Coffalyzer: <http://coffalyser.wordpress.com/>

### 3.2.11. Nomenclatura de genes y variantes

Con el fin de evitar ambigüedades, en el presente trabajo se emplean las denominaciones y símbolos unificados y normalizados que aprueba el *HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)* de la *HUGO (Human Genome Organization)*. Estos símbolos y denominaciones se pueden consultar en la base de datos del HGNC ([www.genenames.org](http://www.genenames.org)).

Para la nomenclatura de las variantes se han seguido las recomendaciones de la Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>).

### 3.2.12. Protocolo para el estudio molecular

Como paso inicial, el caso índice de cada una de las familias estudiadas, se analizó mediante un *microarray* de genotipado específico de LCA o ARRP, con el fin de detectar mutaciones conocidas.

Los resultados del análisis se consideraron negativos, cuando no fue detectada ninguna mutación, o positivos, cuando se identificó uno o dos alelos mutados en el mismo gen. En este caso, las mutaciones identificadas fueron confirmadas por secuenciación automática Sanger.

A continuación, se detalla el procedimiento seguido en cada una de las tres posibilidades expuestas arriba:

#### 1. Identificación de dos mutaciones en el mismo gen

En aquellos pacientes que presentaban dos mutaciones, se realizó estudio familiar, siempre que hubiera disponibles muestras de familiares directos, con el fin de confirmar la segregación de las mutaciones.

#### 2. Identificación de una mutación

En aquellos pacientes que presentaban una mutación, se realizó estudio indirecto utilizando STRs para establecer si la segregación familiar de haplotipos pudiera ser compatible con herencia autosómica recesiva y segregando con la patología. Esto sólo se pudo realizar en familias lo suficientemente informativas, con varios hermanos disponibles.

Tras verificar esta segregación o en casos de familias no informativas, se secuenció el gen mediante secuenciación automática con el fin de buscar una segunda mutación, no detectada por el *microarray*. Además, en el caso de los genes *AIPL1*, *CEP290*, *CRB1*, *RPE65*, *GUCY2D*, *RDH12* y *RPGRIP1*, se realizó un estudio por MLPA, con el objetivo de detectar grandes deleciones o duplicaciones en estos genes.

En caso de falta de segregación familiar del alelo identificado, se procedió como en el caso de ausencia mutaciones, descrito más abajo.

#### 3. Ninguna mutación detectada

Aquellos pacientes que presentaban resultados negativos mediante el *microarray* de genotipado, es decir, sin mutaciones, fueron incluidos en nuevos estudios, incluyendo mapeo de homocigosidad utilizando arrays de genotipado del genoma completo y cribado de los genes *CRB1* y *NMNAT1*, mediante HRM y/o secuenciación automática Sanger.



## **4. RESULTADOS**

Se han estudiado 130 familias españolas con sospecha clínica de LCA, que llegaron entre los años 1990 y 2013 a las consultas de Oftalmología y Genética del Hospital Fundación Jiménez Díaz. El presente trabajo supone una continuación y ampliación de la tesis doctoral de Vallespín, 2008 [164], donde se estudiaron 44 familias LCA, que están incluidas en estas 130 familias, con el fin de tener una mejor estimación del espectro mutacional en la población española. Aquellas de las 44 familias que no se consiguió caracterizar por Vallespín, 2008, fueron sometidas a nuevos análisis a lo largo de este estudio.

En el estudio de Vallespín, 2008, se empleó el *microarray* APEX como herramienta para detectar mutaciones conocidas combinado con distintas técnicas de cribado como dHPLC y secuenciación directa. En el presente estudio, aunque también se empleó el *microarray* como primera herramienta de diagnóstico, se emplearon otras aproximaciones de estudio no empleadas hasta el momento como HRM, MLPA y mapeo de homocigosidad, que nos permitieron realizar un estudio más completo.

En el presente trabajo, también se han incluido 290 familias españolas con sospecha clínica de RP-IP, que fueron estudiadas en busca de mutaciones en el gen *CRB1*, y una parte de ellas, también en busca de mutaciones en el gen *NMNAT1*.

La exposición de los resultados se ha estructurado de la siguiente manera:

- Primero, se exponen los resultados del *microarray* de genotipado para las familias de LCA.
- Tras ello, se exponen los resultados de manera individualizada para cada gen, con especial atención sobre los genes *CRB1* y *NMNAT1*, que acapararon una buena parte del trabajo realizado.
- Finalmente, se realiza un resumen global de los resultados.

Se ha optado por esta estructura porque por una parte refleja la secuencia que se siguió en el estudio, y por otra, porque permite ver de una forma reunida los resultados para cada gen, sin que estén dispersos entre los diversos apartados que corresponden a las diversas técnicas. Ello da una mejor visión de qué mutaciones son las más frecuentes en cada gen, así como de la facilidad o dificultad para detectarlas en este estudio. Al mismo tiempo, también facilita la agrupación de los resultados en el resumen final, cuyo objetivo es dar una visión global de la caracterización genético-molecular de las familias LCA en la población española.

#### **4.1. CRIBADO MUTACIONAL MEDIANTE EL *MICROARRAY* DE GENOTIPADO ESPECÍFICO DE LCA**

Como ya se ha mencionado en anteriores apartados, el *microarray* de genotipado es una efectiva herramienta para el cribado inicial de mutaciones conocidas.

Así, mediante el *microarray* se estudió la cohorte completa de familias con sospecha clínica de LCA del presente estudio, es decir, 130 familias. Las 44 familias que no pudieron ser caracterizadas por Vallespín, 2008 [164], fueron analizadas de nuevo mediante el *microarray* debido a que en ese estudio desarrollado entre 2005-2007, se empleó una versión del *microarray* que incluía 417 variantes en 10 genes, mientras que la versión disponible durante el presente estudio incluía 781 variantes en 15 genes. Las actualizaciones del *microarray* para incluir nuevas variantes permiten que esta herramienta no se quede obsoleta y que su efectividad vaya mejorando.

De las 130 familias LCA, se detectaron mutaciones en el 30,8% (40/130): una sola mutación en el 16,2% de las familias (21/130), y dos mutaciones en el 14,6% de las familias (19/130). En la **Tabla 4.2** y la **Figura 4.1** se muestran los resultados detallados por genes.

Todas las variantes detectadas por el *microarray* se validaron mediante secuenciación directa y fueron segregadas en sus respectivas familias, excepto en algunos casos en los que la ausencia de ADN de familiares impidió completar este estudio.

En tres pacientes, se observaron señales anómalas o inesperadas en el *microarray*, que se comprobaron posteriormente por secuenciación automática. Esto reveló que se trataba de tres variantes heterocigotas que no estaban descritas en la literatura, que se detallan en la **Tabla 4.1**. En los tres casos, a el *microarray* incluía otra mutación previamente descrita que se da en la misma posición. En el caso índice de la familia **LCA-0061**, se detectó de manera simultánea un segundo alelo en *RPE65*, mientras que en los otros dos pacientes, solo se detectó este alelo.

**Tabla 4.1.** Familias con señales anómalas.

Familia	Gen	Exón	Microarray LCA		Secuenciación	
			Cambio nucleótido	Cambio aminoácido	Cambio nucleótido	Cambio aminoácido
LCA-0034	<i>CRB1</i>	7	c.2612TG>CA	-	c.2614G>A	p.Ala872Thr
LCA-0061	<i>RPE65</i>	4	c.311G>T	-	c.311G>T	p.Gly104Val
LCA-0068	<i>RPE65</i>	9	c.859indel	-	c.859delG	p.Val287Phefs*38

Tal como se detallará en los siguientes apartados, mediante el *microarray* de genotipado también se detectaron polimorfismos y otras variantes, que no fueron consideradas como mutaciones en este estudio.

Los genes más mutados fueron *CRB1*, con mutaciones en 15 familias, *RPE65* en 8, *CEP290* en 6 y *RDH12* con 4. En el caso del gen más mutado, 9 familias presentaron mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta, lo que representa aproximadamente la mitad de las familias caracterizadas (9/19).

Tabla 4.2. Resultados del microarray de LCA, desglosados por genes.

Gen	Familias LCA					
	2 mutaciones		1 mutación		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>CRB1</i>	9	6,92	6	4,62	15 (3)	11,54
<i>RPE65</i>	3	2,31	5	3,85	8 (0)	6,15
<i>CEP290</i>	2	1,54	4	3,08	6 (0)	4,62
<i>RDH12</i>	2	1,54	2	1,54	4 (1)	3,08
<i>AIPL1</i>	2	1,54	0	0,00	2 (2)	1,54
<i>LCA5</i>	1	0,77	1	0,77	2 (1)	1,54
<i>RPGRIP1</i>	0	0,00	2	1,54	2 (0)	1,54
<i>MERTK</i>	0	0,00	1	0,77	1 (0)	0,77
<i>Total</i>	19	14,62	21	16,15	40 (7)	30,77

Entre paréntesis se indica el número de familias consanguíneas/endogámicas. En todas estas familias se detectó una mutación en homocigosis, excepto en una familia en *CRB1* donde se detectaron dos mutaciones en heterocigosis.

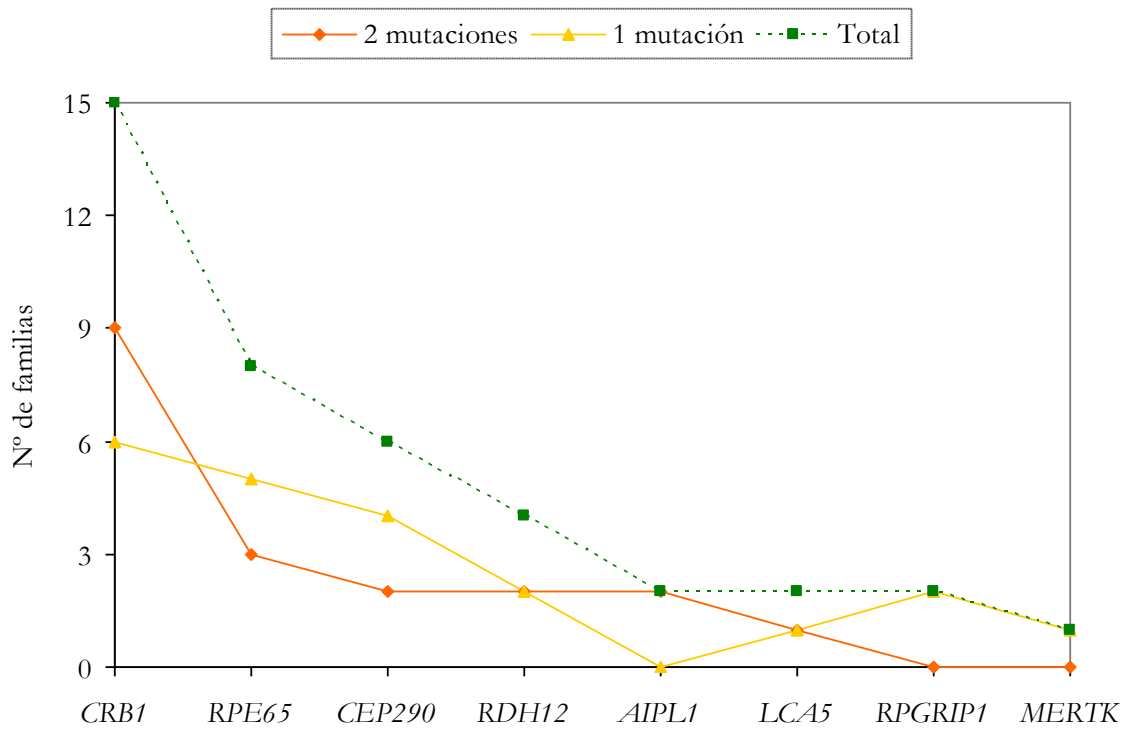


Figura 4.1. Representación gráfica de los resultados del microarray de LCA, por genes.

#### 4.1.1. Otras variantes detectadas por el *microarray*

Como ya se ha mencionado, el *microarray* detectó también otras variantes, todas ellas *missense*, sobre las que los datos disponibles no permitían clasificarlas *a priori* como mutaciones causantes pero tampoco podían ser descartadas como neutras. Ninguna de estas variantes se encontró segregando junto con un segundo alelo causante de la enfermedad.

En concreto, el *microarray* detectó seis variantes en heterocigosis, en siete familias, en los genes *AIPL1*, *CRB1*, *CRX* y *RPGRIP1*. Todas fueron consideradas como posiblemente no patogénicas, excepto p.Ile205Thr en *CRB1*, cuyo significado no fue concluyente. Estos cambios se detallan en la **Tabla 4.3** y se discutirán en detalle en el apartado **5.4**.

#### 4.1.2. Discrepancias *microarray* de genotipado versus secuenciación. Sensibilidad y especificidad.

Durante el análisis, el *microarray* de genotipado no detectó ningún falso positivo. Sin embargo, hubo dos casos de falsos negativos, es decir, que estando incluidas en el *microarray* en el momento del estudio, estas mutaciones no fueron detectadas por el *microarray*, y se encontraron posteriormente tras la secuenciación de todos los exones y de las regiones de *splicing*. En concreto:

- En la familia **LCA-0017** no se detectó la mutación c.2401A>T; p.Lys801\* en el gen *CRB1*.
- En la familia **LCA-0031** no se detectó la mutación c.806\_810delCCCTG; p.Ala269Glyfs\*2 en *RDH12*.

Así pues, resultó una especificidad del 100% y una sensibilidad del 95%.

Tabla 4.3. Otras variantes detectadas por el microarray de LCA.

Gen	Exón	Cambio nucleótido	Cambio aminoácido	Referencias	dbSNP (MAF)	Align GVG D	PolyPhen-2 (score)	PROVEAN (score)	SIFT (score)	Conservación residuo	Nº alelos	Segregación (*)	Conclusión
<i>CRB1</i>	2	c.614T>C	p.Ile205Thr	[21, 76, 25, 70, 169]	rs62645749 (0,06%)	C0	Posiblemente dañino (0.813)	Deletéreo (-2.727)	Dañino (0.00)	MC. Thr no presente.	2	C (1 familia)	No concluyente
<i>CRB1</i>	8	c.2681A>G	p.Asn894Ser	[73, 76]	rs62636290 (N/D)	C0	Benigno (0.003)	Deletéreo (-2.544)	Tolerado (0.26)	MC. Ser en el pavo y la rana.	1	N/F	Posiblemente no dañino
<i>AIPL1</i>	6	c.971G>T	p.Arg324Leu	[178, 153]	rs150427474 (0,24%)	C0	Benigno (0.317)	Deletéreo (-3.07)	Dañino (0.04)	NC. Leu no presente.	1	N/F	Posiblemente no dañino
<i>AIPL1</i>	6	c.1126C>T	p.Pro376Ser	[139, 153]	rs61757484 (1,52%)	C0	Benigno (0.001)	Neutro (0.053)	Tolerado (0.155)	NC. Ser no presente.	1	C	Probablemente no dañino
<i>CRX</i>	3	c.425A>G	p.Tyr142Cys	[118, 185, 52]	rs61748442 (0,02%)	C35	Probablemente dañino (0.993)	Deletéreo (-3.05)	Tolerado (0.17)	MC	1	N/F	Probablemente no dañino
<i>RPGRIP1</i>	21	c.3358A>G	p.Ile1120Val	[161, 141]	rs137853911 (0,06%)	C0	Benigno (0.368)	Neutro (-0.91)	Tolerado (0.09)	DC; Val en la rana y el pez cebra.	1	N/F	Posiblemente no dañino

MAF: *Minor allele frequency*, obtenido del proyecto 1000 Genomes, en una muestra de 2500 individuos. NC: No conservado. MC: Moderadamente conservado. DC: Débilmente conservado.

(\*) Resultado del análisis de segregación; “No”: no cosegrega; “C”: cosegrega; “N/F”: no se realizó por falta de familiares.

A continuación se detallan de manera individualizada para cada gen los resultados del *microarray* combinado con secuenciación automática.

En aquellas familias donde sólo se detectó una mutación mediante el *microarray*, se realizó un estudio de haplotipos siempre que hubiera disponibles muestras de familiares, y si el resultado mostró que la segregación de haplotipos era compatible con herencia autosómica recesiva y segregaba con la patología, se procedió a secuenciar todos los exones del gen con el fin de identificar una posible segunda mutación.

#### 4.1.3. Gen *AIPL1*: familias con mutación

El *microarray* de genotipado permitió identificar mutaciones en *AIPL1* en el 1,5% (2/130) de las familias estudiadas. Se identificaron dos mutaciones diferentes: un cambio *missense* y una duplicación (Tabla 4.4). El estudio familiar se llevó a cabo en ambas familias ya que se disponía de ADN de los progenitores.

Tabla 4.4. Mutaciones detectadas en el gen *AIPL1*.

Familia	Alelo 1		Referencia	Alelo 2		Referencia	EF
	Cambio nucleótido	Cambio aminoácido		Cambio nucleótido	Cambio aminoácido		
LCA-0062	c.265T>C	p.Cys89Arg	[186]	c.265T>C	p.Cys89Arg	[186]	C
LCA-0128	c.844_849dup	p.Glu282_Ala283dup	[148]	c.844_849dup	p.Glu282_Ala283dup	[148]	C

EF: Estudio familiar. C: Cosegrega.

La familia **LCA-0062**, endogámica, mostró una mutación no sinónima, en homocigosis, en el exón 2 (c.265T>C; p.Cys89Arg), previamente descrita [186]. Se realizó el análisis de segregación en la familia confirmándose que la mutación cosegregaba con la patología. El *pedigree* familiar y la segregación de la mutación se muestran en la Figura 4.2.

En el *probandus* de la familia **LCA-0128**, consanguínea, se encontró una mutación en homocigosis en el exón 6 c.844\_849dup; p.Glu282\_Ala283dup, previamente asociada a LCA. Esta variante no provoca un cambio en la pauta de lectura. La Figura 4.2 muestra el análisis familiar donde se observa que la mutación ha sido transmitida de forma recesiva segregando con el fenotipo.

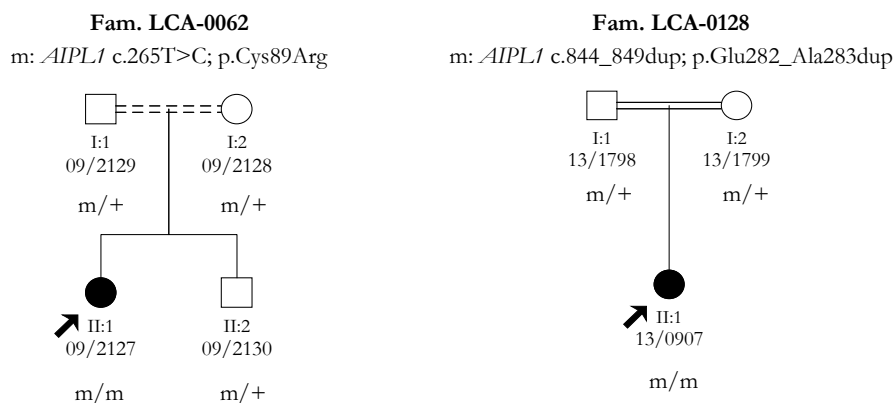


Figura 4.2. Análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen *AIPL1* (RefSeq NM\_014336). m: alelos mutados. +: alelo *wild type*.



#### 4.1.4. Gen *CEP290*: familias con mutación

En el 4,6% (6/130) de las familias estudiadas se detectó al menos un alelo mutado en el gen *CEP290*, mediante el *microarray* de genotipado. Dos familias se caracterizaron completamente mediante el *microarray*. En una familia se encontró un segundo alelo tras la secuenciación del gen completo.

El resultado final fue la identificación de seis mutaciones distintas en el gen *CEP290*, todas descritas previamente en la literatura: tres mutaciones *nonsense*, dos mutaciones *frame-shift* y una mutación de *splicing*. Cuatro de las familias presentan la mutación más frecuente en *CEP290* en pacientes con LCA, una mutación *deep intronic*, localizada en el intrón 26, que conduce a la generación de un pseudoexón. La consecuencia funcional es el truncamiento de la proteína por la generación de un codón stop prematuro (p.Cys998\*).

La segregación de las variantes se pudo realizar sólo en algunas familias debido a la falta de muestras de familiares. (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Mutaciones detectadas en el gen *CEP290*.

Familia	Alelo 1		Referencia	Alelo 2		Referencia	EF
	Cambio nucleótido	Cambio aminoácido		Cambio nucleótido	Cambio aminoácido		
LCA-0043	c.1645C>T	p.Arg549*	[156]	c.2991+1655A>G	p.Cys998*	[77]	C
LCA-0087	c.4028delA	p.Lys1343Argfs*2	[121]	c.4723A>T	p.Lys1575*	[121]	C
LCA-0126	c.2991+1655A>G	p.Cys998*	[77]	c.3310-1_3310delGCinsAA	<i>Splicing</i>	[40]	C
LCA-0066	c.2991+1655A>G	p.Cys998*	[77]	-	-	-	NF
LCA-0053	c.2991+1655A>G	p.Cys998*	[77]	?	?	-	NF
LCA-0131	c.384_387delTAGA	p.Asp128fs	[121]	?	?	-	NF

EF: Estudio familiar. C: Cosegrega. NF: No familiares.

En el caso índice de la familia **LCA-0043** se detectaron dos mutaciones en heterocigosis mediante el *microarray* de genotipado. Ambas generan un codón de parada en el exón 17 y en el intrón 26. El estudio familiar pudo confirmar que las dos mutaciones cosegregaban con la patología. (Figura 4.3)

En el afecto de la familia **LCA-0087** se encontró una mutación en heterocigosis con el *microarray* de genotipado, la variante c.4723A>T; p.Lys1575\* que genera un codón de parada en el exón 36. Posteriormente se llevó a cabo la secuenciación de todos los exones y las regiones de *splicing* del gen *CEP290*. Este estudio, realizado en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Elfride De Baere de la Universidad de Gante (Bélgica), permitió detectar una variante c.4028delA; p.Lys1343Argfs\*2 en heterocigosis, en el exón 31. Esta mutación provoca un codón de terminación, produciendo el truncamiento de la proteína CEP290. El estudio de segregación de las mutaciones se muestra en la **Figura 4.3**.

El estudio con el *microarray* de genotipado resultó positivo para el afecto de la familia **LCA-0126**. Se encontraron dos mutaciones, la mutación c.2991+1655A>G; p.Cys998\* en el intrón 26, y una indel afectando el sitio canónico de *splicing* del intrón 28, c.3310-1\_3310delGCinsAA. El análisis familiar pudo confirmar la segregación de las mutaciones (**Figura 4.3**).

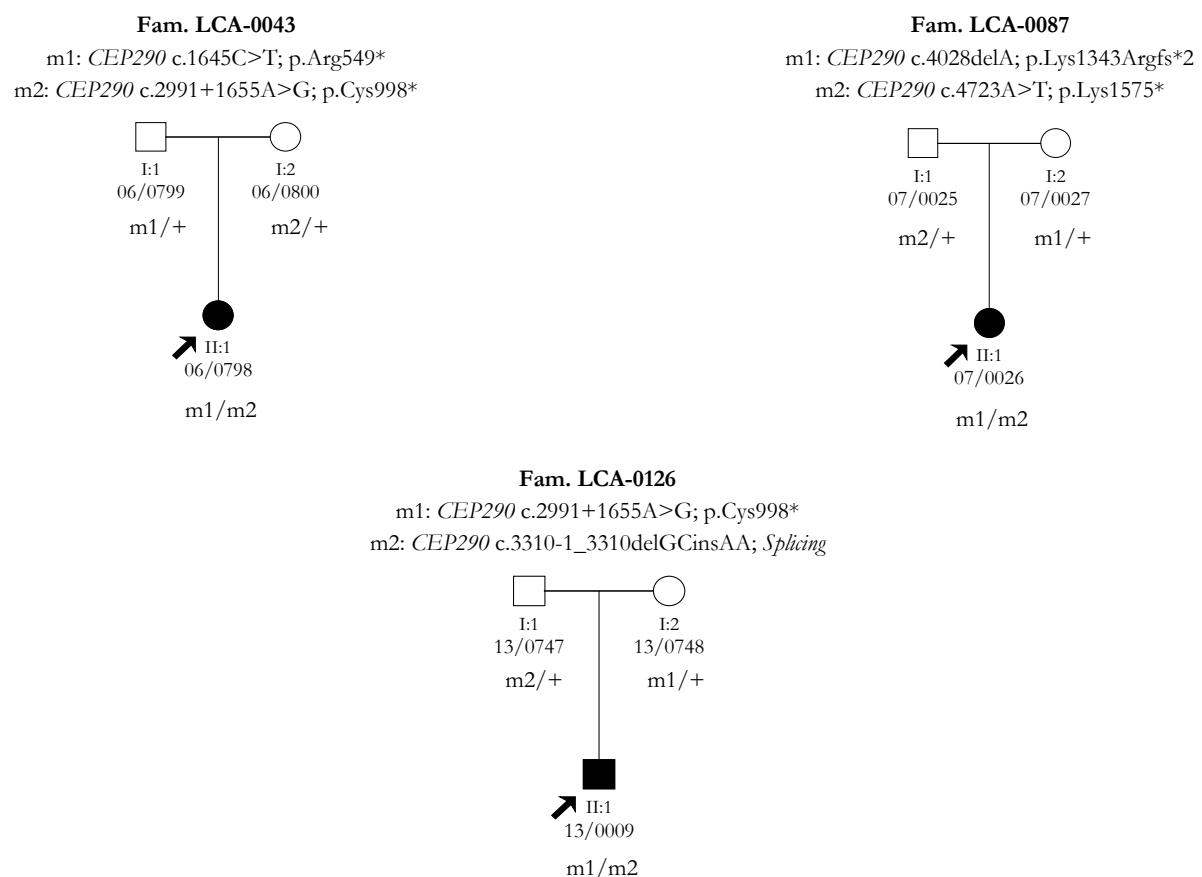
En la familia **LCA-0066** se localizaron dos variantes distintas, ambas en heterocigosis: c.2681A>G; p.Asn894Ser en el gen *CRB1*, y c.2991+1655A>G; p.Cys998\* en el gen *CEP290*. En relación con la

primera de estas variantes, la secuenciación del gen *CRB1* no identificó un segundo alelo mutado. Este dos variante se discutirá en el apartado 5.4.

En cuanto a la variante c.2991+1655A>G en el gen *CEP290*, se trata de una variante con clara patogenicidad. Sin embargo, aunque se secuenciaron los exones y regiones de *splicing* del gen *CEP290*, no se consiguió identificar una segunda mutación. En este momento se está procediendo al análisis de ARNm del paciente con el fin de identificar posibles mutaciones intrónicas que afecten al mecanismo de *splicing*. Este trabajo también se realizó en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. De Baere.

En la familia **LCA-0053** también se encontró en heterocigosis la mutación de *splicing* c.2991+1655A>G. No se pudo completar el estudio con el cribado completo del gen debido a que no fue posible la obtención de una nueva muestra por falta de colaboración de la familia.

En la familia **LCA-0131** se localizaron tres variantes distintas, todas en heterocigosis: c.971G>T; p.Arg324Leu en el gen *AIP1*, c.425A>G; p.Tyr142Cys en el gen *CRX* y c.384\_387delTAGA; p.Asp128fs en el exón 6 del gen *CEP290*. De estas tres variantes, la única con patogenicidad claramente determinada en el momento del estudio fue la correspondiente al gen *CEP290* y, por ello, esta familia se ha incluido en este apartado. Las otras variantes detectadas se discutirán en el apartado 5.4. En estos momentos, esta familia se está analizando mediante NGS para la identificación de un segundo alelo.



**Figura 4.3.** Análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen *CEP290* (RefSeq NM\_025114). m1, m2: alelos mutados. +: alelo *wild type*.

4.1.5. Gen *CRB1*: familias con mutación

Mediante el *microarray* de genotipado se detectaron mutaciones en el gen *CRB1* en el 11,5% (15/130) de las familias LCA. Tal como se indicó anteriormente, este gen es el más mutado en nuestra cohorte tras los estudios realizados con el *microarray* de LCA. Dado que este gen fue sometido a un estudio más en profundidad, sus resultados se tratarán en detalle en el apartado 4.2.

4.1.6. Gen *LCA5*: familias con mutación

Mediante el *microarray* de genotipado se detectaron mutaciones en el gen *LCA5* en el 1,5% (2/130) de las familias LCA (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Mutaciones detectadas en el gen *LCA5*.

Familia	Alelo 1		Referencia	Alelo 2		Referencia	EF
	Cambio nucleótido	Cambio aminoácido		Cambio nucleótido	Cambio aminoácido		
LCA-0057	c.103C>T	p.Arg35*	[60]	c.604T>C	p.Ser202Pro	[166]	C
LCA-0067	c.955G>A	p.Ala319Thr	[126]	c.955G>A	p.Ala319Thr	[126]	C

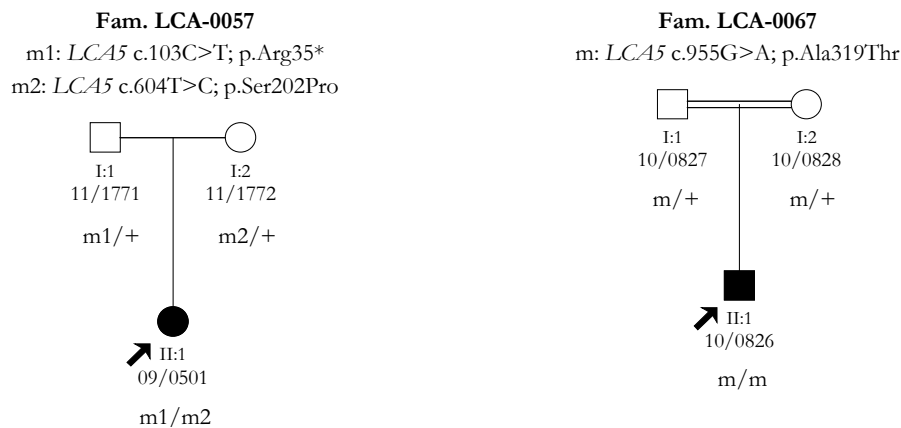
EF: Estudio familiar. C: Cosegrega.

La familia **LCA-0057** presentaba en heterocigosis la variante previamente descrita c.103C>T; p.Arg35\* en el exón 3. Tras la secuenciación de los exones y zonas de *splicing* del gen *LCA5*, se identificó un segundo alelo mutado c.604T>C; p.Ser202Pro en el exón 4 que segregaba correctamente en la familia (Figura 4.5). Esta variante había sido detectada previamente en homocigosis en otra familia de nuestra cohorte mediante mapeo de homocigosis [45]. Además, no se detectó la variante p.Ser202Pro en un estudio de 100 individuos control (200 cromosomas) mediante secuenciación automática, y un análisis *in silico* realizado con varios programas bioinformáticos (Align-GVGD: C65, PolyPhen-2: *score* 0.786, PROVEAN: *score* -2.70, SIFT: *score* 0.049) catalogó esta variante como patogénica. El cambio del residuo Serina débilmente conservado en la posición 202 de la proteína lebercilina (Figura 4.4) por Prolina conduciría a un cambio estructural en la proteína [45]. Por todo ello, se consideró que esta variante era patogénica.



Figura 4.4. Alineamiento múltiple de la secuencia de la proteína lebercilina en 23 especies. El residuo Ser202 se conserva en 19 de estas especies.

En el caso índice de la familia **LCA-0067** se encontró la variante *missense* c.955G>A; p.Ala319Thr en homocigosis. Este cambio, está localizado en el último nucleótido del exón 6 y se ha descrito que provoca una alteración del mecanismo de *splicing* [126]. Se realizó el análisis de segregación de la mutación en el resto de la familia y se confirmó que los padres eran portadores de la misma (**Figura 4.5**). Por todo ello, esta variante también se consideró como patogénica.



**Figura 4.5.** Análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen *LCA5* (RefSeq NM\_181714). m, m1, m2: alelos mutados. +: alelo *wild type*.

#### 4.1.7. Gen *MERTK*: familias con mutación

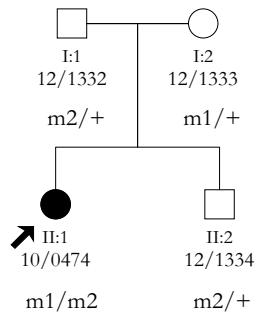
Mediante el *microarray* de genotipado, se detectó mutación en el gen *MERTK* sólo en una de las 130 familias (0,8%), la **LCA-0088**. En esta familia se identificó en heterocigosis la variante de *splicing* c.2189+1G>T en el intrón 16. El cambio estaba descrito previamente como patogénico [50, 27].

Tras la secuenciación de las regiones codificantes del gen, se detectó un segundo alelo mutado, en heterocigosis. Se trataba de una nueva variante, c.2228G>T; p.Gly743Val, en el exón 17. Este cambio no estaba reportado en la literatura, ni constaba en las bases de datos de polimorfismos. Se descartó la presencia de la variante p.Glu743Val en 50 individuos sanos (100 cromosomas). El análisis *in silico* clasificó esta variante *missense* como patogénica, habiendo un claro consenso entre todos los programas empleados (Align-GVGD: clase C65, PolyPhen-2: *score* 1.000, PROVEAN: *score* -8.67, SIFT: *score* 0). El estudio de conservación mostró que el residuo original era altamente conservado, estando presente en todas las especies analizadas (**Figura 4.6**). Las mutaciones segregaron con la patología en familia, y se confirmó que los padres eran portadores de las mismas (**Figura 4.7**). Todo esto llevó a considerar esta nueva variante como patogénica.

	p.Gly743Val					
<i>Homo sapiens</i>	A	D	F	G	L	S
<i>Pan troglodytes</i>	A	D	F	G	L	S
<i>Callithrix jacchus</i>	A	D	F	G	L	S
<i>Macaca mulata</i>	A	D	F	G	L	S
<i>Pongo abelli</i>	A	D	F	G	L	S
<i>Nomascus leucogenys</i>	A	D	F	G	L	S
<i>Bos taurus</i>	G	D	F	G	L	M
<i>Rattus norvegicus</i>	G	D	F	G	L	M
<i>Mus musculus</i>	G	D	F	G	L	M
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	A	D	F	G	L	S
<i>Canis lupus familiaris</i>	A	D	F	G	L	S
<i>Equus caballus</i>	A	D	F	G	L	S
<i>Sus scrofa</i>	A	D	F	G	L	S
<i>Monodelphis domestica</i>	A	D	F	G	L	S
<i>Meleagris gallopavo</i>	A	D	F	G	L	S
<i>Anolis carolinensis</i>	A	D	F	G	L	S
<i>Xenopus tropicalis</i>	A	D	F	G	L	S
<i>Danio rerio</i>	A	D	F	G	L	S

**Figura 4.6.** Conservación evolutiva de la nueva variante missense p.Gly743Val en la proteína MERTK y sus ortólogas en 18 especies. Un tono más oscuro indica mayor conservación evolutiva del aminoácido.

**Fam. LCA-0088**  
 m1: MERTK c.2189+1G>T; *Splicing*  
 m2: MERTK c.2228G>T; p.Gly743Val



**Figura 4.7.** Análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen MERTK (RefSeq NM\_006343). m1, m2: alelos mutados. +: alelo *wild type*.

#### 4.1.8. Gen *RDH12* familias con mutación

En el 3,1% de las familias estudiadas (4/130) se detectó al menos una mutación en el gen *RDH12* con el *microarray* de genotipado. En dos de las familias (**LCA-0089** y **LCA-0133**) se encontraron las dos mutaciones responsables de la enfermedad mediante el *microarray* (**Figura 4.8**), mientras que en las otras dos (**LCA-0031** y **LCA-0121**) el *microarray* permitió identificar sólo una mutación, y se realizaron estudios adicionales por secuenciación. (**Tabla 4.7**).

**Tabla 4.7.** Mutaciones detectadas en el gen *RDH12*.

Familia	Alelo 1		Referencia	Alelo 2		Referencia	EF
	Cambio nucleótido	Cambio aminoácido		Cambio nucleótido	Cambio aminoácido		
LCA-0031	c.146C>T	p.Thr49Met	[83]	c.806_810del	p.Ala269Glyfs*2	[83]	C
LCA-0089	c.806_810del	p.Ala269Glyfs*2	[83]	c.806_810del	p.Ala269Glyfs*2	[83]	C
LCA-0133	c.139G>A	p.Ala47Thr	[155]	c.524C>T	p.Ser175Leu	[41]	NF
LCA-0121	c.295C>A	p.Leu99Ile	[120]	?	?	-	C

EF: Estudio familiar. C: Cosegrega. NF: No familiares.

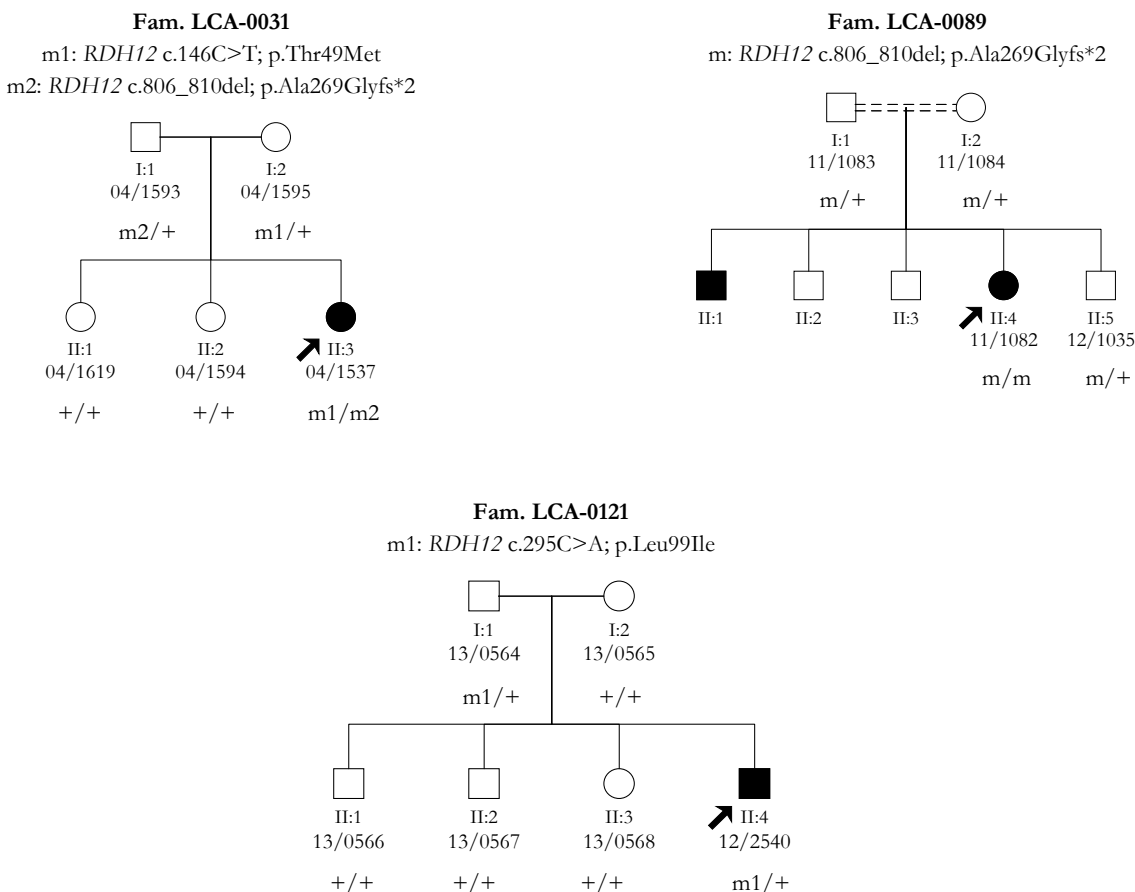
En el paciente índice de la familia **LCA-0031** sólo se detectó con el *microarray* la variante c.146C>T; p.Thr49Met en el exón 2, en heterocigosis. Tras ello, se secuenciaron por Sanger las regiones codificantes del gen, lo que reveló la presencia de un segundo alelo mutado, una delección *frameshift* en el exón 6, c.806\_810del; p.Ala269Glyfs\*2. Como se mencionó en el apdo. **4.1.2**, este cambio representa un falso negativo del *microarray* de genotipado de LCA, pues en el momento del análisis dicho cambio estaba incluido en el *microarray* y no pudo ser detectado.

En el caso índice de la familia **LCA-0089**, se encontró la variante c.806\_810del; p.Ala269Glyfs\*2 en homocigosis, en el exón 6. Esta variante provoca una delección de cinco pares de bases, lo que conlleva un cambio en la pauta de lectura. La familia LCA-0089 es una familia endogámica en la cual hay 2 afectos y tres hermanos sanos, pero en el análisis de segregación sólo pudo analizarse un hermano sano por falta de muestras de los otros hermanos.

En la familia **LCA-0133** mediante el *microarray* de genotipado se encontraron dos variantes en heterocigosis, c.139G>A; p.Ala47Thr en el exón 2 y c.524C>T; p.Ser175Leu en el exón 5.

Se realizó el estudio de segregación de las mutaciones en todas las familias, excepto en la **LCA-0133**, ya que no se disponía de muestras de ADN de los familiares. Este estudio confirmó que las mutaciones segregaban con la enfermedad. (**Figura 4.8**).

En el *probandus* de la familia **LCA-0121** el *microarray* identificó la variante c.464C>T; p.Thr155Ile en el exón 5, en heterocigosis. En estos momentos, esta familia está siendo analizada mediante NGS con el fin de identificar un segundo alelo.



**Figura 4.8.** Análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen *RDH12* (RefSeq NM\_152443). m, m1, m2: alelos mutados. +: alelo *wild type*.

#### 4.1.9. Gen *RPE65*: familias con mutación

Mediante el *microarray* de genotipado se detectó al menos una mutación en el gen *RPE65* en ocho familias. En tres familias se detectaron dos alelos mutados y en cinco familias se detectó un único alelo. Posteriormente, tras la secuenciación Sanger de dos de estas cinco familias, en ambas se identificó un segundo alelo. Las tres familias restantes están incluidas en un estudio mediante NGS que se está realizando en estos momentos, donde están siendo utilizados como controles positivos. Así pues, mediante combinación de *microarray* y secuenciación, en total se detectaron 13 mutaciones diferentes en el gen *RPE65*, en ocho de las 130 familias estudiadas (6,2%) (Tabla 4.8). En la Figura 4.11 se muestra el *pedigree* y el análisis de segregación de las mutaciones detectadas en las respectivas familias, en el caso de que este estudio haya podido ser realizado.

En el caso índice de la familia **LCA-0061** se detectaron dos variantes en heterocigosis, ambas mediante el *microarray* de genotipado. El primer cambio c.95-2A>T; *Splicing* en el exón 3 estaba descrito previamente como patogénico [67], mientras que el segundo cambio c.311G>T; p.Gly104Val en el exón 4 no estaba reportado en la literatura. Para la nueva variante encontrada se realizó un análisis *in silico* utilizando programas bioinformáticos con el fin de predecir si su efecto es patogénico. Tanto el programa Polyphen, como el programa SIFT, predijeron que p.Gly104Val es probablemente dañino, con un *score* de 1 y 0, respectivamente. También lo clasificaron así los programas PROVEAN (*score* -8.67) y Align-GVGD (clase

C65). En el estudio de conservación se vio que el residuo original estaba presente en todas las especies analizadas, por lo que era altamente conservado (**Figura 4.9**). Por otra parte, el estudio familiar confirmó que las mutaciones eran heredadas de los progenitores. Por ello, este cambio se consideró como patogénico.

**Tabla 4.8.** Mutaciones detectadas en el gen *RPE65*.

Familia	Alelo 1			Alelo 2			EF
	Cambio nucleótido	Cambio aminoácido	Referencia	Cambio nucleótido	Cambio aminoácido	Referencia	
LCA-0061	c.95-2A>T	<i>Splicing</i>	[67]	c.311G>T	p.Gly104Val	Este estudio	C
LCA-0068	c.143G>A	p.Gly48Glu	Este estudio	c.859delG	p.Val287Phefs*38	Este estudio	C
LCA-0078	c.1205G>A	p.Trp402*	[148]	c.1205G>A	p.Trp402*	[148]	NF
LCA-0080	c.370C>T	p.Arg124*	[109]	c.370C>T	p.Arg124*	[109]	C
LCA-0085	c.496-1G>A	<i>Splicing</i>	Este estudio	c.1022T>C	p.Leu341Ser	[109]	C
LCA-0084	c.11+5G>A	<i>Splicing</i>	[61]	?	?	-	C
LCA-0098	c.292_311del20	p.Ile98Hisfs*26	[96]	?	?	-	C
LCA-0103	c.370C>T	p.Arg124*	[109]	?	?	-	NF

EF: Estudio familiar. C: Cosegrega. NF: No familiares. Negrita: Variantes nuevas.

	p.Gly104Val					
<i>Homo sapiens</i>	T	E	F	G	T	C
<i>Pan troglodytes</i>	T	E	F	G	T	C
<i>Callithrix jacchus</i>	T	E	F	G	T	C
<i>Macaca mulata</i>	T	E	F	G	T	C
<i>Pongo abelli</i>	T	E	F	G	T	C
<i>Nomascus leucogenys</i>	T	E	F	G	T	C
<i>Bos taurus</i>	T	E	F	G	T	C
<i>Rattus norvegicus</i>	T	E	F	G	T	C
<i>Mus musculus</i>	T	E	F	G	T	C
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	T	E	F	G	T	C
<i>Canis lupus familiaris</i>	T	E	F	G	T	C
<i>Equus caballus</i>	T	E	F	G	T	C
<i>Sus scrofa</i>	T	E	F	G	T	C
<i>Monodelphis domestica</i>	T	E	F	G	T	C
<i>Meleagris gallopavo</i>	T	E	F	G	T	Y
<i>Anolis carolinensis</i>	T	E	F	G	T	Y
<i>Xenopus tropicalis</i>	T	E	F	G	T	F
<i>Danio rerio</i>	T	E	F	G	T	T

**Figura 4.9.** Conservación evolutiva de la nueva variante missense p.Gly48Glu en la proteína RPE65 y sus ortólogas en 18 especies. Un tono más oscuro indica mayor conservación evolutiva del aminoácido.

En el probandus **LCA-0068** se detectó una señal anómala c.859insdel en heterocigosis en el exón 9 por el *microarray* de genotipado. La secuenciación de este exón permitió verificar la presencia de una deleción que no había sido descrita previamente en la literatura. El cambio encontrado consiste en una deleción de una base G en la posición 859 (c.859delG) lo que causa un cambio en la pauta de lectura en el residuo 287 (p.Val287Phefs\*38). Posteriormente, la secuenciación del resto de exones del gen *RPE65* mostró un segundo cambio en heterocigosis en el exón 3: c.143G>A; p.Gly48Glu, que no había sido previamente descrito, consistente en el cambio de un nucleótido G por A, lo que produce un cambio de aminoácido



## Resultados

Gly por Glu en la proteína. Para evaluar la posible patogenicidad de este cambio *missense*, se analizó bioinformáticamente, siendo considerado como deletéreo por todos los programas empleados (Align-GVGD: clase C65, PolyPhen-2: *score* 1.000, PROVEAN: *score* -7.29, SIFT: *score* 0). Todas las especies ortólogas incluidas en el estudio de conservación tenían el residuo original, por lo que el residuo Gly48 está altamente conservado (**Figura 4.10**). El posterior análisis familiar permitió confirmar la correcta segregación de ambas variantes con la enfermedad según una herencia autosómica recesiva. En esta familia hay otros dos hermanos afectados, que comparten las mismas mutaciones que el *probandus*, así como una hermana sana. Todo esto hizo que se considerase como patológico este cambio.

	p.Gly48Glu						
<i>Homo sapiens</i>	C	G	P	G	L	F	E
<i>Pan troglodytes</i>	C	G	P	G	L	F	E
<i>Callithrix jacchus</i>	C	G	P	G	L	F	E
<i>Macaca mulata</i>	C	G	P	G	L	F	E
<i>Pongo abelli</i>	C	G	P	G	L	F	E
<i>Nomascus leucogenys</i>	C	G	P	G	L	F	E
<i>Bos taurus</i>	C	G	P	G	L	F	E
<i>Rattus norvegicus</i>	C	G	P	G	L	F	E
<i>Mus musculus</i>	C	G	P	G	L	F	E
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	C	G	P	G	L	F	E
<i>Canis lupus familiaris</i>	C	G	P	G	L	F	E
<i>Equus caballus</i>	C	G	P	G	L	F	E
<i>Sus scrofa</i>	C	G	P	G	L	F	E
<i>Monodelphis domestica</i>	C	G	P	G	L	F	E
<i>Meleagris gallopavo</i>	C	G	P	G	L	F	E
<i>Anolis carolinensis</i>	C	G	P	G	L	F	E
<i>Xenopus tropicalis</i>	C	G	P	G	L	F	E
<i>Danio rerio</i>	M	G	P	G	L	F	E

**Figura 4.10.** Conservación evolutiva de la nueva variante *missense* p.Gly48Glu en la proteína RPE65 y sus ortólogas en 18 especies. Un tono más oscuro indica mayor conservación evolutiva del aminoácido.

En el paciente **LCA-0078** se detectó en homocigosis la mutación c.1205G>A; p.Trp402\* en el exón 11. El estudio de segregación de la mutación no se pudo realizar, ya que no se disponía de muestras de los familiares.

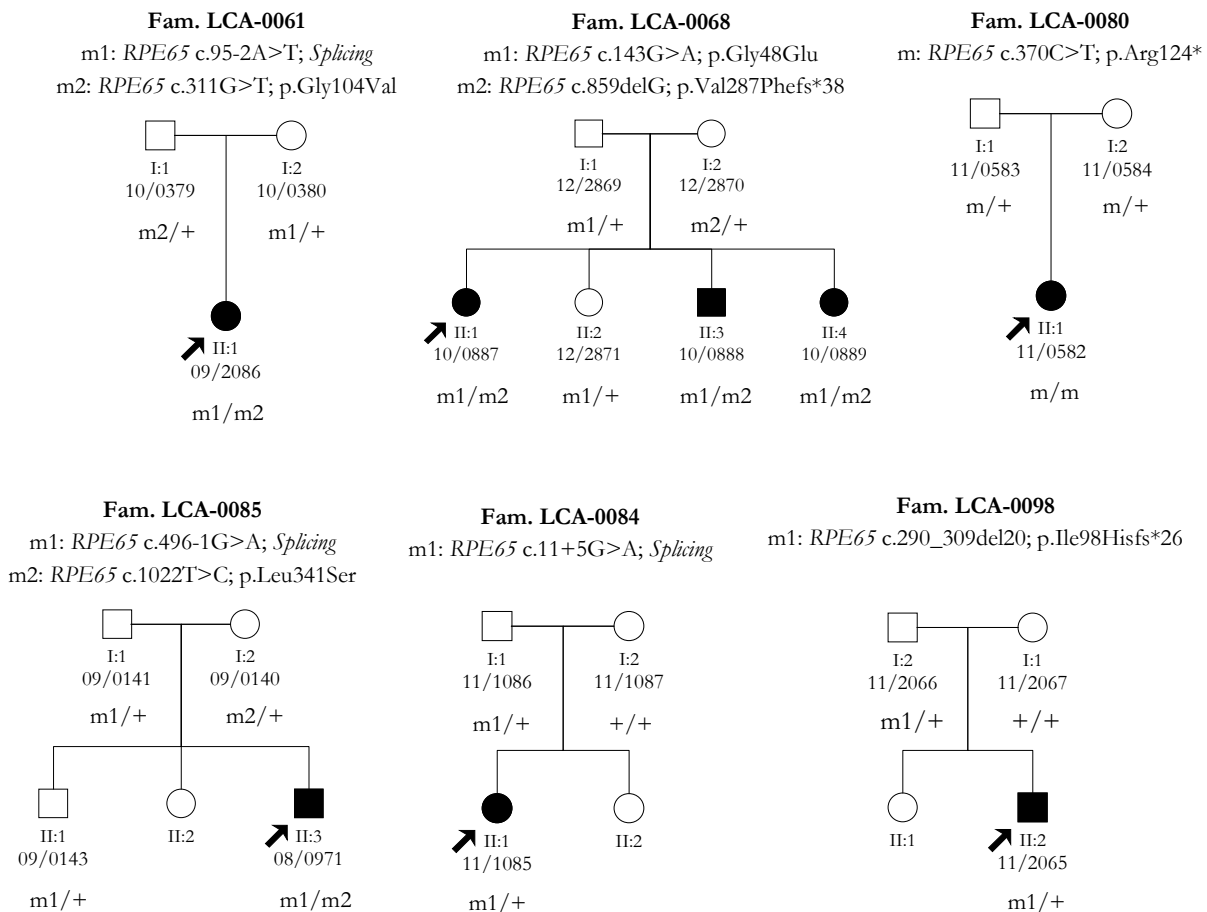
El paciente índice de la familia **LCA-0080** presentaba en homocigosis el cambio *nonsense* c.370C>T; p.Arg124\* en el exón 5. El estudio de segregación mostró que la variante segregaba con la enfermedad.

En la familia **LCA-0085** se detectó en heterocigosis la mutación c.1022T>C; p.Leu341Ser en el exón 10. Esta mutación estaba descrita previamente como patológica [109]. Posteriormente, la secuenciación del gen *RPE65* mostró una nueva variante c.496-1G>A en heterocigosis en el exón 6. Este cambio se localiza en un sitio conservado de la zona aceptora de corte y empalme de exones del intrón 6. El estudio familiar reveló que cada una de las mutaciones identificadas provenía de un progenitor distinto.

La familia **LCA-0084** presentaba en heterocigosis la mutación de *splicing* c.11+5G>A en el intrón 1, de origen paterno. En estos momentos, esta familia se está analizando mediante NGS para la identificación de un segundo alelo.

En el caso índice de la familia **LCA-0098** se identificó en heterocigosis la mutación c.290\_309del20; p.Ile98Hisfs\*26 en el exón 4, heredada del padre portador. Este cambio produce un desplazamiento en el marco de lectura (*frame-shift*). En estos momentos, esta familia se está analizando mediante NGS para la identificación de un segundo alelo.

En la familia **LCA-0103**, se identificó en heterocigosis la mutación c.370C>T; p.Arg124\* en el exón 5. En estos momentos, esta familia se está analizando mediante NGS para la identificación de un segundo alelo.



**Figura 4.11.** Análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen RPE65 (RefSeq NM\_000329). m, m1, m2: alelos mutados. +: alelo *wild type*.

4.1.10. Gen *RPGRIP1*: familias con mutación

En dos de las 130 familias LCA (1,5%) se detectó mutación en el gen *RPGRIP1* mediante el *microarray* de genotipado. En la familia **LCA-0029**, como parte de un estudio previo [164], se detectó en heterocigosis el cambio no sinónimo c.2435G>A; p.Arg812Gln en el exón 16. En el presente estudio se continuó con el análisis de esta familia, y en concreto, se realizó un estudio indirecto mediante microsatélites, que reveló que el gen *RPGRIP1* no era el gen responsable de la enfermedad, ya que el individuo afecto y uno de sus hermanos sanos compartían los mismos haplotipos (**Figura 4.12**). Sin embargo, se pudo localizar otro alelo mutado en el gen *NMNAT1*, como se expone en el apdo. 4.3.2. En estos momentos, esta familia se está analizando mediante NGS para la identificación de un segundo alelo.

En el *probandus* de la familia **LCA-0100** se encontró la variante c.3402\_3404delGTC; p.Met1134\_Ser1135delinsIle en uno de sus alelos mediante el *microarray* de genotipado. En este trabajo no se pudo finalizar el cribado de *RPGRIP1*, que está siendo llevado a cabo mediante NGS.

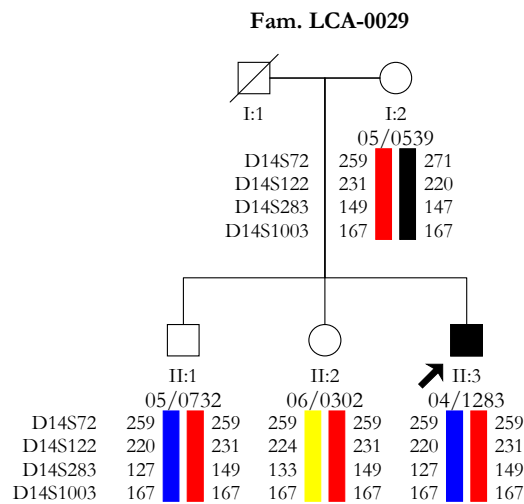


Figura 4.12. Estudio de cosegregación del gen *RPGRIP1* en la familia LCA-0029.

## 4.2. ESTUDIO MUTACIONAL DEL GEN *CRB1*

Como se expuso anteriormente, uno de los objetivos principales de este trabajo fue la realización de un estudio más amplio y detallado de la prevalencia de las mutaciones en el gen *CRB1* en la población española. La principal razón para centrarnos en este estudio fue la identificación de una elevada prevalencia de mutaciones en estudios anteriores.

Así, *CRB1* resultó el gen más mutado en la cohorte de pacientes con sospecha de LCA (16% [164]), y el segundo más mutado en una cohorte de pacientes de RP-IP (<3% [12]).

Se estudiaron tanto las 130 familias LCA que conforman la cohorte de base de este trabajo, como 290 familias RP-IP, haciendo un total de 420 familias. Para ello, se emplearon tanto técnicas directas para análisis de mutaciones (*microarray* de genotipado de mutaciones conocidas, secuenciación directa y HRM), como indirectas para construcción de haplotipos (utilizando STR) y mapeo de homocigosidad (utilizando *arrays* de SNP).

#### 4.2.1. Estudios previos

Dentro de los resultados expuestos a continuación, se incluyen familias que formaron parte de las cohortes de estudios previos ([21, 164, 12]; y tesis en preparación Cantalapiedra, 2015). Esto se ha realizado con el fin de que la cohorte del estudio sea lo más amplia y representativa posible.

Además, es conveniente mencionar que la técnica dHPLC (*denaturing high-performance liquid chromatography*), a la que se hace referencia en los apartados 4.2.3 y 4.2.9 se aplicó en el estudio de Vallespín, 2008 [164], mientras que la técnica SSCP (*single-strand conformation polymorphism*), a la que se hace referencia en el apartado 4.2.9 se aplicó en el estudio de Bernal *et al.*, 2003 [21]. Para más detalles sobre estas técnicas, consúltense las referencias indicadas.

#### 4.2.2. Hallazgos genéticos empleando el *microarray* de genotipado APEX como primera herramienta

Inicialmente, todos los 420 casos índice tanto de la cohorte LCA como de la cohorte RP-IP fueron analizados en busca de mutaciones conocidas empleando los chips de LCA o ARRP. De esta manera, se identificaron mutaciones en el 8,8% de las familias (37/420) (véanse **Tabla 4.9** y **Tabla 4.10**). Todas estas mutaciones fueron confirmadas mediante secuenciación directa.

En el 3,6% (15/420) de los casos, se identificaron dos alelos patogénicos en *CRB1*, ya sea en homocigosis o en heterocigosis compuesta (ver **Tabla 4.9** y **Tabla 4.10**). De estos casos, en aquellos en los que se dispuso de muestras de los familiares, se realizó el análisis de segregación, el cual mostró que todas las mutaciones cosegregaban con la enfermedad (ver **Figura 4.13-Figura 4.15**).

Para el caso de la presencia de un solo alelo mutado se identificaron 22 pacientes portadores de una mutación conocida en heterocigosis, excepto la familia **RP-1440**. En este caso se encontró una nueva variante en heterocigosis, y más concretamente la inserción c.3878+2insT en el exón 10, que primero se detectó como una señal anómala (c.3878+2) en el *microarray* de genotipado de ARRP y fue comprobada por secuenciación directa. Se trata de una mutación en sitio de *splicing* para la cual el programa HSF predice un efecto de desactivación del sitio original y una activación de un sitio de *splicing* críptico.

Además de estas mutaciones, se detectaron otros cambios, que se incluyen en la **Tabla 4.3** y la **Tabla 4.13** y cuya patogenicidad se discutirá en el apartado **5.4.1**. Entre ellas, en la familia **LCA-0034**, se observó una señal anómala (c.2612TG>CA), que ya fue mencionada en el apartado **4.1** y que probablemente se trate de una variante rara no patogénica.

### **4.2.3. Estudios adicionales en pacientes con un sólo alelo mutado detectado por el *microarray*.**

En 20 de los 22 pacientes con sólo un alelo mutado se pudo encontrar un segundo alelo patogénico tras el análisis de haplotipos en familias informativas y el análisis de toda la región codificante del *CRB1* mediante dHPLC (6 pacientes), HRM (5 pacientes, véase apartado **4.2.5**) y/o secuenciación Sanger (9 pacientes). En todos aquellos casos para los que se disponía de ADN de familiares (17/20 familias), el análisis de segregación resultó compatible con herencia autosómica recesiva (**Figura 4.13-Figura 4.15**).

En los dos pacientes donde el análisis por las técnicas expuestas más arriba no detectó una segunda mutación, se empleó la técnica MLPA, con el fin de descartar grandes deleciones o duplicaciones. Se usó el *kit* SALSA MLPA KIT P221 LCA mix-1, que contiene sondas para 11 de los 12 exones del gen *CRB1*, careciendo de sonda para el exon 11, y teniendo dos sondas independientes para los exones 6 y 9. Sin embargo, mediante esta técnica no se detectaron reordenamientos/variaciones en el número de copias (CNV) en ningún caso.

Así pues, finalmente hubo dos pacientes portadores de alelos deletéreos previamente descritos (p.Ala161Glyfs\*8 en **RP-0091** y p.Ile205Aspfs\*13 en **RP-1311**) y en los que no se detectó un segundo alelo mutado. Es de reseñar que en estos casos no se puede descartar la presencia de un segundo alelo en regiones reguladoras o intrónicas, debido a las limitaciones de las técnicas usadas en este estudio.

### **4.2.4. Estudios indirectos en familias LCA y RP-IP con resultados negativos**

En unas 100 familias en las que inicialmente tras el estudio del *microarray* de genotipado no se detectó ningún alelo mutado, se realizaron posteriormente estudios indirectos, con el fin de determinar si *CRB1* podría ser el gen responsable de la patología, utilizando tanto estudios de haplotipos con microsatélites como mapeo de homocigosidad mediante análisis de SNP del genoma completo. En 80 familias se pudo descartar *CRB1* mediante estudios de segregación con STRs (tesis doctoral en preparación Cantalapedra, 2015).

En 66 familias estudiadas mediante mapeo de homocigosidad, se identificó una familia con antecedentes de endogamia, **LCA-0017**, en la que dos hermanos afectados compartían una región homocigota de 5 Mb, en 1q31.3-1q32.1, que alberga el *locus* RP12. La secuenciación directa del gen *CRB1* en estos dos sujetos reveló la presencia de la mutación *nonsense* en homocigosis p.Lys801\*, mutación que segregaba con la enfermedad en esta familia (**Tabla 4.9, Figura 4.13**). Esta mutación había sido descrita con anterioridad [73] y estaba incorporada en el *microarray* en el momento del análisis previamente efectuado, por lo que representa un falso negativo de esta herramienta.

Otras tres familias mostraron homocigosidad en el *locus* RP12, pero la secuenciación Sanger del gen *CRB1* no identificó mutaciones para ninguna de estas familias.

**Tabla 4.9.** Familias LCA con mutaciones detectadas en el gen CRB1.

Familia	Exón	Alelo 1		Referencia	Exón	Alelo 2		Referencia	EF	Métodos
		Cambio nucleótido	Cambio aminoácido			Cambio nucleótido	Cambio aminoácido			
LCA-0004 <sup>v</sup>	8	c.2688T>A	p.Cys896*	[67]	9	c.2843G>A	p.Cys948Tyr	[72]	C	chip
LCA-0010 <sup>v</sup>	2	<b>c.481dupG</b>	<b>p.Ala161Glyfs*8</b>	[21]	2	<b>c.481dupG</b>	<b>p.Ala161Glyfs*8</b>	[21]	C	chip
LCA-0011 <sup>v</sup>	7	<b>c.2244_47delATC</b>	<b>p.Ser749del</b>	[21]	9	c.2843G>A	p.Cys948Tyr	[72]	C	chip
LCA-0028 <sup>v</sup>	9	c.2843G>A	p.Cys948Tyr	[72]	9	<b>c.3299T&gt;C</b>	<b>p.Ile1100Thr</b>	[21]	C	chip
LCA-0050	9	c.2843G>A	p.Cys948Tyr	[72]	9	c.2843G>A	p.Cys948Tyr	[72]	C	chip
LCA-0051	2	c.613_619del	p.Ile205Aspfs*13	[97]	9	c.2843G>A	p.Cys948Tyr	[72]	C	chip
LCA-0063	2	c.613_619del	p.Ile205Aspfs*13	[97]	11	c.4005+1G>A	<i>Splicing</i>	[67]	C	chip
LCA-0099	6	<b>c.1690G&gt;T</b>	<b>p.Asp564Tyr</b>	[161]	8	c.2688T>A	p.Cys896*	[67]	C	chip
LCA-0123	2	c.613_619del	p.Ile205Aspfs*13	[97]	6	<b>c.1690G&gt;T</b>	<b>p.Asp564Tyr</b>	[161]	C	chip
LCA-0019 <sup>v</sup>	2	c.613_619del	p.Ile205Aspfs*13	[97]	7	<b>c.2227delG</b>	<b>p.Val743Serfs*11</b>	[162]	C	chip + dHPLC
LCA-0038a <sup>v</sup>	8	c.2688T>A	p.Cys896*	[67]	9	<b>c.3002T&gt;A</b>	<b>p.Ile1001Asn</b>	[161]	C	chip + dHPLC
LCA-0027 <sup>v</sup>	9	c.2843G>A	p.Cys948Tyr	[72]	11	<b>c.3988G&gt;T</b>	<b>p.Glu1330*</b>	[160]	C	chip + sec
LCA-0032 <sup>v</sup>	6	<b>c.1604T&gt;C</b>	<b>p.Leu535Pro</b>	[161]	9	c.2843G>A	p.Cys948Tyr	[72]	C	chip + sec
LCA-0122	7	<b>c.2549G&gt;T</b>	<b>p.Gly850Val</b>	<b>Este estudio</b>	11	c.4005+1G>A	<i>Splicing</i>	[67]	C	chip + sec
LCA-0017	7	c.2401A>T	p.Lys801*	[73]	7	c.2401A>T	p.Lys801*	[73]	C	mapeo de homocigosidad
LCA-0060	7	<b>c.2309G&gt;T</b>	<b>p.Gly770Val</b>	<b>Este estudio</b>	8	<b>c.2805dupA</b>	<b>p.His935Glnfs*13</b>	<b>Este estudio</b>	C	HRM
LCA-0101	9	<b>c.3152G&gt;A</b>	<b>p.Trp1051*</b>	<b>Este estudio</b>	11	<b>c.4000delG</b>	<b>p.Val1334Trpfs*7</b>	<b>Este estudio</b>	C	sec
RP-0069a <sup>β</sup>	9	c.2843G>A	p.Cys948Tyr	[72]	9	c.2843G>A	p.Cys948Tyr	[72]	C	SSCP

β: Familias caracterizadas mediante SSCP por Bernal *et al.*, 2003 [21]. v: Familias caracterizadas por Vallespín, 2008 [164]. EF: Estudio familiar. C: Cosegrega. Negrita: Variantes nuevas detectadas en este estudio y variantes que se han descrito por primera vez en población española.

**Tabla 4.10.** Familias RP-IP con mutaciones detectadas en el gen *CRB1*.

Familia	Exón	Alelo 1		Referencia	Exón	Alelo 2		Referencia	EF	Métodos
		Cambio nucleótido	Cambio aminoácido			Cambio nucleótido	Cambio aminoácido			
RP-0025 <sup>v</sup>	9	<b>c.3299T&gt;C</b>	<b>p.Ile1100Thr</b>	[21]	9	<b>c.3299T&gt;C</b>	<b>p.Ile1100Thr</b>	[21]	NF	chip
RP-1212	9	<b>c.3299T&gt;C</b>	<b>p.Ile1100Thr</b>	[21]	9	<b>c.3299T&gt;C</b>	<b>p.Ile1100Thr</b>	[21]	NF	chip
RP-1586	7	c.2234C>T	p.Thr745Met	[72]	7	c.2234C>T	p.Thr745Met	[72]	C	chip
RP-1779	7	c.2290C>T	p.Arg764Cys	[72]	9	<b>c.3299T&gt;C</b>	<b>p.Ile1100Thr</b>	[21]	NF	chip
MD-0092a	9	c.2843G>A	p.Cys948Tyr	[72]	9	c.2843G>A	p.Cys948Tyr	[72]	C	chip
MD-0643	7	c.2234C>T	p.Thr745Met	[72]	9	c.2843G>A	p.Cys948Tyr	[72]	C	chip
RP-0243	2	<b>c.498_506del</b>	<b>p.Ile167_Gly169del</b>	[159]	8	c.2688T>A	p.Cys896*	[67]	NF	chip + dHPLC
RP-0280 <sup>v</sup>	7	<b>c.2465G&gt;A</b>	<b>p.Trp822*</b>	[161]	9	c.2843G>A	p.Cys948Tyr	[72]	C	chip + dHPLC
RP-0487	7	c.2290C>T	p.Arg764Cys	[72]	11	<b>c.3988G&gt;T</b>	<b>p.Glu1330*</b>	[160]	NF	chip + dHPLC
RP-0561 <sup>α</sup>	7	c.2234C>T	p.Thr745Met	[72]	11	<b>c.3988G&gt;T</b>	<b>p.Glu1330*</b>	[160]	C	chip + dHPLC
RP-0745	2	<b>c.498_506del</b>	<b>p.Ile167_Gly169del</b>	[159]	7	c.2290C>T	p.Arg764Cys	[72]	C	chip + HRM
RP-1440	10	<b>c.3878+2insT</b>	<i>Splicing</i>	<b>Este estudio</b>	8	<b>c.2696G&gt;C</b>	<b>p.Gly899Ala</b>	<b>Este estudio</b>	C	chip + HRM
RP-1625	9	c.2843G>A	p.Cys948Tyr	[72]	9	<b>c.3157A&gt;G</b>	<b>p.Met1053Val</b>	<b>Este estudio</b>	C	chip + HRM
MD-0092b	2	<b>c.498_506del</b>	<b>p.Ile167_Gly169del</b>	[159]	9	c.2843G>A	p.Cys948Tyr	[72]	C	chip + HRM
MD-0351	9	c.2843G>A	p.Cys948Tyr	[72]	9	<b>c.3157A&gt;G</b>	<b>p.Met1053Val</b>	<b>Este estudio</b>	C	chip + HRM
RP-0091	2	<b>c.481dupG</b>	<b>p.Ala161Glyfs*8</b>	[21]	-	-	-	-	NR	chip + sec
RP-1017	7	c.2234C>T	p.Thr745Met	[72]	7	<b>c.2416G&gt;T</b>	<b>p.Glu806*</b>	<b>Este estudio</b>	C	chip + sec

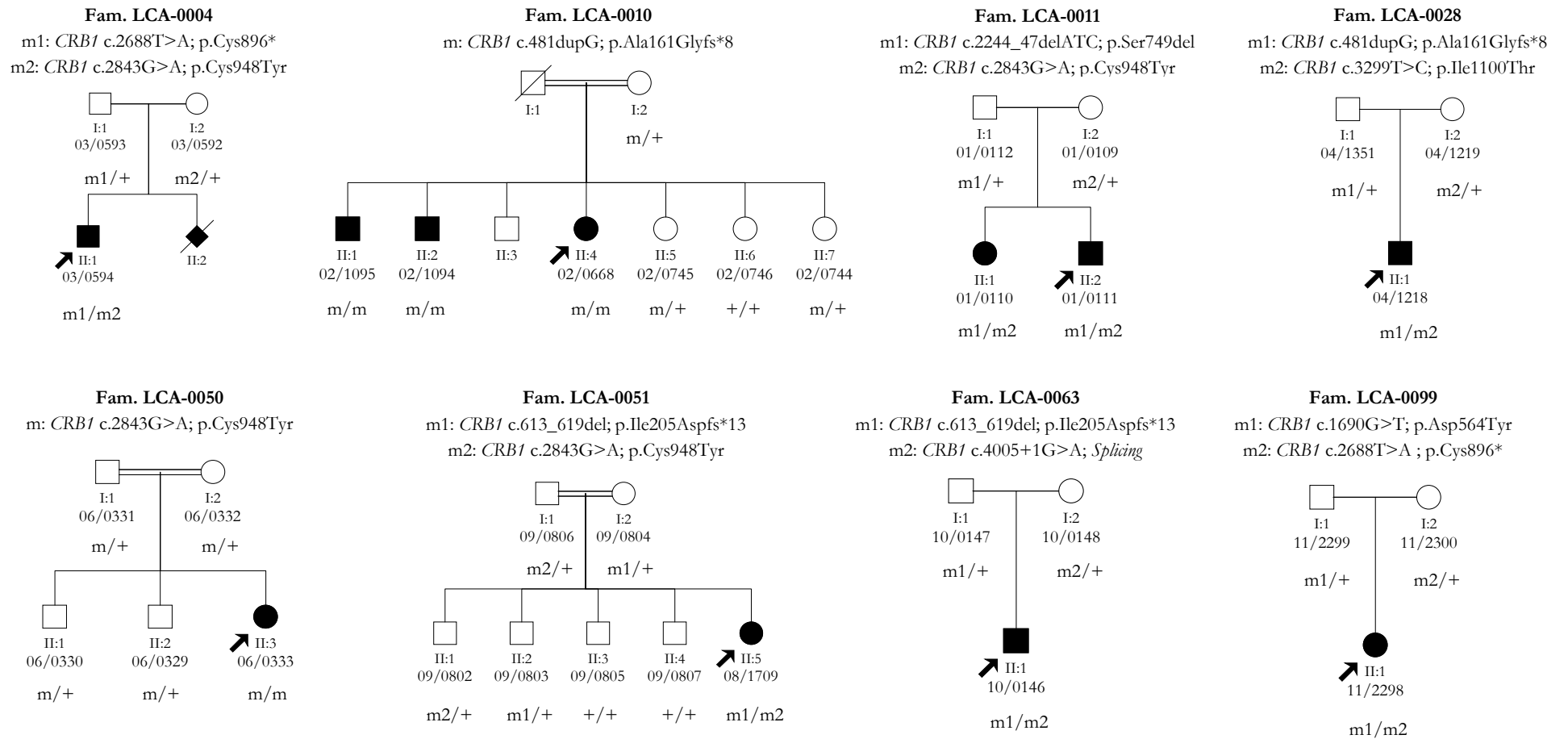
<sup>α</sup>: Familias caracterizadas por Ávila Fernández, 2011 [12]. <sup>v</sup>: Familias caracterizadas por Vallespín, 2008 [164]. EF: Estudio familiar. C: Cosegrega. NF: No familiares. Negrita: Variantes nuevas detectadas en este estudio y variantes que se han descrito por primera vez en población española..



**Tabla 4.10. (Continuación).** Familias RP-IP con mutaciones detectadas en el gen CRB1.

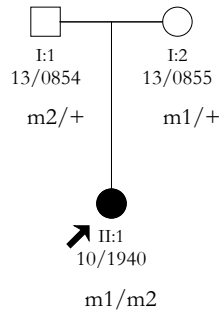
Familia	Exón	Alelo 1		Referencia	Exón	Alelo 2		Referencia	EF	Métodos
		Cambio nucleótido	Cambio aminoácido			Cambio nucleótido	Cambio aminoácido			
RP-1311	2	c.613_619del	p.Ile205Aspfs*13	[97]	-	-	-	-	NF	chip + sec
RP-1535	6	<b>c.1690G&gt;T</b>	<b>p.Asp564Tyr</b>	[161]	9	<b>c.3014A&gt;T</b>	<b>p.Asp1005Val</b>	<b>Este estudio</b>	C	chip + sec
RP-1611	2	<b>c.498_506del</b>	<b>p.Ile167_Gly169del</b>	[159]	5	<b>c.1147_1156del</b>	<b>p.Cys383Serfs*66</b>	<b>Este estudio</b>	C	chip + sec
RP-1558	9	c.2843G>A	p.Cys948Tyr	[72]	9	<b>c.3607G&gt;T</b>	<b>p.Glu1203*</b>	<b>Este estudio</b>	C	chip + sec
RP-1615	9	<b>c.3299T&gt;C</b>	<b>p.Ile1100Thr</b>	[21]	9	<b>c.3749+1_3749+2delGT</b>	<i>Splicing</i>	<b>Este estudio</b>	C	chip + sec
RP-2004	2	<b>c.498_506del</b>	<b>p.Ile167_Gly169del</b>	[159]	7	c.2234C>T	p.Thr745Met	[72]	NF	chip + sec
RP-1504	6	<b>c.1702C&gt;T</b>	<b>p.His568Tyr</b>	<b>Este estudio</b>	12	c.4142C>T	p.Pro1381Leu	[70]	NF	HRM + sec
LCA-0038b <sup>v</sup>	6	<b>c.1690G&gt;T</b>	<b>p.Asp564Tyr</b>	[161]	9	<b>c.3002T&gt;A</b>	<b>p.Ile1001Asn</b>	[161]	C	sec
LCA-0038c <sup>v</sup>	9	<b>c.3002T&gt;A</b>	<b>p.Ile1001Asn</b>	[161]	9	<b>c.3482A&gt;G</b>	<b>p.Tyr1161Cys</b>	[165]	C	sec
RP-1689	7	<b>c.2291G&gt;A</b>	<b>p.Arg764His</b>	<b>Este estudio</b>	12	<b>c.4168C&gt;T</b>	<b>p.Arg1390*</b>	<b>Este estudio</b>	NF	sec
RP-0069b <sup>β</sup>	9	c.2843G>A	p.Cys948Tyr	[72]	9	<b>c.3299T&gt;C</b>	<b>p.Ile1100Thr</b>	[21]	C	SSCP

α: Familias caracterizadas por Ávila Fernández, 2011 [12]. v: Familias caracterizadas por Vallespín, 2008 [164]. EF: Estudio familiar. C: Cosegrega. NF: No familiares. Negrita: Variantes nuevas detectadas en este estudio y variantes que se han descrito por primera vez en población española.

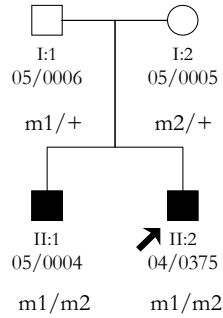


**Figura 4.13.** Pedigrees de las familias LCA aracterizadas y análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen *CRB1* (RefSeq NM\_201253). m, m1, m2: alelos mutados. +: alelo *wild type*.

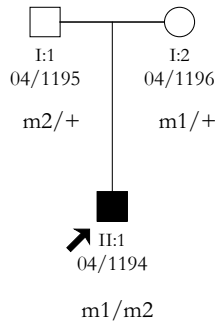
**Fam. LCA-0123**  
 m1: *CRB1* c.613\_619del; p.Ile205Aspfs\*13  
 m2: *CRB1* c.1690G>T; p.Asp564Tyr



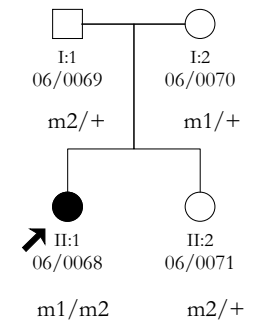
**Fam. LCA-0019**  
 m1: *CRB1* c.613\_619del; p.Ile205Aspfs\*13  
 m2: *CRB1* c.2227delG; p.Val743Serfs\*11



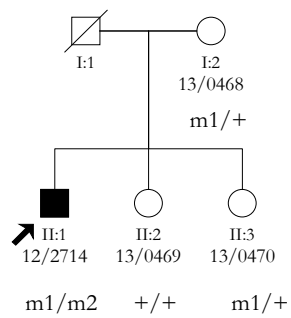
**Fam. LCA-0027**  
 m1: *CRB1* c.2843G>A; p.Cys948Tyr  
 m2: *CRB1* c.3988G>T; p.Glu1330\*



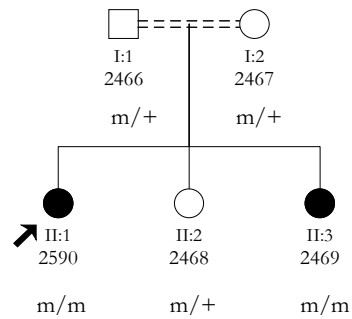
**Fam. LCA-0032**  
 m1: *CRB1* c.1604T>C; p.Leu535Pro  
 m2: *CRB1* c.2843G>A; p.Cys948Tyr



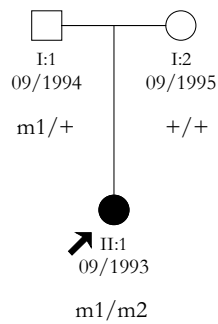
**Fam. LCA-0122**  
 m1: *CRB1* c.2549G>T; p.Gly850Val  
 m2: *CRB1* c.4005+1G>A; *Splicing*



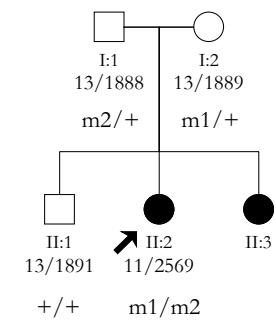
**Fam. LCA-0017**  
 m: *CRB1* c.2401A>T; p.Lys801\*



**Fam. LCA-0060**  
 m1: *CRB1* c.2309G>T; p.Gly770Val  
 m2: *CRB1* c.2805dupA; p.His935Glnfs\*13



**Fam. LCA-0101**  
 m1: *CRB1* c.3152G>A; p.Trp1051\*  
 m2: *CRB1* c.4000delG; p.Val1334Trpfs\*7



**Figura 4.13. (Continuación).** Pedigrees de las familias LCA caracterizadas y análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen *CRB1* (RefSeq NM\_201253). m, m1, m2: alelos mutados. +: alelo *wild type*.

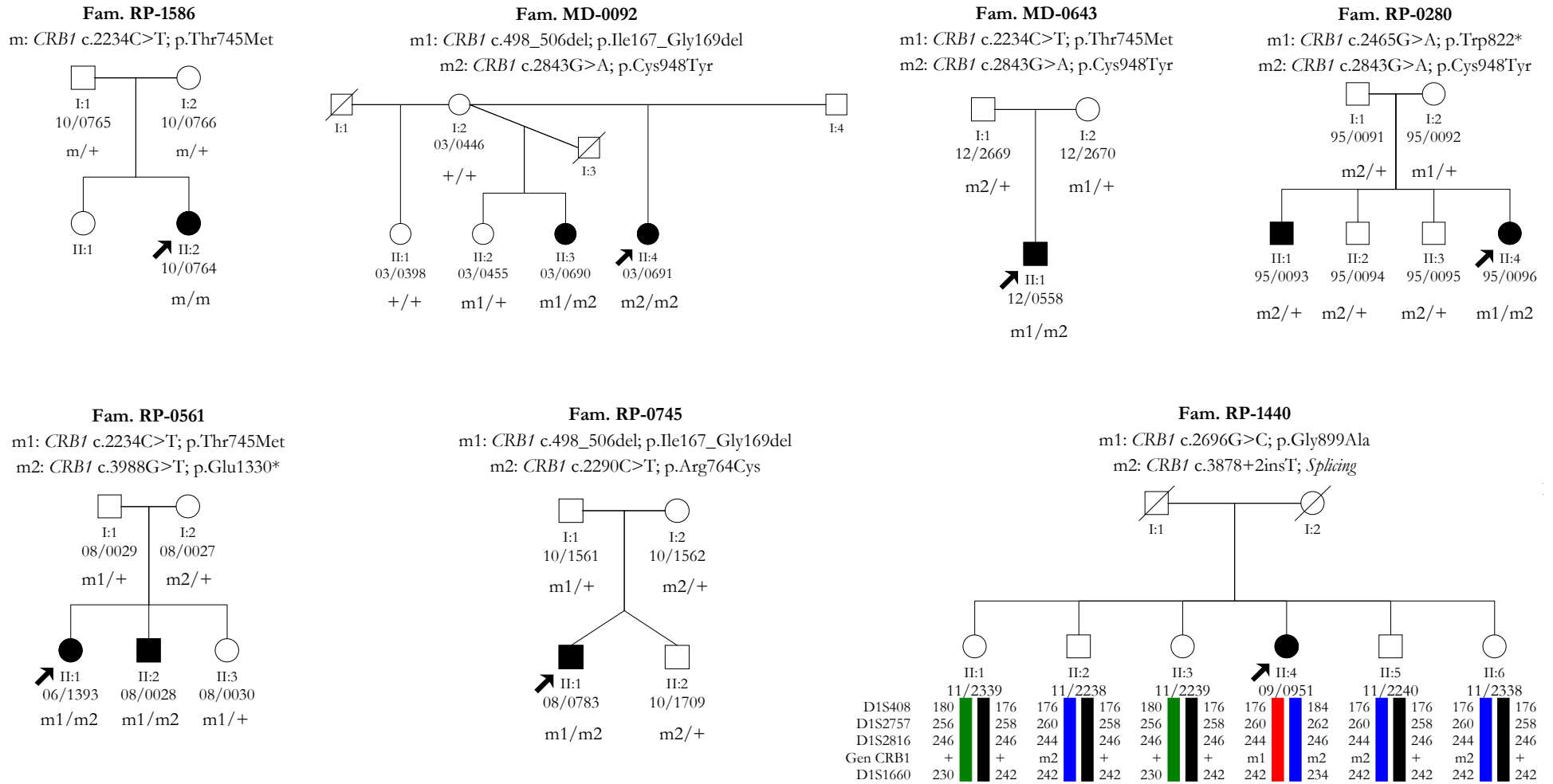
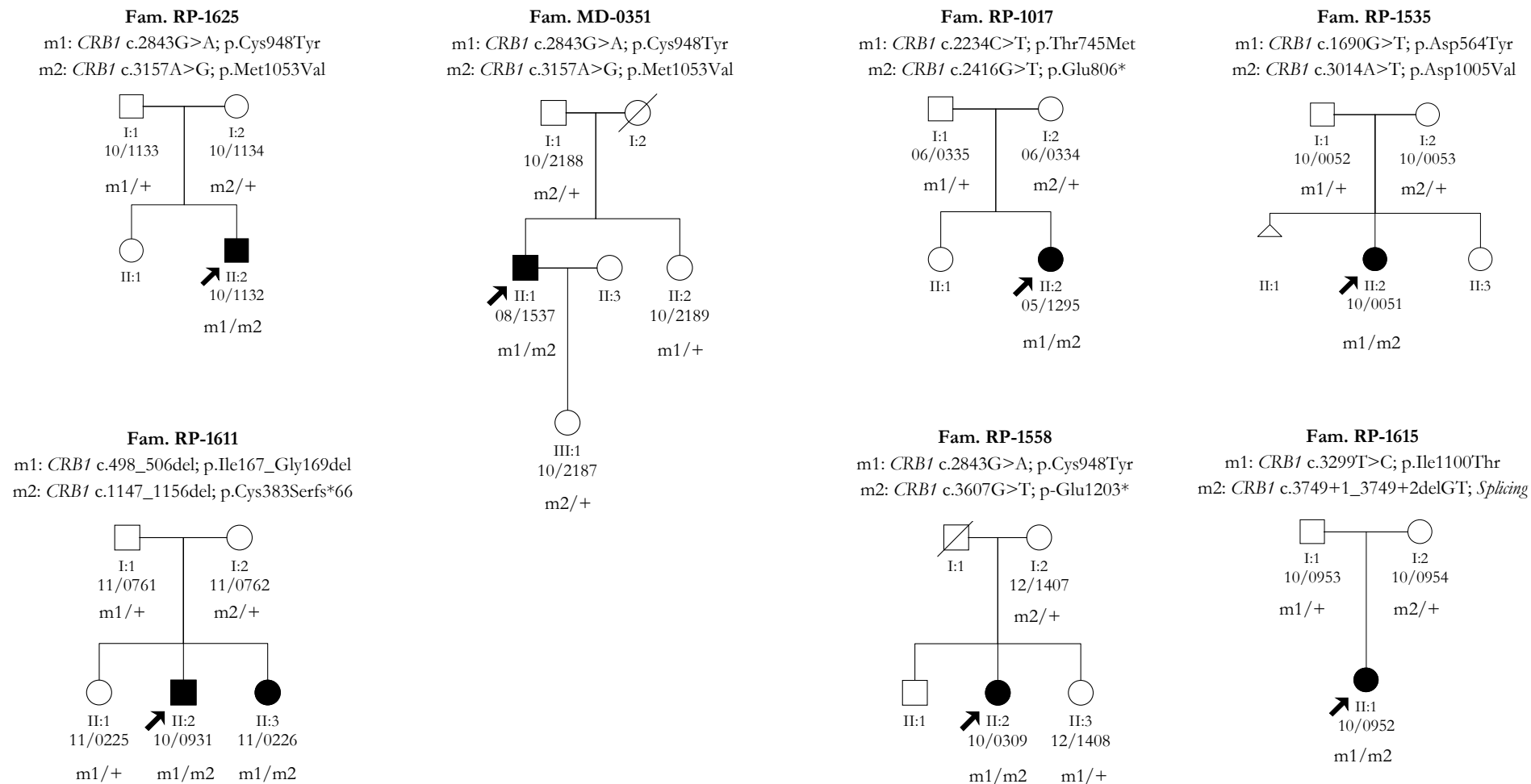
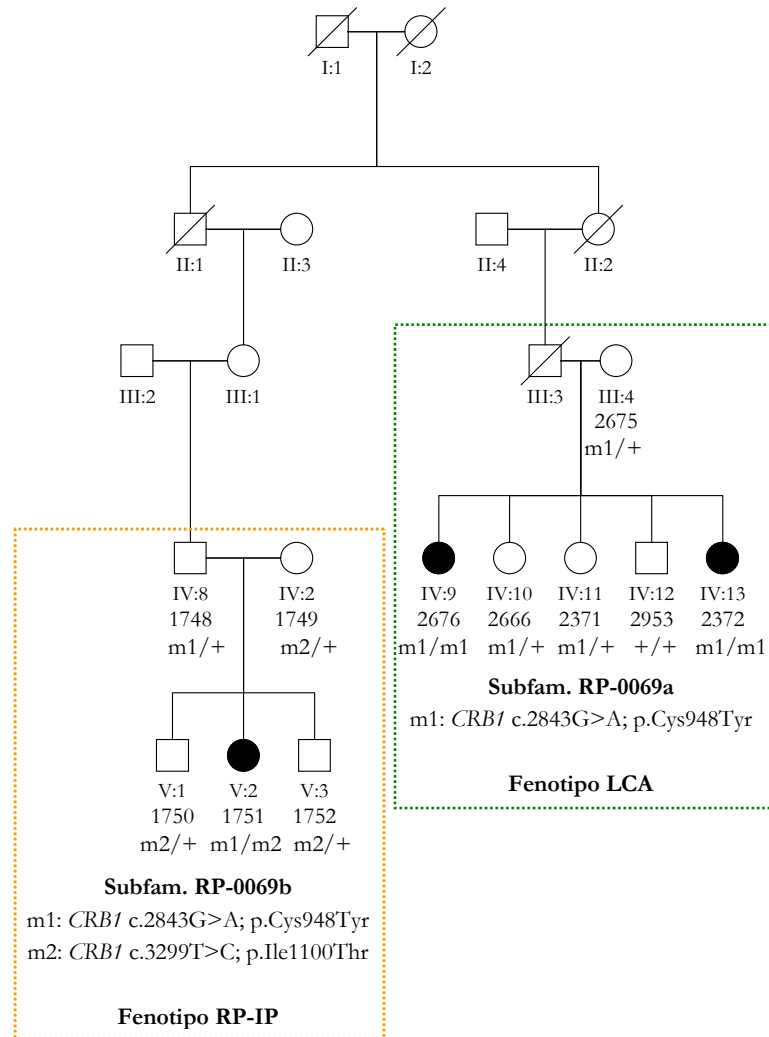


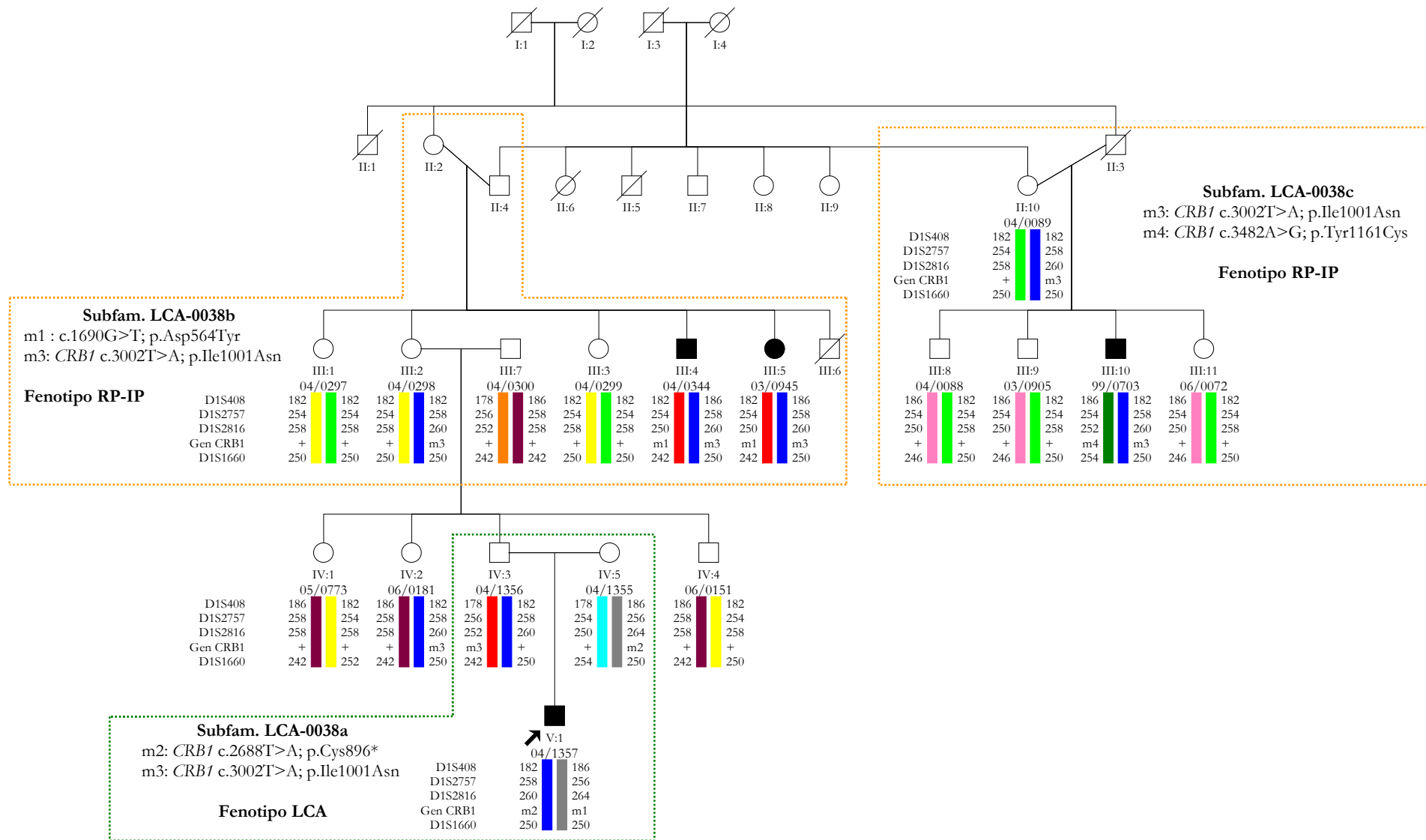
Figura 4.14. Pedigrees de las familias RP-IP caracterizadas y análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen *CRB1* (RefSeq NM\_201253). m, m1, m2: alelos mutados. +: alelo *wild type*.



**Figura 4.14. (Continuación).** Pedigrees de las familias RP-IP caracterizadas y análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen *CRB1* (RefSeq NM\_201253). m, m1, m2: alelos mutados. +: alelo *wild type*.



**Figura 4.15.** Pedigrees de las familias con fenotipos LCA y RP-IP caracterizadas y análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen *CRB1* (RefSeq NM\_201253). m1, m2: alelos mutados. +: alelo wild type.



**Figura 4.15. (Continuación).** Pedigrees de las familias con fenotipos LCA y RP-IP caracterizadas y análisis de segregación de las mutaciones detectadas en el gen *CRB1* (RefSeq NM\_201253). m1, m2, m3, m4: alelos mutados. +: alelo *wild type*.

### 4.2.5. Estudio mutacional del gen *CRB1* mediante HRM en pacientes españoles

Tras ser empleada con éxito en un estudio con una gran cohorte [168], y dadas las ventajas de esta técnica frente a otras como SSCP y dHPLC, se decidió emplear esta técnica para la búsqueda de nuevas mutaciones en el gen *CRB1*.

Dado que nunca antes se había usado esta técnica para el cribado de *CRB1*, el primer paso fue optimizar el análisis por HRM para el estudio mutacional de este gen. La sensibilidad para la detección de mutaciones por HRM puede verse afectada tanto por el tamaño del amplicón como por la presencia de varios dominios de disociación. Por ello, los exones con un tamaño superior a 300 pb y los exones con más de un dominio de disociación fueron amplificados en varios fragmentos parcialmente solapados, como los exones 2, 3, 6, 7 y 9. Así, el estudio mutacional de los 12 exones del *CRB1* por HRM requirió el estudio de 25 amplicones distintos.

Con el fin de optimizar la técnica, se aplicó inicialmente a muestras control de ADN, lo que permitió determinar la  $T_m$ , el número de dominios de disociación y la presencia de dímeros de cebador o productos no específicos que pudiesen alterar las características de la curva de disociación y generar falsos positivos.

Tras ello, la técnica se validó mediante su aplicación tanto a individuos control como a pacientes con mutaciones en el gen *CRB1* que habían sido identificadas anteriormente por secuenciación Sanger. Dado que la mayoría de mutaciones conocidas en el gen *CRB1* se localizan en los exones 2, 7 y 9, primero se analizaron por HRM cinco variantes diferentes situadas en dichos exones: c.498\_506del en el exón 2 fragmento b, c.2244-47delATC en el exón 7 fragmento a, c.2290C>T y c.2307C>T en el exón 7 fragmento b; y c.2843 G>A en el exón 9, fragmento a.

Las curvas de fusión así obtenidas permitieron una clara identificación de todas estas variantes (**Figura 4.16**), excepto la última de ellas, la c.2843G>A situada en el exón 9 fragmento a, correspondiente a p.Cys948Tyr, que es la mutación más frecuente. Los portadores heterocigotos de este cambio fueron difícilmente distinguibles de los individuos homocigotos *wild-type* y los mutantes homocigotos no se pudieron detectar.

Con el fin de evaluar la sensibilidad de la técnica de HRM para detectar variantes en *CRB1*, primero se estudió una cohorte de 30 casos índice usando una estrategia de doble análisis por HRM y secuenciación Sanger. En esta cohorte se incluyeron 25 casos de LCA no caracterizados y 5 pacientes de RP-IP que tenían un alelo conocido en *CRB1* después del análisis por el *microarray* de LCA. Así, después del análisis por HRM todos los amplicones fueron también secuenciados con el fin de identificar no sólo mutaciones y polimorfismos, sino también para diferenciar anomalías que fueran falsos positivos y falsos negativos del HRM, por no ser diferenciables mediante las curvas de disociación.

De los 750 amplicones analizados en las 30 muestras (25 amplicones/muestra), 9 exhibieron un perfil HRM anómalo/alterado. En todos estos casos, una secuenciación Sanger confirmó la presencia de una variación genética. A esto hay que añadir tres casos de pacientes de RP-IP que tenían la variante p.Cys948Tyr en heterocigosis por el *microarray* de LCA, que tal como se ha indicado anteriormente, no pudo ser identificada por HRM, lo que representa falsos negativos. Por otra parte, no hubo falsos positivos.



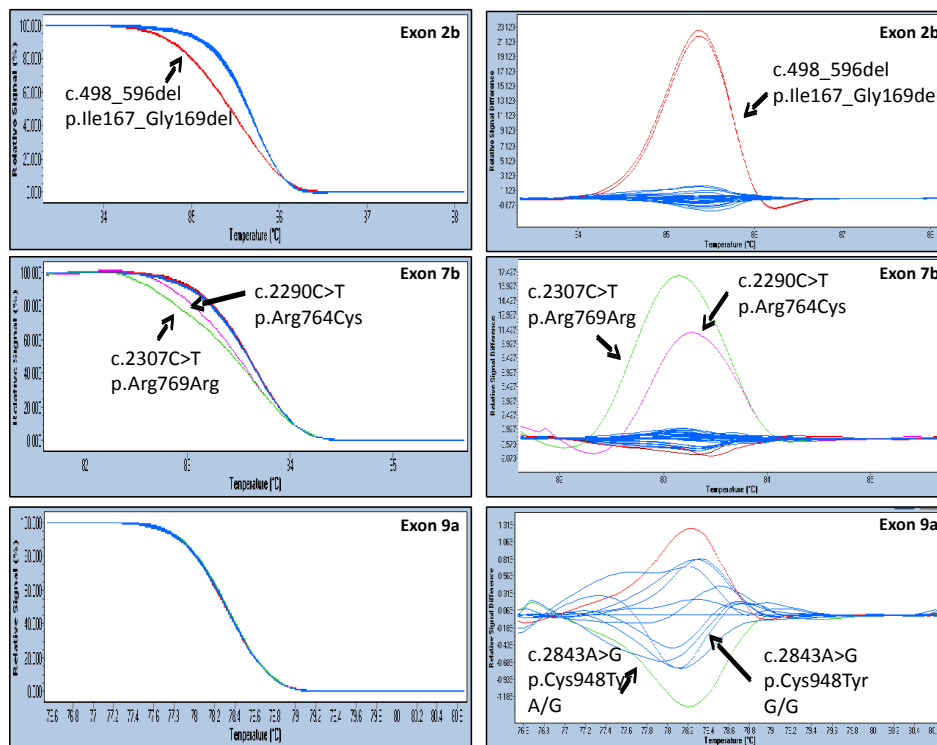


Figura 4.16. Curvas de disociación normalizadas y gráficas de diferencias de la técnica HRM.

Por lo tanto, en esta etapa inicial se obtuvo para la técnica de HRM una especificidad del 100%, y una sensibilidad del 75%.

A la vista de estos resultados, se amplió el estudio mutacional del *CRB1* por HRM añadiendo otros 195 casos índice. En estos pacientes, el amplicón 9a, debido a los problemas de detección, también fue analizado por secuenciación Sanger. En total, 225 pacientes (32 LCA y 193 RP-IP) fueron estudiados mediante HRM, lo que permitió la identificación de ocho variantes en ocho pacientes, cinco de ellas nuevas: seis variantes *missense*, una inserción y una delección de 9 pb (Tabla 4.11).

La tecnología HRM nos permitió identificar dos alelos mutados en *CRB1* (c.2309G>T; p.Gly770Val y c.2805dupA; p.His935Glnfs\*13) en la familia **LCA-0060**, un caso esporádico de LCA. Ninguno de ellos había sido descrito previamente en la literatura. Es destacable que el análisis de segregación de estos cambios sólo pudo confirmar una herencia paterna de la variante *missense*, sugiriendo la presencia *de novo* de una inserción en el *probandus* (Tabla 4.11, Figura 4.13). Análisis adicionales de una muestra de ADN a partir de sangre y células bucales confirmaron la ausencia de la mutación c.2805dupA en la madre.

En otros dos pacientes (**LCA-0071** y **RP-1504**), se detectó un único alelo mutado *missense* en heterocigosis. En ambos pacientes, dado que la sensibilidad no alcanzaba el 100%, se procedió a secuenciar el gen completo. En el caso del *probandus* **RP-1504**, portador de la mutación recientemente descrita c.4142C>T; p.Pro1381Leu. En este paciente se identificó un segundo alelo mutado, una nueva variante c.1796T>C; p.His568Tyr, lo que representa un falso negativo del análisis por HRM. En el caso de **LCA-0071**, portador de una nueva variante, p.Leu599Pro, con patogenicidad de significado incierto, tal como se discutirá en el apartado 5.4.1. La secuenciación directa no detectó un segundo alelo, por lo que se realizó un análisis por MLPA, que descartó grandes reordenamientos en las regiones codificantes del *CRB1*.

Como ya se ha mencionado, en este análisis también fueron incluidos cinco pacientes de RP-IP con un alelo mutado, previamente identificados mediante *microarray*. En todos los casos, el análisis por HRM nos permitió identificar un segundo alelo causante de la enfermedad (**Tabla 4.11**), entre ellos una *delección in frame* de 9 pb en dos pacientes y mutaciones *missense* en cuatro pacientes.

**Tabla 4.11.** Variantes detectadas en *CRB1* mediante HRM.

Exón	Cambio nucleótido	Cambio aminoácido	Familia
2b	c.498_506delAATTGATGG	p.Ile167_Gly169del	RP-0745, MD-0092b
6d	<b>c.1796T&gt;C</b>	<b>p.Leu599Pro</b>	LCA-0071
7b	c.2290C>T	p.Arg764Cys	RP-0745
7b	<b>c.2309G&gt;T</b>	<b>p.Gly770Val</b>	LCA-0060
8	<b>c.2696G&gt;C</b>	<b>p.Gly899Ala</b>	RP-1440
8	<b>c.2805dupA</b>	<b>p.His935Glnfs*13</b>	LCA-0060
9b	<b>c.3157A&gt;G</b>	<b>p.Met1053Val</b>	MD-0351, RP-1625
12	c.4142C>T	p.Pro1381Leu	RP-1504

Negrita: Variantes nuevas detectadas en este estudio.

#### 4.2.6. Estudio mutacional del gen *CRB1* mediante secuenciación directa.

Dada de la baja sensibilidad del estudio de HRM, y con la finalidad de completar el estudio, en aquellas familias en las que no se detectó ninguna mutación por el *microarray* APEX ni por HRM, se realizó la secuenciación directa del gen *CRB1*.

En total se secuenciaron 260 familias (51 LCA y 209 RP-IP), dos de las cuales (**LCA-0038b** y **LCA-0038c**) fueron caracterizadas por Vallespín *et al.*, 2007a, y 2010a [161, 165]. Otras dos familias (**LCA-0101**, **RP-1689**) fueron caracterizadas en el presente estudio, representando cuatro nuevas variantes en heterocigosis. El estudio de cosegregación se realizó en todas aquellas familias donde hubo muestras disponibles, en todos los casos segregando las variantes con la enfermedad. (**Tabla 4.9**, **Tabla 4.10**, **Figura 4.13-Figura 4.15**).

Es de destacar el caso de la familia **RP-1689**, donde se detectaron los alelos p.Arg764His y p.Arg1390\*, que no habían sido descritos anteriormente. Dado que esta familia fue estudiada previamente por HRM, estas dos variantes representan dos falsos negativos de la técnica.

#### 4.2.7. Nuevas variantes del gen *CRB1* consideradas como patógenas.

En total, mediante las diversas técnicas y estrategias aplicadas en este trabajo, se identificaron 16 nuevas mutaciones en 13 familias (**Tabla 4.9**, **Tabla 4.10**, **Figura 4.18**): siete variantes *missense* (p.His568Tyr, p.Arg764His, p.Gly770Val, p.Gly850Val, p.Gly899Ala, p.Asp1005Val, p.Met1053Val), cuatro mutaciones *nonsense* (p.Glu806\*, p.Trp1051\*, p.Glu1203\*, p.Arg1390\*), tres mutaciones *frameshift* (p.Cys383Serfs\*66, p.His935Glnfs\*13, p.Val1334Trpfs\*7) y dos mutaciones en sitio de *splicing* (c.3878+2insT; c.3749+1\_3749+2delGT).

El efecto patogénico de las siete variantes *missense*, fue evaluado mediante segregación con la enfermedad en la familia, frecuencia en 330 cromosomas sanos de control de individuos españoles, segregación de un segundo alelo con la enfermedad, un análisis de conservación evolutiva del residuo en proteínas ortólogas de *CRB1* y una predicción funcional *in silico* mediante los programas Align-GVGD, PolyPhen-2, PROVEAN y SIFT. Los resultados del análisis *in silico* y del análisis de conservación evolutiva se exponen en la **Tabla 4.12**, y en la **Figura 4.17**.

Así, estas siete variantes *missense* fueron consideradas como causantes de la enfermedad debido a que ninguna de ellas se encontró en controles y en todas el análisis de segregación las señaló como responsables, excepto en p.His568Tyr (fam. **RP-1504**) y p.Arg764His (fam. **RP-1689**), en las cuales no se pudo realizar el análisis por falta de muestras de familiares. Asimismo, todas las variantes fueron predichas como probablemente dañinas por al menos uno de los programas empleados y en ninguno de los casos afectaban a residuos altamente conservados. A todo esto hay que añadir como factor también determinante que en todos los casos junto a la variante *missense* considerada se encontró segregando en el paciente junto con un segundo alelo patogénico.

#### 4.2.8. Otras variantes detectadas en *CRB1*

Se detectaron otras seis variantes en *CRB1*, todas ellas *missense*, que se exponen en la **Tabla 4.13** y cuyos criterios de evaluación de patogenicidad fueron los mismos que los expuestos en el apartado anterior. Destacar que ninguna de estas variantes se encontró junto con un segundo alelo causante de la enfermedad. Los datos disponibles no permitían clasificarlas *a priori* como mutaciones causales pero tampoco podían ser descartadas como neutras. El significado de estas variantes se discutirá en el apartado **5.4.1**.

**Tabla 4.12.** *Nuevas variantes missense patogénicas en CRB1: análisis in silico y conservación evolutiva.*

Exón	Cambio nucleótido	Cambio aminoácido	Align GVGD	PolyPhen-2 (score)	PROVEAN (score)	SIFT (score)	Conservación‡
6	c.1702C>T	p.His568Tyr	C65	Probablemente dañino (0.999)	Deletéreo (-5.0)	Dañino (0)	Altamente conservado
7	c.2291G>A	p.Arg764His	C0	Benigno (0.012)	Neutro (-2.3)	Tolerado (0.06)	No conservado. His no presente en las especies evaluadas.
7	c.2309G>T	p.Gly770Val	C65	Probablemente dañino (1.000)	Deletéreo (-8.2)	Dañino (0)	Altamente conservado
7	c.2549G>T	p.Gly850Val	C65	Probablemente dañino (1.000)	Deletéreo (-8.4)	Dañino (0)	Altamente conservado
8	c.2696G>C	p.Gly899Ala	C0	Probablemente dañino (0.996)	Deletéreo (-4.5)	Dañino (0.01)	Altamente conservado. Ala no presente en las especies evaluadas.
9	c.3014A>T	p.Asp1005Val	C15	Probablemente dañino (0.996)	Deletéreo (-5.0)	Dañino (0.02)	Débilmente conservado. Val no presente en las especies evaluadas.
9	c.3157A>G	p.Met1053Val	C15	Probablemente dañino (score 0.994)	Neutro (score -2.2)	Dañino (0)	Altamente conservado

‡: Véase **Figura 4.17**.

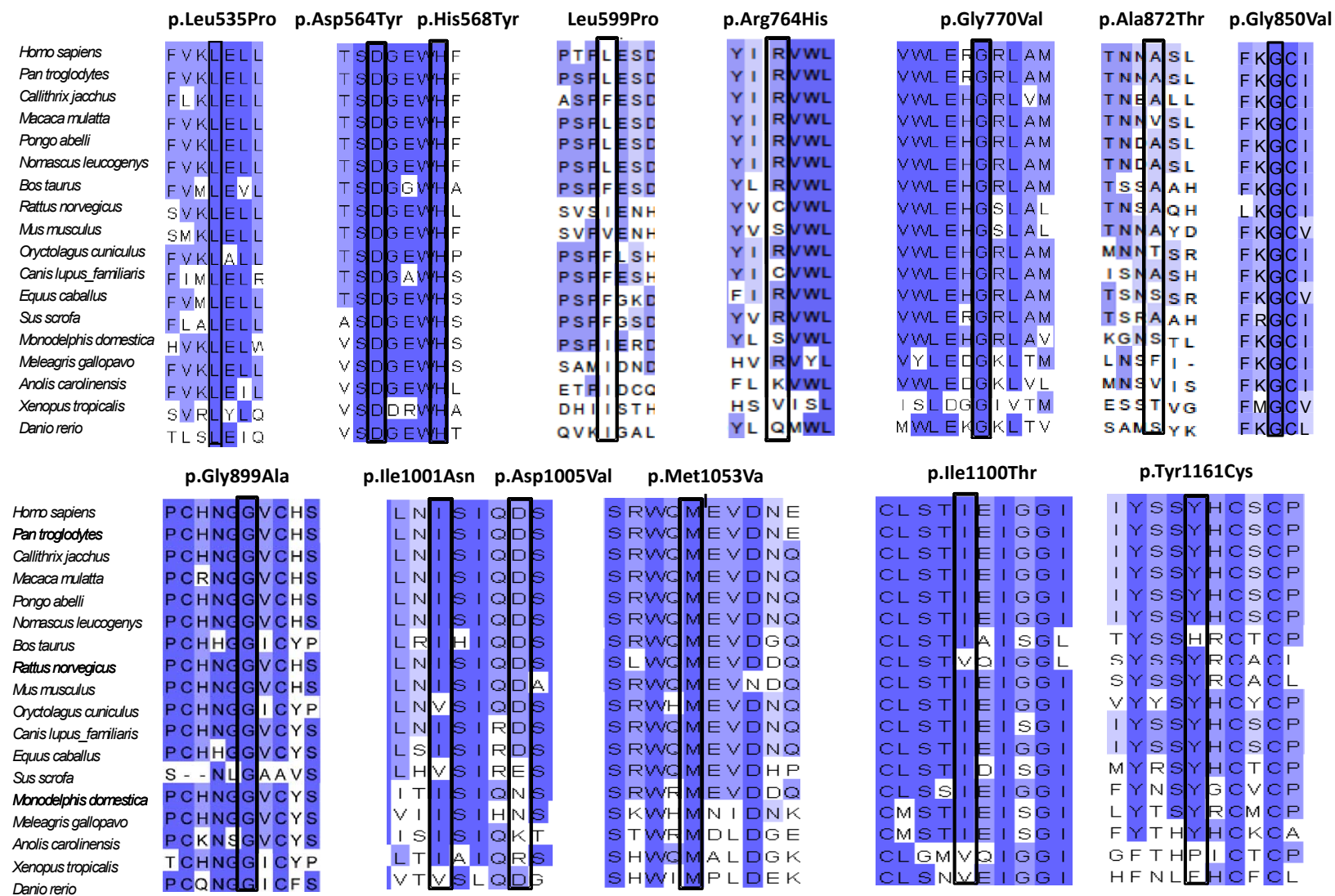
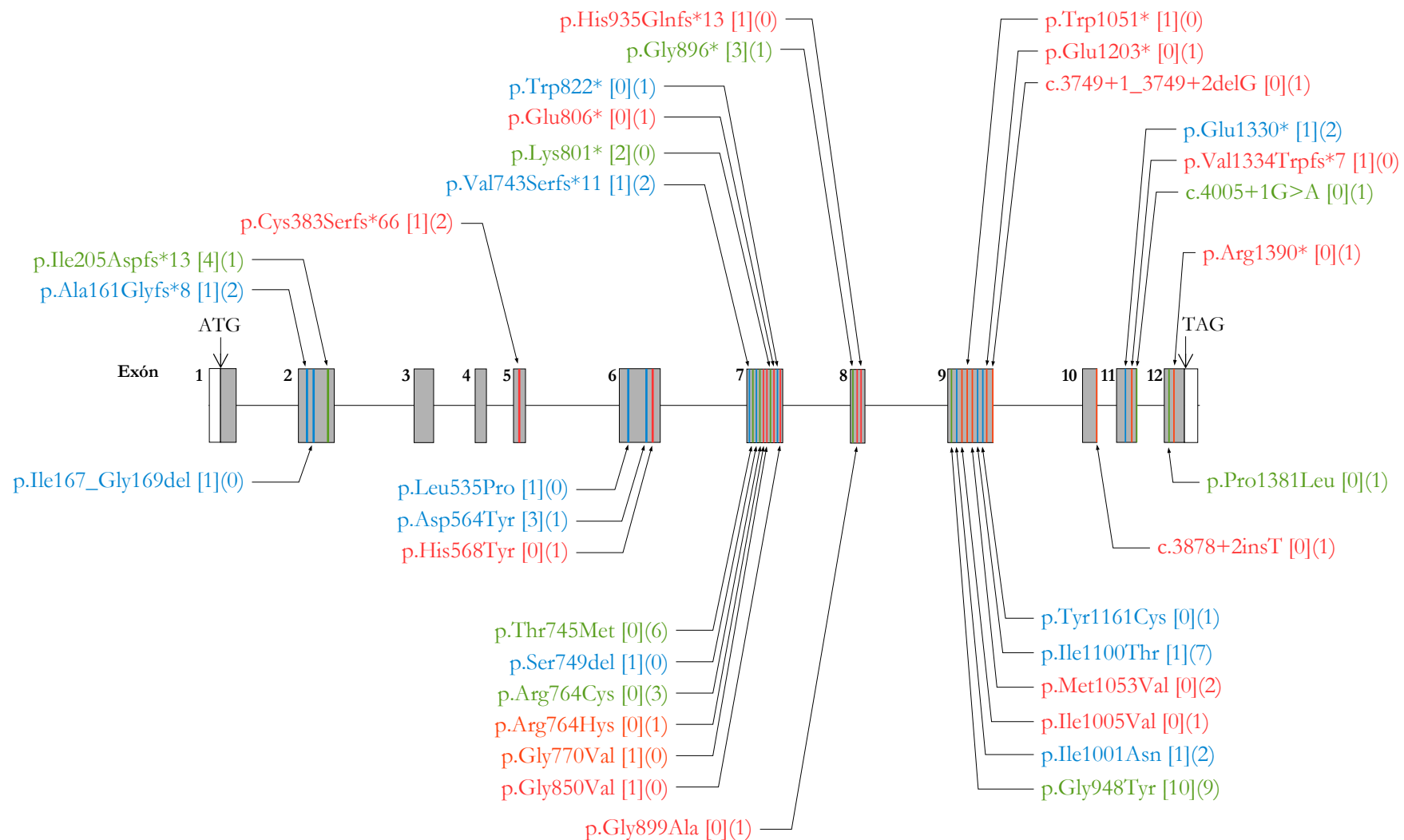


Figura 4.17. Conservación evolutiva de variantes missense en la proteína CRB1 en 18 especies.

**Tabla 4.13.** Otras variantes detectadas en CRB1.

Exón	Cambio nucleótido	Cambio aminoácido	Referencias	dbSNP (MAF)	FC	Align GVG D	PolyPhen-2 (score)	PROVEAN (score)	SIFT (score)	Conservación	Segregación (*)	Conclusión
2	c.484G>A	p.Val162Met	[108, 113]	rs137853138 (0,2%)	-	C0	Benigno (0.006)	Neutro (-0.792)	Tolerado (0.36)	NC. Met en el tití, la vaca, el ratón, el conejo y el perro.	N/F	VUS
4	c.866C>T	p.Thr289Met	[97, 21, 76, 94]	rs62636263 (0,02%)	1/330	C0	Benigno (0.001)	Neutro (-2.16)	Tolerado (0.10)	NC. Met en el conejo.	N/F	Probablemente no dañino
6	<b>c.1796T&gt;C</b>	<b>p.Leu599Pro</b>	<b>Este estudio</b>	-	0/330	C15	Benigno (0.388)	Deletéreo (-3.03)	Dañino (0.01)	NC. Pro no presente.	C	VUS
7	<b>c.2614G&gt;A</b>	<b>p.Ala872Thr</b>	<b>Este estudio</b>	-	0/330	C0	Benigno (0.001)	Neutro (-0.707)	Tolerado (0.64)	NC. Thr en el conejo y la rana.	N/F	Posiblemente no dañino
8	c.2714G>A	p.Arg905Gln	[76, 28]	rs114052315 (0,10%)	-	C0	Benigno (0.166)	Neutro (0.16)	Tolerado (0.08)	NC. Arg sólo presente en la proteína humana. Gln no presente.	No	Probablemente no dañino
11	c.3992 G>A	p.Arg1331His	[97, 76, 28]	rs62636285 (0,10%)	-	C0	Posiblemente dañino (0.465)	Neutro (-1.709)	Tolerado (0.19)	MC. His en el orangután de Sumatra y la rana.	N/F	Probablemente no dañino

En negrita se indican los cambios nuevos detectados en este estudio. MAF: *Minor allele frequency*, obtenido del proyecto 1000 Genomes, en una muestra de 2500 individuos. FC: Frecuencia en cromosomas control. NC: No conservado. MC: Moderadamente conservado. (\*) Resultados del análisis de segregación; “No”: no cosegrega; “C”: cosegrega; “N/F”: no se realizó por falta de familiares. VUS: Variante de significado incierto.



**Figura 4.18.** Variantes detectadas en el gen CRB1. En blanco, se han representado las regiones no codificantes de los exones, y en gris las codificantes. En la parte inferior se encuentran las variantes *missense* e *inframe*, mientras que en la superior se encuentran las variantes nulas. En rojo se indican las variantes nuevas encontradas en este estudio, en azul las variantes descritas previamente por primera vez en población española, y en verde las variantes descritas previamente por primera vez en otras poblaciones. Entre corchetes se indica el número de alelos identificados en la cohorte LCA estudiada y entre paréntesis, en la cohorte RP-IP.

4.2.9. Resumen de resultados en el gen *CRB1*

En la **Tabla 4.14** se indica el número de familias caracterizadas en función de la técnica o combinación de técnicas empleadas, tras todos los estudios realizados. Se encontraron mutaciones responsables de la enfermedad en el gen *CRB1* en el 11% de las familias estudiadas (46/420), y de ellas, se identificaron los dos alelos mutados en el 10,5% (44/420) y sólo uno en el 0,5% (2/420). Además, se identificaron otras variantes en el 2,9% de las familias (12/420).

La distribución por enfermedad y variantes encontradas, se indica en la **Tabla 4.15**.

**Tabla 4.14.** Desglose del número de familias caracterizadas, por técnica.

Nombre	Técnica		Familias		
	Resultado	LCA	RP-IP	Total	
Microarray	2 alelos	9/130 (6,92%)	6/290 (2,07%)	15/420 (3,57%)	
	2º alelo por análisis del gen <i>CRB1</i> ‡	5/5	15/17	20/22	
	Total caracterizadas	14/130 (10,77%)	21/290 (7,24%)	35/420 (8,33%)	
Estudios indirectos	Haplotipos (STR)	0/20	0/60	0/80	
	Mapeo de homocigosidad (SNP)	1/43	0/23	1/66	
SSCP§	2 alelos	1/3	1/20	2/23	
	2 alelos	1/32	0/193	1/225	
HRM	2º alelo por Sanger*	0/0	1/1	1/1	
	2 alelos	1/51	3/209	4/260	
<b>Total familias caracterizadas</b>		<b>18/130 (13,85%)</b>	<b>26/290 (8,97%)</b>	<b>44/420 (10,48%)</b>	

§Bernal *et al.* 2003 [21]. ‡Familias con sólo un alelo mutado por *microarray* y analizadas por dHPLC, HRM, o secuenciación Sanger en busca del segundo alelo mutado. \*Familias con sólo un alelo mutado por HRM y analizadas posteriormente por secuenciación Sanger para identificar un segundo alelo mutado.

**Tabla 4.15.** Número de familias con variantes encontradas en *CRB1*.

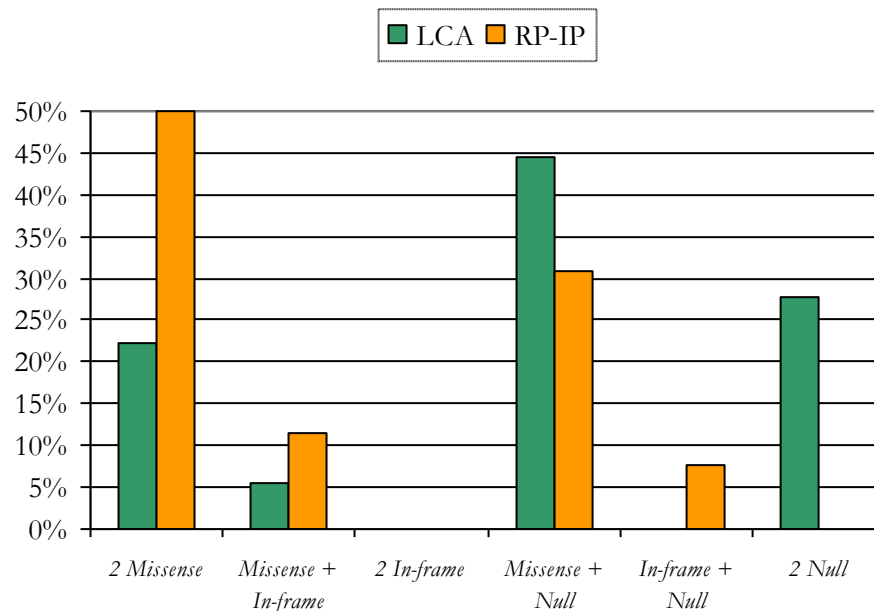
	Familias LCA		Familias RP-IP		Total familias	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
2 variantes patógenicas	18	13,8	26	8,8	44	10,5
1 variante patogénica	0	0,0	2	0,7	2	0,5
Otras variantes	5	3,8	7	2,4	12	2,9
Resto de familias	107	82,3	254	87,6	361	85,9
<b>Total</b>	<b>130</b>		<b>290</b>		<b>420</b>	

En total, en la cohorte de este estudio se identificaron 35 mutaciones diferentes en *CRB1*, de las cuales 16 (45,7%) eran nuevas (**Figura 4.18**). Por otra parte, de las 19 mutaciones que sí habían sido descritas previamente en otros trabajos, 11 se identificaron por primera vez en población española en trabajos previos de nuestro grupo.

Por tipos, estas mutaciones se distribuyen en: 16 *missense*, 8 de codón de parada, 3 en sitio de *splicing*, 6 *frame-shift* y 2 deleciones *in-frame*. En la **Figura 4.19** se muestra la prevalencia de las diferentes combinaciones posibles, por familias LCA y RP-IP.



Estas mutaciones fueron encontradas en 46 pacientes con LCA o RP-IP (90 alelos mutados en total). Se detectaron mutaciones en heterocigosis en todos los casos, excepto en 8 familias (17,4% de las familias) con un historial de consanguinidad o endogamia. Los exones con mayor carga mutacional fueron los siguientes: el exón 9, representando el 41% de los alelos mutados; el exón 7, representando el 20%; y el exón 2, representando el 14,4%.



**Figura 4.19.** Prevalencia de las mutaciones en *CRB1*, por porcentaje de familias LCA y RP-IP, agrupadas por tipo de mutación y combinaciones. Null: esta categoría comprende mutaciones *nonsense*, en sitio de *splicing* y *frame-shift*.

La mutación más frecuente fue la variante p.Cys948Tyr en el exón 9, descrita previamente [72], que fue identificada en 16 familias (34,8% de las familias con mutación en este gen), 8 de ellas LCA y 8 RP-IP, lo que representa el 44,4% (8/18) de las familias LCA y el 28,6% (8/28) de las familias RP-IP con mutación en *CRB1*, respectivamente. Esta mutación está presente en heterocigosis en todos los casos, excepto en tres familias en homocigosis (18,8% de las familias con esta mutación), dos de ellas LCA y una RP-IP.

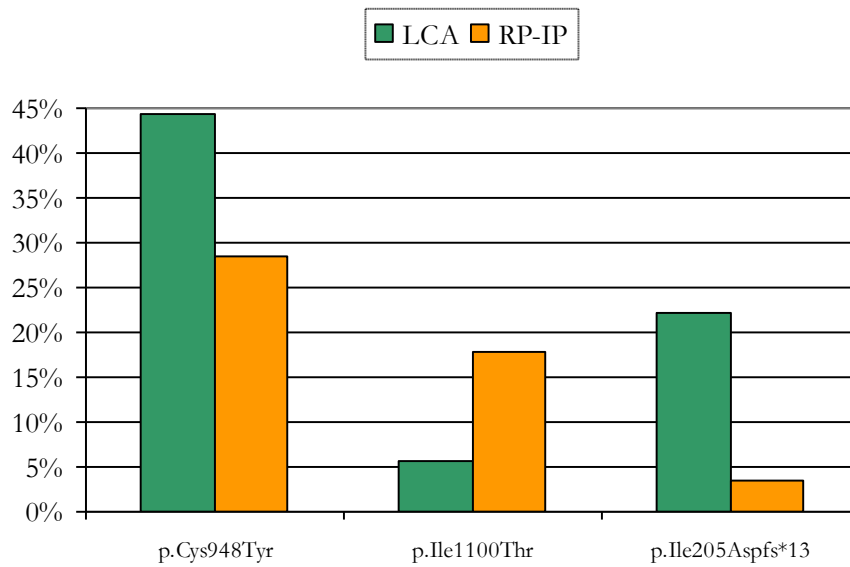
La segunda mutación más frecuente fue p.Ile1100Thr, también en el exón 9, que fue descrita por primera vez en la cohorte de pacientes de este estudio [21]. Esta variante estaba presente en el 13% (6/46) de las familias con mutación en este gen, en dos de ellas en homocigosis (33,3% de las familias con esta mutación), ambas RP-IP. Por enfermedades, p.Ile1100Thr tuvo una prevalencia claramente mayor en las familias RP-IP, con un 17,9% (5/28), que en las familias LCA, con un 5,6% (1/18), siendo así también la segunda mutación más frecuente en las familias RP-IP.

La segunda mutación más frecuente en familias LCA fue p.Ile205Aspfs\*13, descrita anteriormente por [97]. Esta mutación estaba presente en el 10,9% (5/46) de las familias con mutación en *CRB1*, 4 de ellas LCA, y en todos los casos en heterocigosis. Si sólo se consideran las familias LCA, esta variante estuvo en el 22,2% (4/18) de las familias.

## Resultados

Estas tres mutaciones, cuando se presentan en heterocigosis, no se ha observado ninguna tendencia clara a que aparezcan asociadas a alguna otra mutación concreta. En el caso de la mutación p.Cys948Tyr, se ha observado que el 38,5% (5/13) de las familias con esta mutación en heterocigosis, tenían la segunda mutación en el mismo exón, por lo que es posible que exista un patrón en ese sentido.

Se ha representado la prevalencia de estas mutaciones más frecuentes, desglosada por tipo de patología, en la **Figura 4.20**.



**Figura 4.20.** Porcentaje de prevalencia de las mutaciones más frecuentes en la cohorte de este estudio, por familias LCA y RP-IP.

#### 4.3. ESTUDIO MUTACIONAL DEL GEN *NMNAT1*

Durante el desarrollo de esta tesis, el gen *NMNAT1* fue relacionado por primera vez con LCA en 2012 por cuatro estudios [33, 53, 88, 122]. Por lo tanto, se trataba de un gen que no estaba incluido en el *microarray* de genotipado de LCA ni en el de ARRP y que tenía una prevalencia significativa (entre el 3,5% y 5%) en las cohortes LCA estudiadas en dichos trabajos, lo que hacía que fuera de gran interés su estudio en nuestra cohorte de pacientes.

De las 130 familias LCA y 290 familias RP-IP que conformaban las cohortes del presente estudio, se seleccionaron 94 familias en total, 57 familias LCA y 37 familias RP-IP, en las que tras los análisis anteriores (*microarray* de genotipado, mapeo de homocigosidad y secuenciación directa -sólo en algunos genes-) no se detectó ninguna mutación. En el caso de las familias RP-IP hubo un segundo criterio para su inclusión en el estudio de *NMNAT1*, y es que presentasen unas manifestaciones clínicas muy precoces que hiciesen sospechar que pudiese tratarse de LCA.

La secuenciación de todos los exones codificantes del gen *NMNAT1*, así como de sus regiones adyacentes, logró la identificación de siete variantes distintas en 11 familias (11,7%), de las cuales dos habían sido descritas previamente en la literatura y cinco eran nuevas. Los cambios patogénicos identificados fueron dos mutaciones *missense*, dos mutaciones *nonsense*, dos deleciones *frameshift*, y una variante que afecta al mecanismo de *splicing*. Todas las variantes detectadas estaban en heterocigosis. (Figura 4.21 y Figura 4.22).

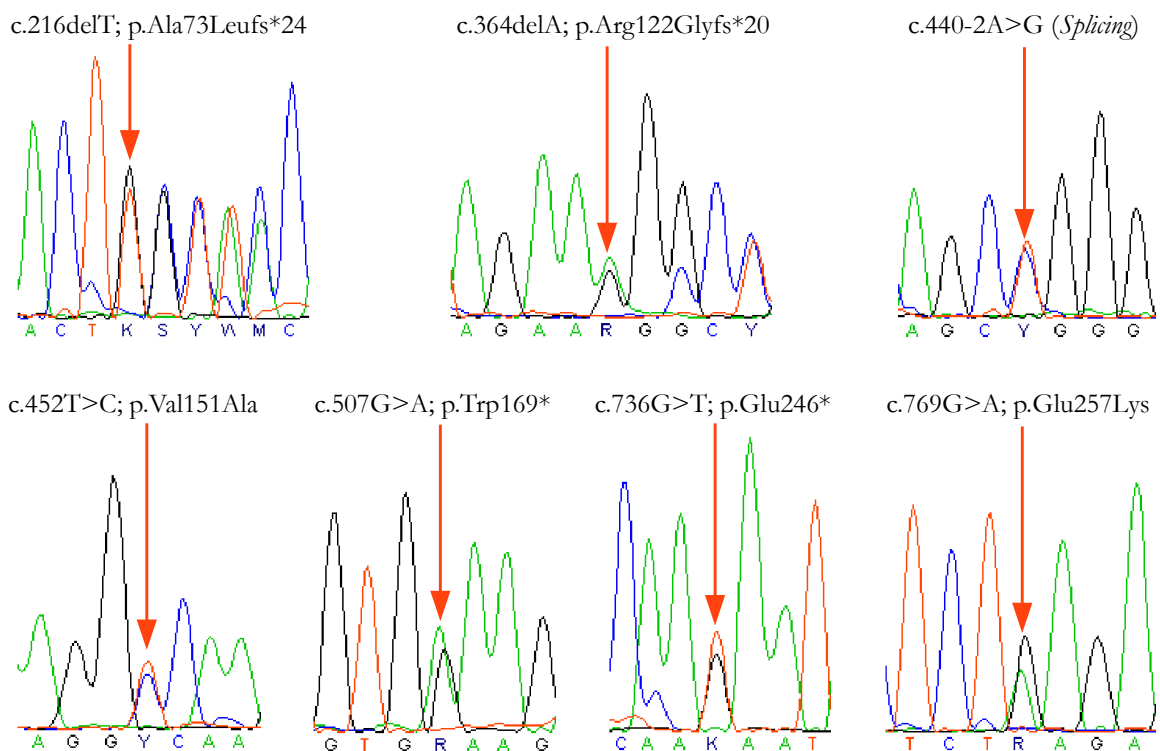
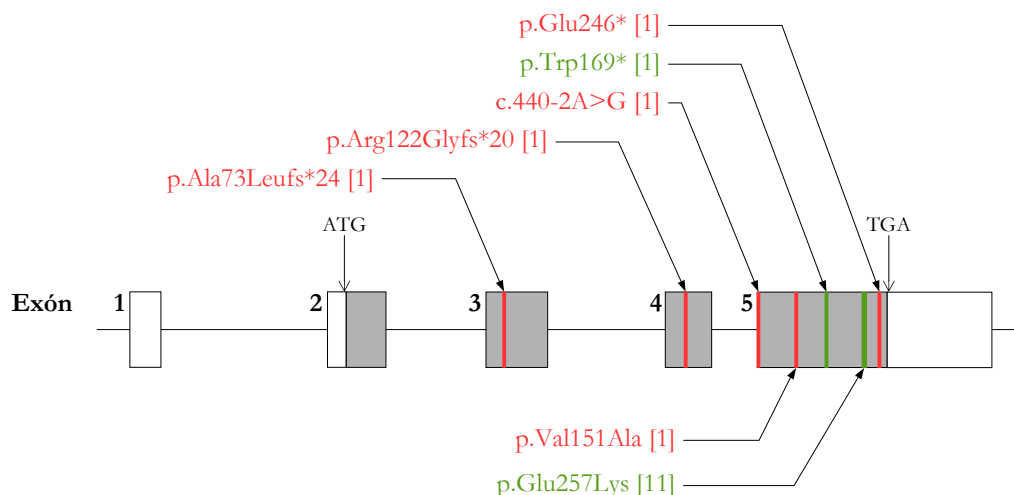


Figura 4.21. Electroferogramas que muestran las variantes detectadas en el gen *NMNAT1*.



**Figura 4.22.** Variantes detectadas en el gen *NMNAT1*. En blanco, se han representado las regiones no codificantes de los exones de *NMNAT1*, y en gris las codificantes. En la parte inferior se encuentran las variantes *missense*, mientras que en la superior se encuentran las variantes nulas. En rojo se indican las variantes nuevas encontradas en este estudio, y en verde, las variantes previamente descritas. Entre corchetes se indica el número de alelos identificados en la cohorte estudiada.

#### 4.3.1. Familias con dos mutaciones en el gen *NMNAT1*

Se identificaron dos mutaciones en seis de las familias estudiadas (6,4%). Todos estos casos son dobles heterocigotos, en donde siempre aparece la variante Glu257Lys (exón 5), y todos pertenecen a familias LCA.

En el caso índice de la familia **LCA-0001** se identificaron dos variantes *missense*. La primera de ellas fue la mutación c.769G>A; p.Glu257Lys, que conlleva un cambio de aminoácido en la proteína y ya había sido descrita previamente como patogénica [33, 53, 88, 122]. La segunda de ellas fue la variante c.452T>C; p.Val151Ala en el exón 5, que no estaba incluida en las bases de datos de polimorfismos, ni había sido descrita previamente en la literatura, por lo que se decidió evaluar su posible patogenicidad con el fin de descartar que la variante encontrada fuera un polimorfismo. También se realizó un estudio poblacional sobre 192 individuos sanos (384 cromosomas) empleando secuenciación directa, no encontrándose el cambio p.Val151Ala en ningún caso. La evaluación *in silico* arrojó los siguientes resultados: Align-GVGD: clase C25; PolyPhen-2: *score* 0.808 (posiblemente dañina); PROVEAN: *score* -2.95 (deletérea); SIFT: *score* 0.004 (dañina). Es decir, que la mayoría de programas consideraron el cambio como daño. El estudio de conservación evolutiva mostró que el residuo era moderadamente conservado, no estando presente el nuevo residuo en ninguna de las proteínas ortólogas consideradas (**Figura 4.23**). Se realizó la segregación de las mutaciones en el resto de la familia, confirmándose que los padres eran portadores de las mismas (**Figura 4.24**). Todo ello llevó a considerar la variante p.Val151Ala como patogénica.

En el *probandus* de la familia **LCA-0008** se identificaron dos variantes. La mutación c.364delA; p.Arg122Glyfs\*20 no había sido descrita previamente en la literatura. Se trata de la pérdida de la base A en el exón 4 del gen, lo que conlleva un cambio en la pauta de lectura y el truncamiento de la proteína (*frameshift*). La otra mutación detectada fue c.769G>A; p.Glu257Lys. El análisis de segregación en el resto de la familia mostró que el hermano afecto era portador de ambas mutaciones y los padres eran portadores de cada una de ellas (**Figura 4.24**).

	p.Val151Ala
<i>Homo sapiens</i>	VPK <b>V</b> KLL
<i>Pan troglodytes</i>	VPK <b>V</b> KLL
<i>Callithrix jacchus</i>	APK <b>V</b> KLL
<i>Macaca mulata</i>	VPK <b>V</b> KLL
<i>Pongo abelli</i>	VPK <b>V</b> KLL
<i>Nomascus leucogenys</i>	VPK <b>V</b> KLL
<i>Bos taurus</i>	VPK <b>V</b> KLL
<i>Rattus norvegicus</i>	VPR <b>V</b> KLL
<i>Mus musculus</i>	VPK <b>V</b> KLL
<i>Canis lupus familiaris</i>	VPK <b>V</b> KLL
<i>Equus caballus</i>	VPK <b>V</b> KLL
<i>Sus scrofa</i>	VPK <b>V</b> KLL
<i>Monodelphis domestica</i>	VPE <b>L</b> KLL
<i>Meleagris gallopavo</i>	VPQ <b>V</b> KLL
<i>Xenopus tropicalis</i>	MPQ <b>V</b> KLL
<i>Danio rerio</i>	HSH <b>L</b> NLL

**Figura 4.23.** Conservación evolutiva de la nueva variante missense p.Val151Ala en la proteína NMNAT1 y sus ortólogas en 16 especies.

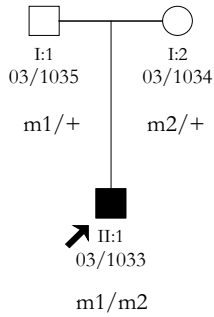
En el caso índice de la familia **LCA-0013** se encontraron dos mutaciones. La variante c.216delT; p.Ala73Leufs\*24 no había sido descrita previamente en la literatura. Se trata de una pérdida de la base T en el exón 3 del gen lo que implica un cambio en la pauta de lectura y el truncamiento de la proteína (*frame-shift*). La otra variante detectada fue la c.769G>A; p.Glu257Lys. Se realizó la segregación de las mutaciones en el resto de la familia y se confirmó que los padres eran portadores de las mismas (**Figura 4.24**).

En la paciente afecta de la familia **LCA-0036** se detectaron dos alteraciones genéticas, la mutación c.769G>; p.Glu257Lys descrita anteriormente y una nueva mutación c.440-2A>G que afecta al *splicing* del exón 5. La variante intrónica c.440-2A>G se encuentra localizada en el 3' acceptor de *splicing* del intrón 4-5 y podría dar lugar a un corte-empalme alternativo y generar una proteína aberrante en el paciente portador. El análisis de segregación mostró a la madre portadora de la mutación p.Glu257Lys. No se llevó a cabo la segregación de las mutaciones en el padre porque no se dispuso de muestra de ADN (**Figura 4.24**).

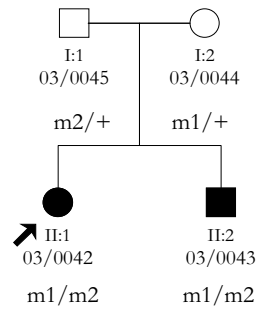
El *probandus* de la familia **LCA-0045** resultó ser doble heterocigoto para las mutaciones c.507G>A; p.Trp169\* y c.769G>A; p.Glu257Lys. La mutación *nonsense* p.Trp169\*, previamente descrita [33], genera un codón de parada prematuro en el último exón 5. El análisis de segregación de las mutaciones mostró que co-segregaban con la enfermedad (**Figura 4.24**).

La paciente de la familia **LCA-0069** era portadora de dos mutaciones, la c.769G>A; p.Glu257Lys y una nueva mutación c.736G>T; p.Glu246\*. El cambio *nonsense* p.Glu246\* produce un codón de parada prematuro en el exón 5. Se realizó la segregación de las mutaciones en la familia confirmándose que los progenitores eran portadores de las mismas (**Figura 4.24**).

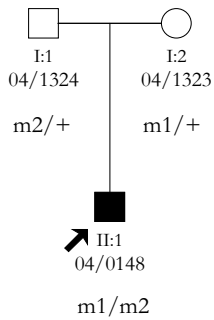
**Fam. LCA-0001**  
 m1: *NMNAT1* c.452T>C; p.Val151Ala  
 m2: *NMNAT1* c.769G>A; p.Glu257Lys



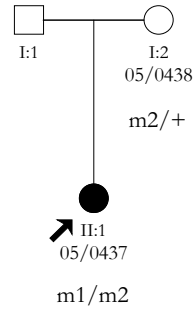
**Fam. LCA-0008**  
 m1: *NMNAT1* c.364delA; p.Arg122Glyfs\*20  
 m2: *NMNAT1* c.769G>A; p.Glu257Lys



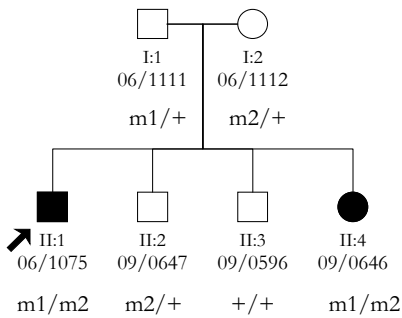
**Fam. LCA-0013**  
 m1: *NMNAT1* c.216delT; p.Ala73Leufs\*24  
 m2: *NMNAT1* c.769G>A; p.Glu257Lys



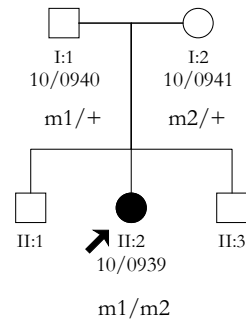
**Fam. LCA-0036**  
 m1: *NMNAT1* c.440-2A>G; *Splicing*  
 m2: *NMNAT1* c.769G>A; p.Glu257Lys



**Fam. LCA-0045**  
 m1: *NMNAT1* c.507G>A; p.Trp169\*  
 m2: *NMNAT1* c.769G>A; p.Glu257Lys



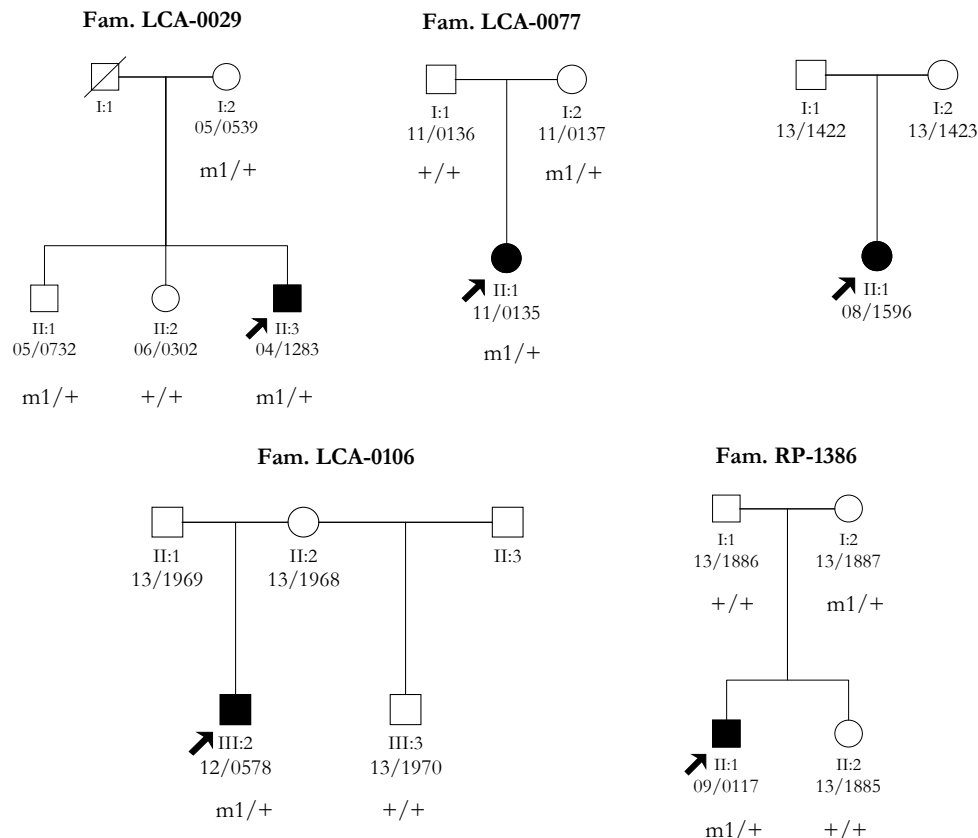
**Fam. LCA-0069**  
 m1: *NMNAT1* c.736G>T; p.Glu246\*  
 m2: *NMNAT1* c.769G>A; p.Glu257Lys



**Figura 4.24.** Pedigrees de las familias portadoras de dos mutaciones detectadas en *NMNAT1* (RefSeq NM\_022787), y análisis de segregación de estas mutaciones. m1, m2: alelos mutados. +: alelo *wild type*.

### 4.3.2. Familias con una mutación en el gen *NMNAT1*

Se identificó una mutación en cinco de las familias estudiadas (5,3%): **LCA-0029**, **LCA-0077**, **LCA-0097**, **LCA-0106** y **RP-1386**. En todos los casos se trató de la misma mutación frecuente que la identificada en el resto de familias, c.769G>A; p.Glu257Lys (**Figura 4.25**). Tras la secuenciación de todos los exones codificantes del gen, no se encontró el segundo alelo mutado. En estos momentos se está procediendo a realizar distintos abordajes para la identificación de posibles variantes en las regiones no codificantes del gen y/o estudios de reordenamientos.



**Figura 4.25.** Pedigrees de las familias portadoras del primer alelo p.Glu257Lys en heterocigosis, y análisis de segregación. m1: alelo mutado. +: alelo wild type.

### 4.3.3. Resumen de resultados del gen *NMNAT1*

Se encontraron mutaciones en el *NMNAT1* en el 11,7% de las familias estudiadas (11/94), y de ellas, se identificaron los dos alelos mutados en el 6,4% (6/94) y sólo uno en el 5,3% (5/94).

Se detectaron siete variantes diferentes, en todos los casos en heterocigosis. De ellas, la variante más prevalente fue p.Glu257Lys, que representa el 64,7% (11/17) de los alelos mutados, y está presente en todas las 11 familias con mutaciones en *NMNAT1*. El resto de las variantes tuvieron una misma prevalencia: 5,9% (1/17) de los alelos mutados.

Todas las familias caracterizadas presentaban un fenotipo de LCA, lo que teniendo en cuenta que la cohorte total de familias LCA de este estudio fue de 130 familias, representa un porcentaje del 4,6% (6/130) de familias con dos mutaciones en *NMNAT1*. De las familias con una mutación detectada en *NMNAT1*, sólo una fue RP-IP, y las cuatro restantes LCA. Estas cuatro familias representan un 3,1% (4/130) de la cohorte total de familias LCA de este estudio.



#### **4.4. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS**

#### 4.4.1. Resumen global de los resultados de la cohorte LCA

En este trabajo se han encontrado mutaciones en 9 genes diferentes (*AIPL1*, *CEP290*, *CRB1*, *LCA5*, *MERTK*, *NMNAT1*, *RDH12*, *RPE65*, *RPGRIP1*) en nuestra cohorte de 130 familias españolas con sospecha clínica de LCA.

Se encontraron dos mutaciones en 49 familias (37,7%), y sólo una mutación en 13 familias (10%), haciendo un total de 62 familias (47,7%) con mutaciones (**Tabla 4.16**, **Figura 4.26**). De las familias con dos mutaciones, en el 65,3% (32/49) la mutación se encontró en heterocigosis, y en el 34,7% (17/49), se encontró en homocigosis (**Tabla 4.17**). Nueve de estas familias fueron caracterizadas en estudios previos al desarrollo de esta tesis doctoral y han sido incluidas en el cómputo total. Éstas presentaron mutaciones en *CEP290* [164], *LCA5* [45], *RDH12* [164] y *RPGRIP1*.

Entre las familias completamente caracterizadas genéticamente, los cuatro genes más frecuentes fueron *CRB1*, *NMNAT1*, *CEP290* y *LCA5*, el primero de ellos presente respectivamente en el 13,9% de las familias estudiadas, y en cada uno de los otros tres en el 4,6%. En los casos de *CRB1* y *NMNAT1*, las mutaciones más frecuentes fueron respectivamente p.Cys948Tyr y p.Glu257Lys, ambas *missense*, y en el caso de *CEP290* la mutación más frecuente fue la mutación *deep intronic* c.2991+1655A>G; p.Cys998\*. En el caso de *LCA5*, no se identificó ninguna mutación que fuera especialmente más frecuente.

**Tabla 4.16.** Familias con mutaciones en genes LCA. Cohorte estudiada: 130 familias.

Gen*	2 mutaciones		1 mutación		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>CRB1</i>	18	13,85	0	0,00	18	13,85
<i>NMNAT1</i>	6	4,62	4	3,08	10	7,69
<i>CEP290</i>	6	4,62	3	2,31	9	6,92
<i>RPE65</i>	5	3,85	3	2,31	8	6,15
<i>LCA5</i>	6	4,62	0	0,00	6	4,62
<i>RDH12</i>	4	3,08	1	0,77	5	3,85
<i>RPGRIP1</i>	1	0,77	2	1,54	3	2,31
<i>AIPL1</i>	2	1,54	0	0,00	2	1,54
<i>MERTK</i>	1	0,77	0	0,00	1	0,77
Total	49	37,69	13	10,00	62	47,69

\*Genes ordenados según el número total de alelos mutados identificados.

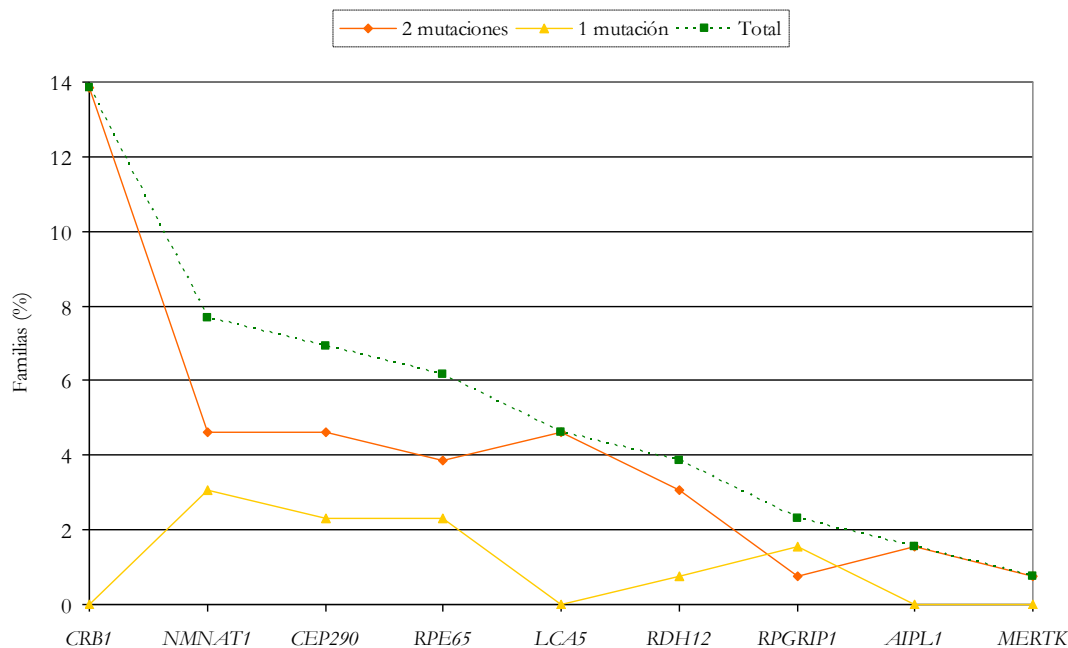


Figura 4.26. Porcentaje de familias con mutaciones en genes LCA.

Tabla 4.17. Estado de las variantes encontradas en las familias caracterizadas.

Gen	Familias con 2 mutaciones	Heterocigosis	Homocigosis
CRB1	18	14	4
NMNAT1	6	6	0
CEP290	6	4	2
LCA5	6	1	5
RPE65	5	3	2
RDH12	4	3	1
AIPL1	2	0	2
MERTK	1	1	0
RPGRIP1	1	0	1
Total	49	32 (65,3%)	17 (34,7%)

#### 4.4.2. Resumen global de resultados en familias RP-IP

En el presente trabajo se estudiaron 290 familias RP-IP españolas en busca de variantes en el gen *CRB1*, habiéndose caracterizado 26 familias (8,9%), y detectado una sola mutación en 2 familias (0,7%). Las mutaciones más frecuentes fueron p.Cys948Tyr y p.Ile1100Thr, presentes respectivamente en el 28,6% y el 17,9% de las familias con mutaciones.

Por otra parte, 37 de esas familias RP-IP fueron sometidas además a un estudio mutacional en el gen *NMNAT1*, habiéndose hallado una única mutación, p.Glu257Lys, en una única familia.

#### 4.4.3. Resumen global de las nuevas variantes detectadas

El presente estudio se han descrito por primera vez 27 variantes, 16 de ellas en la cohorte LCA y 11 en la cohorte RP-IP. Estas variantes se han detectado en 23 familias (13 LCA y 10 RP-IP), en 5 de las cuales (3 LCA y 2 RP-IP) ambos alelos eran variantes descritas por primera vez en el presente trabajo. En la **Tabla 4.18** se detallan estas variantes.

**Tabla 4.18.** Variantes nuevas detectadas en este estudio, por tipo y gen.

Gen (tipo familia)	Variantes				Total
	<i>Missense</i>	<i>Nonsense</i>	<i>Frameshift</i>	<i>Splicing</i>	
<i>CRB1</i> (LCA)	2	1	2	0	5
<i>CRB1</i> (RP-IP)	5	3	1	2	11
<i>NMNAT1</i> (LCA)	1	1	2	1	5
<i>RPE65</i> (LCA)	2	0	2	1	5
<i>MERTK</i> (LCA)	1	0	0	0	1
Total	11	5	7	4	27

## **5. DISCUSIÓN**

La amaurosis congénita de Leber es la forma más precoz y severa de todas las distrofias hereditarias de la retina, y ocasiona discapacidad visual grave o ceguera antes del primer año de vida. Se caracteriza por la degeneración primaria de los fotorreceptores de la retina y presenta una prevalencia de 1 en 30000-81000. El 5% de los casos de distrofias de retina y alrededor del 20% de los casos con ceguera congénita están clasificados como LCA.

Por su parte, la RP-IP se caracteriza por una pérdida del campo visual antes de los 10 años de vida y por una reducción de la agudeza visual en estados avanzados de la enfermedad. No existen estimaciones precisas sobre su incidencia.

Ambas enfermedades tienen una gran heterogeneidad genética como se ha ido viendo en estudios anteriores y como vienen a confirmar los resultados del presente estudio. A esto hay que añadir que muchas veces el paciente es el primer y único afecto que existe en la familia, especialmente en las familias LCA. Todo ello complica el diagnóstico molecular y el desarrollo de métodos de diagnóstico eficientes.

Es importante realizar estudios de caracterización en cohortes lo más amplias posible, con el fin no sólo de descubrir nuevas mutaciones, sino también de identificar posibles patrones o confirmar otros ya observados. Esto a su vez posibilita mejorar no sólo los procesos de caracterización, sino también los de diagnóstico clínico y estudiar posibles tratamientos. De ahí que el presente trabajo esté centrado en la caracterización molecular de los afectos de LCA y RP-IP en la población española.

En este capítulo se discutirán los resultados del presente trabajo, comenzando por los del *microarray* de genotipado específico de LCA, que fue la primera herramienta de cribado empleada para los pacientes de LCA. Tras ello, se analizarán los resultados obtenidos para los genes que han recibido una especial atención en el presente trabajo, *CRB1* y *NMNAT1*, así como otras variantes detectadas. Finalmente, se discutirán los resultados globales, así como las técnicas empleadas, y sus implicaciones para los afectos de RP-IP y LCA de la población española.

### 5.1. MICROARRAY DE GENOTIPADO ESPECÍFICO DE LCA

El *microarray* de LCA fue la primera herramienta utilizada para la detección de variantes en este estudio. Así, se detectaron mutaciones en el 30,8% de las familias (40/130), que se dividen en un 14,6% (19/130) de familias con una sola mutación detectada y un 16,2% (21/130) de familias con dos mutaciones detectadas. Esto representa un 22,7% (59/260) de alelos mutados en la cohorte estudiada.

Dada su eficiencia, su coste y su sencillez, esta herramienta ha sido ampliamente utilizada desde hace diez años para el cribado inicial en numerosos estudios con pacientes LCA procedentes de diversas poblaciones [186]. Sin embargo, ha de tenerse muy presente que este tipo de *microarrays* sólo detectan variantes que previamente hayan sido incorporadas a la herramienta por el fabricante, y normalmente suelen incluir sólo mutaciones o polimorfismos previamente descritos. Así, la versión y el diseño específico del *microarray* utilizado en cada estudio influye decisivamente en los resultados obtenidos.

En nuestra cohorte, 44 familias formaron parte de un estudio anterior (Vallespín, 2008 [164]), el cual constituyó el primer estudio realizado con el *microarray* de LCA en una cohorte de familias españolas con diagnóstico clínico de LCA, permitiendo identificar mutaciones en el 23% de las familias (**Tabla 5.1**). En el presente estudio se utilizó una versión actualizada del *microarray* conteniendo 781 variantes en 15 genes,

y se incluyeron 32 familias previamente estudiadas con la versión anterior. Los resultados porcentuales obtenidos con ambas versiones fueron similares, aunque es conveniente mencionar que con la segunda versión la proporción de familias con dos mutaciones (y por lo tanto completamente caracterizadas) frente a familias con una sola mutación detectada fue mayor.

**Tabla 5.1.** Comparación de resultados obtenidos con la versión 1 y la versión 2 del microarray de LCA.

	Versión 1 [164]	Versión 2 (Presente estudio)	Resultado final
0 mutaciones	34 (77,3%)	88 (74,6%)	90 (69,2%)
1 mutación	6 (13,6%)	15 (12,7%)	21 (16,2%)
2 mutaciones	4 (9,1%)	15 (12,7%)	19 (14,6%)
Total familias	44	118*	130

\* En este número se incluyen 32 familias del estudio [164], que no fueron caracterizadas en dicho estudio.

Tanto en el ya mencionado estudio de Vallespín, 2008 [164], como en los de Zernant *et al.*, 2005 [186], e Yzer *et al.*, 2006 [185], también realizados empleando el *microarray* de LCA, a pesar de las diferencias en las cohortes (tanto por tamaño como por procedencia) y las diferentes versiones del *microarray* de LCA, el número de familias con mutaciones detectadas fue alrededor del 30%, en línea con los resultados del presente estudio. Sin embargo, en Henderson *et al.*, 2007 [69], el número de familias con mutaciones detectadas ascendió al 45,8%. En la **Tabla I** (anexo I) se exponen los resultados obtenidos al aplicar el test de Fisher al número de familias con mutaciones detectadas, entre el presente estudio y los estudios anteriormente mencionados. Estos resultados confirman que no existe una diferencia estadística significativa, excepto para el estudio de Henderson *et al.*, 2007.

La diferencia vista en el estudio Henderson *et al.*, 2007, respecto a los otros estudios podría deberse a que la cohorte del estudio (59 pacientes LCA), incluía a pacientes de orígenes muy diversos, entre ellos paquistaníes e indios, los cuales se distinguen de otras poblaciones por una alta tasa de consanguinidad y mutaciones en genes específicos. No se detalla sin embargo la distribución por orígenes de los pacientes de LCA, ni en función de la consanguinidad, sino sólo para toda la cohorte en conjunto, formada por 153 pacientes con LCA y distrofias de retina severas y de inicio precoz: 12% de pacientes indios, 5% de pacientes paquistaníes, y 21% de pacientes de familias consanguíneas. Tampoco se detalla la tipología de las familias donde se detectaron mutaciones, es decir, de qué orígenes eran las familias o si eran consanguíneas, por lo que sólo con la información del artículo no es posible hacer un análisis detallado sobre la razón de este porcentaje tan alto de familias con mutaciones detectadas.

En los estudios de Zernant *et al.*, 2005, Henderson *et al.*, 2007, y Vallespín, 2008, el porcentaje de familias con dos mutaciones detectadas estaba entre aproximadamente el 10 y el 15%, en línea con el presente estudio, mientras que el porcentaje de familias con una sola mutación detectada estaba aproximadamente entre el 15 y el 30%, mientras que en este estudio era algo inferior (~10%). Un motivo para esta discrepancia reside en diferencias en la clasificación de la patogenicidad de variantes. En estudios más antiguos, se consideraron como mutaciones variantes que actualmente se han reclasificado como polimorfismos raros no patogénicos, gracias a un mayor conocimiento, estudios *in silico* o en algunos casos *in vitro*, y los resultados de grandes proyectos de secuenciación como 1000 Genomes y EVS. Todos estos

casos, al no encontrarse una segunda mutación, precisamente eran incluidos en el grupo de las familias con una sola mutación. Otra posible razón que se añade a la anterior podría ser una mayor heterogeneidad genética de la población española con respecto a otras poblaciones estudiadas, así como a la existencia de mutaciones en la población española que todavía no habían sido descritas o no habían sido incluidas en el *microarray*.

En cuanto al estudio de Yzer *et al.*, 2006, realizado en una cohorte de pacientes principalmente belgas y holandeses, mostró un porcentaje inusualmente alto de familias con dos mutaciones detectadas (24,1%) y un porcentaje inusualmente bajo de familias con una sola mutación detectada (8,6%), y por lo tanto, una proporción del 3:1. Esto probablemente se deba a un mayor número de pacientes con variantes en homocigosis (50% de pacientes caracterizados) con respecto a otros trabajos y al presente estudio (21,9%). El 15,8% de los pacientes con mutaciones detectadas y el 14,3% de los pacientes con una mutación en homocigosis pertenecían a familias consanguíneas, por lo que no se puede atribuir a la consanguinidad el alto número de pacientes con variantes en homocigosis, sino probablemente a que son poblaciones más homogéneas genéticamente que la nuestra.

El gen más frecuente en los resultados del *microarray* del presente estudio fue *CRB1*, detectado en el 10,8% (14/130) de las familias estudiadas. Este mismo gen fue el más frecuente en la cohorte española estudiada por Vallespín, 2008, pero en aquel estudio su porcentaje de prevalencia fue mayor, de un 18,2%, a pesar de que la versión del *microarray* empleada en aquel estudio sólo incluía 81 variantes en *CRB1* frente a las 152 variantes que podía detectar la versión empleada en el presente estudio. Al ser bastante más grande la cohorte del presente estudio que la del estudio de Vallespín, 2008 (130 familias frente a 44), y además al emplear una versión más moderna del *microarray*, es probable que una frecuencia más cercana al 10% sea más representativa para los resultados de *CRB1* mediante *microarray* en población española.

*CRB1* también fue el gen más frecuente mediante el *microarray* de LCA en el estudio de Yzer *et al.*, 2006, con una frecuencia del 15,5% en una cohorte de pacientes de Bélgica, Holanda y Alemania, y el segundo gen más frecuente (13,6%) en el estudio de Henderson *et al.*, 2007, con una cohorte multinacional, y en la cohorte estadounidense del estudio de Zernant *et al.*, 2005 (8,6%).

*GUCY2D* fue el gen más frecuente (15,2%) en el estudio de Henderson *et al.*, 2007, así como en las cohortes estadounidenses (11,4%) y canadienses (13,6%) del estudio de Zernant *et al.*, 2005, y fue el segundo más frecuente en el estudio de Yzer *et al.*, 2006, y en la cohorte europea del estudio de Zernant *et al.*, 2005 (8,6%). Sin embargo, es importante tener en cuenta que en el estudio de Zernant *et al.*, 2005, fueron consideradas como mutaciones causantes las variantes p.Pro701Ser y p.Trp21Arg porque así estaban incluidas en la versión del *microarray* utilizada, aunque como demostraron Henderson *et al.*, 2007, se trataba realmente de polimorfismos. De ahí, que los porcentajes en *GUCY2D* del estudio de Zernant *et al.*, 2005, no se puedan tomar como representativos. En cuanto al estudio de Yzer *et al.*, 2006, si bien las dos variantes mencionadas también estaban incluidas en la versión utilizada como mutaciones causantes, no se detectaron en ningún paciente, y por lo tanto los porcentajes obtenidos sí pueden considerarse como válidos. En la cohorte del presente estudio, mediante *microarray* no se detectó ninguna mutación causante en *GUCY2D*, sino precisamente sólo la variante p.Pro701Ser, que fue considerada como polimorfismo.



*AIP1* fue el gen más frecuente (19,5%) en la cohorte europea de Zernant *et al.*, 2005, y el segundo más frecuente (6,8%) en la cohorte canadiense del mismo estudio, mientras que en presente estudio tuvo una frecuencia mucho menor (1,5%).

En el estudio de Ávila Fernández *et al.*, 2010 [10], se empleó el *microarray* específico de arRP, en una versión que detectaba 501 variantes en 16 genes en una cohorte de 86 familias españolas con diagnóstico de RP-IP. Así, se detectaron mutaciones mediante el *microarray* en el 14% de las familias, un 7% de ellas con dos mutaciones y el mismo porcentaje de familias con una sola mutación, representando un 10,5% de alelos mutados.

Estos porcentajes son más bajos que los obtenidos en los estudios con el *microarray* de LCA, lo que puede deberse a que la RP-IP tiene una heterogeneidad genética incluso mayor que la de LCA, así como a que existen algunas variantes están incluidas exclusivamente en el *microarray* de LCA, pero no en el de arRP. A ello debe añadirse que de las 86 familias, 57 son familias en las que no se detectó ninguna mutación mediante el *microarray* de LCA en un estudio previo, pero hubo otras familias donde sí se detectaron mutaciones, y que si se hubiesen incluido en el cómputo, los porcentajes resultantes hubieran sido mayores.

Por otra parte, en los resultados de dicho estudio no se detallan los genes más frecuentes empleando sólo el *microarray*, sino que los resultados que se dan son los obtenidos tras la combinación de varias técnicas. Si se considera que esos resultados finales podrían ser indicativos de los resultados que se obtuvieron en el *microarray*, en el mencionado estudio el gen más frecuentemente mutado en el caso de RP-IP fue *RDH12* (3,5% de los pacientes), gen también implicado en LCA, y que en el presente estudio fue detectado en el 3,1% de los pacientes, un porcentaje similar, pero muy alejado de los porcentajes que suelen tener los genes más frecuentes en LCA, que están entre el 10% y el 20%. *CRB1* y *RPE65* fueron otros genes también implicados en LCA y en RP-IP que se detectaron en ese estudio. Mutaciones en *RPE65* se detectaron en una sola familia (1,2%), mientras que en el caso de *CRB1* se detectaron mutaciones en 2 familias (2,3%). Sin embargo, se da la circunstancia de que las familias en las que previamente se detectaron mutaciones con el *microarray* de LCA, y no incluidas por Ávila Fernández *et al.*, 2010, tenían todas mutaciones en *CRB1*, por lo que la frecuencia real de mutaciones en este gen en RP-IP es mayor. Aun así, la frecuencia de mutaciones en *CRB1* y *RPE65* en RP-IP está muy lejos de las frecuencias que suelen tener en las cohortes LCA.

En lo que respecta a la fiabilidad el método en el presente estudio todas las variantes detectadas fueron confirmadas por secuenciación directa, es decir no hubo falsos positivos. Sin embargo, hubo dos pacientes con falsos negativos, uno en el gen *CRB1* y uno en el gen *RDH12* (véase el apartado 4.1.2). En el caso del paciente con la variante en *CRB1*, se descubrió el falso negativo debido a que un posterior estudio de mapeo de homocigosidad que incluía a *CRB1* reveló la existencia de una región homocigota posiblemente relacionada con la enfermedad, y por ello se secuenció el gen *CRB1*. En cuanto al paciente con la variante en *RDH12*, fue detectada debido a que este paciente tenía otra variante en *RDH12* que fue correctamente detectada por el *microarray* y ello llevó a que se secuenciase el gen completo.

Dentro de los otros estudios que se han nombrado más arriba en los que se empleó el *microarray* de LCA, sólo en el de Henderson *et al.*, 2007, se detectaron falsos positivos, y más concretamente cinco casos

con una misma variante en *AIP1* que el *microarray* identificaba erróneamente como otra variante en el mismo gen, debido a un error en los ficheros de referencia del fabricante. Este es también el único estudio donde se hace referencia a falsos negativos, y más concretamente una variante en *CRB1* que estaba incluida en el *microarray* en el momento del estudio y que fue identificada tras la secuenciación del gen completo, por la presencia de un primer alelo en este gen. Este falso negativo se atribuyó a un deficiente diseño de los cebadores, y es probable que los tres falsos negativos observados en el presente estudio se deban a esta misma razón.

Otro aspecto a tener en cuenta es que los *microarrays* incluyen tanto variantes cuya patogenicidad es clara como variantes cuya patogenicidad no está determinada y polimorfismos, por lo que es importante hacer un adecuado análisis de los resultados, complementándolos con estudios adicionales si fuese necesario.

## 5.2. ESTUDIO DEL GEN *CRB1*

El fin del estudio realizado en el gen *CRB1* fue evaluar la prevalencia de las mutaciones en este gen en una gran cohorte de pacientes españoles con diagnóstico de LCA y RP-IP, así como evaluar diversas estrategias para optimizar su cribado mutacional. La razón de que se realizase un estudio más detallado en este gen se debió a que en los trabajos anteriores Ávila Fernández, 2011 [12]; Vallespín, 2008 [164]; y Bernal *et al.*, 2003 [21], se observó que las mutaciones en *CRB1* tenían una gran prevalencia en la población española afectada de distrofias de retina congénitas y de inicio precoz.

Así, tomando una serie de familias estudiadas en esos tres trabajos anteriores, se amplió la cohorte estudiada, de forma que se estudió un total de 130 familias LCA, que conforman la cohorte de base de este trabajo, y 290 familias RP-IP, haciendo un total de 420 familias. Estas familias fueron estudiadas con las técnicas de APEX (*microarray* de genotipado), secuenciación directa, HRM, construcción de haplotipos utilizando microsatélites y mapeo de homocigosidad utilizando arrays de SNPs de genoma completo.

Como primera herramienta, se utilizó el *microarray* APEX, con el fin de detectar variantes previamente descritas en *CRB1*, lo que permitió identificar un 8,8% (37/420) de familias con una o dos mutaciones en *CRB1*. En 20 de las 22 familias en las que sólo se detectó un alelo en *CRB1*, se pudo identificar el segundo alelo causante de la enfermedad, mediante otras técnicas (dHPLC, HRM y/o secuenciación Sanger). En las dos familias restantes, los análisis por secuenciación Sanger y MLPA descartaron la existencia de un segundo alelo mutado en las regiones exónicas. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que exista una segunda mutación en las regiones intrónicas o reguladoras del gen *CRB1*, o que en estas familias la enfermedad se deba a otra causa genética. En este sentido, actualmente se está completando el estudio de estas dos familias mediante *arrays* CGH, para detectar reordenamientos, y mediante NGS.

El *microarray* también permitió la identificación de otras variantes en el 2,6% (11/420) de las familias, que se discutirán en detalle en el apartado 5.4.1.

El gran número de variantes nuevas descubiertas en estudios anteriores, junto con la importancia que se vio que tenía el gen *CRB1* en la población española afectada por distrofias de retina congénitas y de inicio precoz, tanto en esos estudios como en los resultados iniciales del presente trabajo, nos llevó a plantearnos si en nuestra cohorte pudiera existir un mayor número de pacientes con mutaciones en *CRB1*

que no hubieron podido ser detectadas por el *microarray*. De ahí que se empleasen otras técnicas tanto directas como indirectas, con el fin de realizar un estudio más detallado que permitiese detectar mutaciones adicionales en *CRB1*.

En los estudios previos de Bernal *et al.*, 2003, y de Vallespín, 2008, se emplearon, respectivamente, las técnicas SSCP y dHPLC para realizar un estudio mutacional directo de este gen en una cohorte española. Sin embargo, ambas técnicas tienen importantes desventajas como que requieren mucho tiempo, tienen un alto coste, la necesidad de realizar manipulaciones post-PCR, y la imposibilidad de realizar un análisis a gran escala. Durante la realización del presente estudio, se empleó la técnica HRM, como sistema rápido de cribado que no tiene las desventajas anteriormente citadas. Además de un mayor rendimiento y menores costes, esta técnica no requiere ningún procesado ni adición de reactivos o separaciones después de la PCR, lo que reduce las posibilidades de que se produzcan errores o haya contaminaciones. La técnica de HRM fue empleada con éxito en un estudio con una gran cohorte, realizado por Vossen *et al.*, 2009 [168].

Estas características de la técnica de HRM la hicieron ideal para su aplicación en la búsqueda de nuevas mutaciones en el gen *CRB1*. No sólo se trata de un gen grande, sino que además en el estudio hubo una cohorte de 225 pacientes afectados de LCA o RP-IP que fueron analizados por HRM, con lo que la rapidez y la economía fueron factores de gran importancia.

Como primer paso, se decidió optimizar la técnica de HRM para el estudio mutacional del gen *CRB1*, ya que no se había publicado ningún trabajo previo al respecto. Para ello, primero se utilizaron muestras control de ADN con el fin de determinar las secuencias de los cebadores más adecuadas y las cantidades de reactivos óptimas, y tras ello la técnica fue validada en pequeñas cohortes de individuos control y pacientes con mutaciones en *CRB1* previamente detectadas mediante secuenciación Sanger. En general, la implementación de la técnica fue bastante sencilla, con pequeñas modificaciones de los cebadores existentes y de las condiciones de la PCR. Sólo cuatro parejas de cebadores que fueron publicados originalmente por Hannein *et al.*, 2004 [67], tuvieron que ser rediseñadas, con el fin de mejorar las curvas de disociación.

En esta etapa de validación de la técnica, la única variante que no se pudo detectar claramente, fue la mutación c.2843G>A; p.Cys948Tyr, la más frecuente en nuestra cohorte. Dado que no hubo dominios de disociación dobles ni se detectaron dímeros, y las curvas de disociación eran fácilmente analizables, entre las causas de que no se pudiese detectar esta variante pueden estar el tamaño del amplicón para el exón 9a (>300 pb), el tipo de cambio, la influencia de regiones flanquantes, y el contenido de GC. Una pareja de cebadores para un tamaño de amplicón más pequeño podría permitir la detección de esta variante mediante HRM, pero hasta que no se consiga adecuar la técnica para detectar esta variante y se valide su detección, se creyó conveniente analizar el amplicón 9a mediante secuenciación directa, con el fin de evitar falsos negativos.

Posteriormente, la técnica se aplicó a una pequeña cohorte de 30 pacientes LCA y RP-IP, y tras comprobar el correcto funcionamiento, la técnica se aplicó a los 195 pacientes restantes. En suma, esta técnica permitió detectar mutaciones en 7/225 (3,1%) familias, además de una variante de significado incierto. Cinco de estas familias, tenían una mutación en *CRB1* previamente identificada mediante el

*microarray* APEX, y el análisis por HRM permitió la detección de una segunda variante, y así la caracterización de estas familias. Además, nos permitió la caracterización completa de una familia con dos nuevas mutaciones en heterocigosis en *CRB1*.

Tras emplear las diversas técnicas ya mencionadas, se hallaron 35 mutaciones diferentes, de las cuales 16 mutaciones no habían sido descritas previamente y otras 11 habían sido descritas por primera vez en población española en estudios anteriores, y se caracterizaron completamente el 10,5% de las familias estudiadas (44/420). Este porcentaje es ligeramente superior al 8,5% observado por Henderson *et al.*, 2010 [70], en una cohorte heterogénea de pacientes mayoritariamente británicos afectados por distrofias de retina de inicio precoz y congénitas, y también similar al porcentaje obtenido en un meta-estudio realizado por Bujakowska *et al.*, 2012 [28]. La pequeña diferencia respecto al resultado observado en Henderson *et al.*, 2010, podría deberse a que en ese estudio no se realizó la secuenciación completa del gen *CRB1* en todos los casos. En el estudio de Yang *et al.*, 2014 [183], realizado en una cohorte de pacientes chinos afectados de LCA y RP, la secuenciación del gen *CRB1* permitió la caracterización del 5,9% de las familias estudiadas. Esto podría indicar que la importancia de las mutaciones en *CRB1* responsables de distrofias de retina de inicio precoz y congénitas es significativamente menor en la población asiática, o al menos en la población china, que en las poblaciones europeas y norteamericanas, aunque serían necesarios estudios más amplios en población asiática para confirmar estas observaciones.

Por fenotipo, *CRB1* fue responsable de la enfermedad en el 14% de las familias LCA, porcentaje mayor que el observado en las familias RP-IP, 9%. La frecuencia de mutaciones en *CRB1* en pacientes LCA varía entre diferentes estudios, entre el 1% en una cohorte de pacientes procedentes de países de todo el mundo (Hanein *et al.*, 2004) y el 16% en una cohorte mayoritariamente belga (Coppieters *et al.*, 2010b [41]). En el estudio de Vallespín *et al.*, 2007d [161], realizado en una cohorte española, también se observó un porcentaje del 16% y por lo tanto, ligeramente superior al del presente estudio, lo que podría deberse a la configuración de la cohorte. Aunque las prevalencias sean aparentemente similares, existen importantes diferencias en el espectro mutacional en *CRB1* entre las cohortes belga y española. La variante p.Cys948Tyr es una de las más habituales en la mayoría de poblaciones LCA (Bujakowska *et al.*, 2012) y es la más frecuente en población LCA española, representando el 31% de los alelos mutados en el trabajo de Vallespín *et al.*, 2007d [161], y un 27,8% en el presente estudio, mientras que en la población belga es la segunda más frecuente, con el 23% de los alelos mutados, siendo la p.Lys801\* la más frecuente, con un 27% de los alelos mutados. Sin embargo, en el presente estudio, p.Lys801\* sólo representó el 5,6% de los alelos mutados.

Beryozkin *et al.*, 2013 [22], realizaron un estudio en población palestina e israelí, hallando mutaciones responsables en *CRB1* en el 10% de casos de LCA. Es llamativo el hecho de que en dicho estudio no sólo no aparece la variante p.Cys948Tyr, sino que ninguna de las mutaciones observadas en ese estudio en familias LCA fueron observadas en la cohorte LCA del presente estudio. No se detalla si en el estudio hubo alguna familia LCA con antepasados sefardíes, pero aun así, los resultados parecen indicar que el espectro mutacional de la zona de Palestina e Israel es muy diferente del espectro mutacional europeo. También es notable el hecho de que la mayoría de las mutaciones detectadas son específicas de una familia

o de un grupo étnico, lo que se debe al alto índice de consanguinidad y de matrimonios confinados a grupos étnicos específicos en esa zona.

Se han asociado mutaciones en *CRB1* a diversos fenotipos de distrofias de retina, pero los análisis detallados de este gen se han limitado principalmente a cohortes de pacientes de LCA. Existen pocos estudios que se hayan centrado en la implicación del gen *CRB1* en RP-IP, posiblemente debido a la baja tasa de mutaciones en este gen observado en los primeros estudios realizados (Bernal *et al.*, 2003 [21]; den Hollander *et al.*, 2004 [76]). Las mutaciones en *CRB1* fueron causantes de alrededor del 2% de los casos de RP-IP en las cohortes españolas estudiadas en los trabajos previos de Vallespín *et al.*, 2007d, y Ávila Fernández *et al.*, 2010. Este porcentaje es similar a los observados en una cohorte holandesa por Hollander *et al.*, 2004, y en una cohorte francesa en por Bujakowska *et al.*, 2012.

Esta discrepancia respecto al porcentaje del 9% observado en el presente estudio podría deberse no sólo al uso de versiones más modernas del *microarray* APEX, que incluían mutaciones que habían sido descritas por primera vez en población española, sino también al análisis detallado del gen completo.

p.Cys948Tyr es la variante más común en pacientes RP-IP de todo el mundo (den Hollander *et al.*, 2004), y también lo fue en la cohorte RP-IP del presente estudio, con el 16,7% de los alelos mutados, una frecuencia menor que la observada en la cohorte LCA. Tras p.Cys948Tyr, el cambio más frecuente fue Ile1100Thr, con una frecuencia del 13% de los alelos mutados. Este cambio también se observó en la cohorte LCA (aunque con una frecuencia menor, del 8,7% de los alelos mutados). En la cohorte RP-IP del presente estudio hubo otros dos cambios especialmente frecuentes RP-IP, p.Ile167\_Gly169del y p.Thr745Met, con un frecuencia del 9,3% y del 11,1% de los alelos mutados, respectivamente. Es llamativo que ninguno de estos dos cambios se haya detectado en la cohorte LCA del presente estudio. En los estudios previamente publicados, sólo den Hollander *et al.*, 2004, observaron el cambio p.Thr745Met en un único paciente de LCA, mientras que no existen referencias publicadas sobre la detección de p.Ile167\_Gly169del en pacientes LCA. Por lo tanto, es muy probable que se trate de dos variantes características de RP-IP.

Tanto p.Ile167\_Gly169del como p.Ile1100Thr han sido descritos por primera vez en población española, y p.Ile167\_Gly169del no se ha observado en estudios en otras poblaciones. De hecho, 19 de los 25 cambios en *CRB1* detectados en la cohorte RP-IP del presente estudio, representando el 62,5% de los alelos mutados, han sido descritos por primera vez en pacientes españoles, lo que indica que en nuestra cohorte RP-IP existe una alta frecuencia de mutaciones que parecen ser específicas de la población española.

Es interesante mencionar que mientras en nuestra cohorte LCA la combinación más frecuente fue una mutación *missense* más otra mutación nula/LOF, observada en el 44,4% de las familias caracterizadas, en las familias RP-IP esta combinación tuvo una prevalencia sólo del 30% de las familias caracterizadas, siendo así la segunda más frecuente. La combinación más frecuente en las familias RP-IP fue de dos mutaciones *missense*, observada casi en el 50% de las familias caracterizadas. La segunda combinación más frecuente en las familias LCA, dos mutaciones nulas, se observó en el 27,8% de las familias caracterizadas. Este tipo de combinación no se observó en familias RP-IP. En cambio, la combinación de dos mutaciones *in-frame* y la combinación de una mutación *in-frame* con una mutación nula, sólo se observaron en familias

RP-IP. Esta distribución de combinaciones es coherente con la hipótesis de den Hollander *et al.*, 2001 [74], según la cual la LCA podría estar asociada a una pérdida completa de la función de la proteína *CRB1*, mientras que los afectos de RP podrían mantener alguna función residual de la proteína *CRB1*. Serían necesarios estudios funcionales para apoyar esta hipótesis; sin embargo, aun no han sido realizados.

Sin embargo, aunque en este estudio se hayan observado combinaciones de tipos de mutaciones y algunas variantes que sólo están presentes en familias LCA o sólo en familias RP-IP, es complicado establecer una clara correlación entre la presencia de unos alelos específicos y un fenotipo determinado, dado que la mayoría de alelos y combinaciones son comunes tanto a LCA como a RP-IP, lo que sugiere una influencia de otros factores como los ambientales o la implicación de modificadores genéticos en la sensibilidad e inicio de la enfermedad. Esta dificultad para establecer una correlación, también se refleja a nivel clínico, ya que en ocasiones es complicado clasificar a partir de los síntomas un caso como LCA o como RP-IP, y a veces se realizan diagnósticos erróneos.

Las mutaciones en *CRB1* han sido asociadas a distintos tipo de DR severas congénitas o de inicio precoz, con un amplio rango de manifestaciones clínicas [21, 72, 73, 67, 70, 97, 98]. Como muestra de esta variabilidad en el fenotipo en pacientes portadores de mutaciones en *CRB1*, en la cohorte del presente estudio hubo varios ejemplos de familias en las cuales aparecen casos de ambos fenotipos, causados por combinación de diferentes alelos en *CRB1* segregando en la misma familia

Un ejemplo lo representa la familia LCA-0038, que se comenzó a estudiar en trabajos anteriores (Vallespín *et al.*, 2007d [161]). En esta familia hay cuatro individuos afectados, uno con LCA y tres con RP-IP, pertenecientes a diferentes ramas familiares. En este estudio se identificaron tres mutaciones diferentes en *CRB1* (p.Cys896\*, p.Asp564Tyr y p.Ile1001Asn) segregando con la enfermedad en tres de los cuatro individuos afectados. En el presente trabajo se encontró una nueva variante *missense* adicional, p.Tyr1161Cys, en el cuarto individuo afecto, perteneciente a la subfamilia LCA-0038c. Así, todos los afectados de esta familia tienen dos mutaciones compuestas en heterocigosis en el gen *CRB1*, siendo p.Ile1001Asn la única mutación común a los cuatro afectados. El afecto con LCA es el único que presenta una combinación de un alelo LOF con un alelo *missense*.

Un segundo ejemplo es la familia RP-0069, donde hay tres individuos afectados pertenecientes a dos subfamilias. En la subfamilia RP-0069a hay dos hermanos afectados con síntomas similares a los de LCA, ambos con la mutación p.Cys948Tyr en homocigosis. Sin embargo, un primo lejano de estos dos hermanos, perteneciente a la subfamilia RP-0069b, tiene la mutación p.Cys948Tyr en heterocigosis junto con otra variante *missense*, p.Ile1100Thr, y muestra síntomas característicos de RP-IP, tal como describieron Bernal *et al.*, 2003 [21].

Esta variabilidad clínica asociada a heterogeneidad genética ha sido descrita en otras familias de DR con mutaciones en múltiples genes (Sánchez-Alcudia *et al.*, 2014 [128]).

### 5.3. ESTUDIO DEL GEN *NMNAT1*

El gen *NMNAT1* fue identificado como causante de LCA en los estudios de Koenekoop *et al.*, Chiang *et al.*, Falk *et al.* y Perrault *et al.*, todos publicados simultáneamente en 2012 [33, 53, 88, 122]. Destacar que en la familia LCA-0045 se detectaron mutaciones en *NMNAT1* mediante WES en un estudio realizado en



la misma época en la que se publicó la asociación de este gen con LCA (Corton *et al.*, 2013b [44]). Dada la prevalencia significativa de este gen (entre el 3,5% y 5%) en las cohortes LCA estudiadas en dichos trabajos, así como el hecho de que no existían estudios de la prevalencia del gen *NMNAT1* en la población española afectada de distrofias congénitas y de inicio precoz, fue lo que llevó a realizar un estudio detallado de este gen.

*NMNAT1* no estaba incluido en el *microarray* de genotipado LCA ni en el de ARRP, dado que la identificación fue posterior a la última actualización de estos chips. Por ello, y dado el pequeño tamaño de este gen (5 exones), se optó por secuenciar todas las regiones codificantes del gen y sus regiones adyacentes, mediante secuenciación Sanger.

Así, se seleccionaron 94 familias en total, 57 familias LCA y 37 familias RP con inicio muy precoz, en las que tras análisis anteriores no se detectó ninguna mutación. El estudio en *NMNAT1* llevó a la detección de dos variantes en 6 familias, todas ellas LCA, y una variante en 4 familias LCA y una familia clasificada como RP-IP.

Esto implica que *NMNAT1* fue el gen causante en el 4,6% (6/130) de las familias de la cohorte LCA del presente estudio. Este porcentaje es muy similar a los porcentajes de los estudios de Koenekoop *et al.*, 2012 (3,5%), Chiang *et al.*, 2012 (5%) y Falk *et al.*, 2012 (4,9%). En todos estos trabajos se estudiaron cohortes heterogéneas, procedentes de los cinco continentes. En el estudio de Perrault *et al.*, 2012, el porcentaje fue más alto, del 8,4%, en una cohorte principalmente francesa, pero también con pacientes de otros orígenes geográficos. En el estudio no se describe detalladamente la configuración y selección de la cohorte, por lo que es complicado analizar el porqué de este porcentaje más alto, aunque podría deberse simplemente a que la prevalencia de *NMNAT1* en la población francesa sea mayor. En un estudio posterior de Siemiakowska *et al.*, 2014a [133], el porcentaje fue más bajo, del 2,2%, también en una cohorte de origen heterogéneo (europeo, africano, asiático).

En el presente estudio se detectaron siete mutaciones diferentes, cinco de las cuales no habían sido descritas previamente. La mayoría de estas mutaciones (5/7) están localizadas en el exón 5, representando el 83,3% de los alelos mutados (10/12) en las familias caracterizadas. En todos los estudios mencionados más arriba, también se observó que la mayoría de alelos mutados se encontraban en el exón 5. De hecho, en el estudio de Siemiakowska *et al.*, 2014a, se menciona que aunque se hayan descrito mutaciones a lo largo de toda la secuencia codificante de *NMNAT1*, el 58% de ellas están localizadas en el exón 5.

En el exón 5 también está localizada la variante *missense* p.Glu257Lys previamente descrita (rs150726175; MAF=0,02%), que se ha detectado en heterocigosis en todas las 11 familias con variantes en *NMNAT1* del presente estudio, no estando presente en 192 individuos control. p.Glu257Lys fue también la variante más frecuente en todos los demás estudios, habiéndose detectado en pacientes de orígenes diversos, siempre en heterocigosis, excepto en un paciente de Arabia Saudí descrito por Koenekoop *et al.*, 2012. Sin embargo, Siemiakowska *et al.*, 2014b, detectaron esta variante en homocigosis tanto en un paciente con retraso mental, como en una hermana sana, sin que ninguno de los dos mostrara síntomas de afección ocular. Así, dichos autores sugieren que p.Glu257Lys podría ser una variante hipomórfica de penetrancia incompleta que, cuando segrega en heterocigosis compuesta con otra variante más severa en *NMNAT1*, causa LCA. También se sugirió que p.Glu257Lys y otras variantes poco severas,

podrían causar la enfermedad cuando se encontrasen en homocigosis y además hubiese otros factores que hiciesen que una o ambas copias del gen tuviesen una transcripción reducida.

Ello también implica que, tal como se ha observado, pueda haber personas sanas que tengan la variante p.Glu257Lys en homocigosis, por lo que tanto los casos donde sólo se detecte un alelo con esta variante y los casos donde esta variante se detecte en homocigosis, deben ser analizados con gran cautela, ya que las mutaciones responsables podrían estar en otro gen. Este es el caso de los cinco pacientes portadores de esta variante en nuestro estudio.

Por otra parte, entre las familias del presente estudio con dos variantes detectadas en *NMNAT1*, no ha habido ninguna combinación que haya aparecido en más de una familia. Sin embargo, la combinación p.Trp169\* + p.Glu257Lys, identificada en la familia LCA-0045, ha sido también descrita en cuatro pacientes con distintos orígenes (Chiang *et al.*, 2012): EE.UU., Canadá y Brasil. Por otro lado, la combinación p.Arg207Trp + p.Glu257Lys, que no fue detectada en nuestra cohorte, fue la más frecuente si se combinan los resultados de Siemiakowska *et al.*, 2014a, Koenekoop *et al.*, 2012, y Perrault *et al.*, 2012, y dado que sólo fue detectada en pacientes de origen francés, la variante p.Arg207Trp podría ser una mutación fundadora en la población francesa (Siemiakowska *et al.*, 2014a). Son necesarios más estudios en *NMNAT1* en población española para ver si existe alguna combinación de variantes con una prevalencia mayor y pueden existir mutaciones fundadoras, aunque nuestro estudio no parece indicarlo.

Es de destacar que la mayoría de pacientes de LCA con mutaciones causantes en *NMNAT1*, muestran una atrofia macular similar a un coloboma. Esta observación no sólo se ha dado en el presente estudio, donde cinco de las seis familias caracterizadas mostraban esta característica, sino en todos los estudios sobre mutaciones en *NMNAT1* en pacientes con LCA publicados hasta la actualidad. Aunque una atrofia macular de este tipo puede también estar presente en pacientes con otros genes causantes, esta observación común a todos los estudios lleva a sugerir que de observarse esta característica en un examen fundoscópico, *NMNAT1* esté entre los primeros genes a evaluar.

#### 5.4. OTRAS VARIANTES

En el estudio se detectaron otras variantes cuya patogenicidad no había sido claramente demostrada en la literatura previa y también variantes que no habían sido previamente descritas y no podían calificarse *a priori* como patógenicas.

En todos los casos se trata de variantes *missense*, que no han sido observadas junto a un segundo alelo patógeno, siendo éste un criterio fundamental para clasificarlas en este apartado. Otros criterios utilizados para valorar estas variantes fueron los ya descritos en el apartado 3.2.8, es decir, cosegregación, presencia en individuos control, conservación de la proteína y análisis *in silico*, a lo que hay que añadir la información disponible tanto en la literatura previa como en la base de datos de polimorfismos.

A continuación, se discute en detalle la naturaleza de cada una de estas variantes.



### 5.4.1. Variantes en *CRB1*

En el presente estudio se detectaron ocho variantes de significado incierto o polimorfismos raros en doce pacientes.

Dos de estas variantes (p.Leu599Pro y p.Ala872Thr) no habían sido descritas previamente en ningún estudio publicado. Además, hasta el momento, no se han publicado otros estudios donde se hayan detectado estas variantes.

El cambio **p.Leu599Pro** se identificó en un paciente LCA (LCA-0071), en el cual cosegregó con la enfermedad. La evaluación *in silico* no fue unánime, con dos programas clasificando el cambio como posiblemente dañino (PROVEAN: *score* -3.03, SIFT: *score* 0.01), y otros dos clasificándolo con una baja probabilidad de ser dañino (Align-GVGD: clase C15, PolyPhen-2: *score* 0.388). El residuo al que afecta esta variante no se conserva, y el nuevo residuo no está presente en ninguna de las especies evaluadas. Además, esta variante no fue detectada en 330 cromosomas control.

En estudios posteriores al presente, en los que se empleó secuenciación masiva, se detectó una variante *de novo* en heterocigosis en el gen *CRX*, y el paciente fue clasificado con una LCA de tipo dominante (manuscrito en preparación, Corton *et al.*). Esto podría llevar a inclinarse hacia que p.Leu599Pro sea una variante rara no patogénica, pero no se puede llegar a una conclusión clara sin más estudios detallados al respecto.

El cambio **p.Ala872Thr** se detectó en un paciente LCA (LCA-0034). No se pudo realizar el estudio familiar por falta de muestras de familiares, y este cambio no fue detectado en 330 cromosomas control. La evaluación *in silico* clasificó de forma consistente a este cambio como no dañino (Align-GVGD: clase C0, PolyPhen-2: *score* 0.001, PROVEAN: *score* -0.707, SIFT: *score* 0.64). Este cambio afecta a un residuo no conservado, estando el nuevo residuo presente en el conejo y la rana. Esto indica que podría tratarse de una variante rara no patogénica, pero son necesarios más estudios que soporten esta afirmación.

El cambio **p.Val162Met** se detectó en una sola familia (RP-1434). El residuo original al que afecta este cambio no se conserva, y el nuevo residuo estuvo presente en cinco de las especies evaluadas. La evaluación *in silico* clasificó consistentemente esta variante como no patogénica por cuatro herramientas de predicción distintas.

Este cambio fue descrito por primera vez en McKay *et al.*, 2005 [108], en una familia no consanguínea con seis afectos de atrofia coriorretiniana pigmentada paravenosa (PPCRA). En todos los afectos, estaba presente en heterocigosis y segregó con la enfermedad. Aunque existen muy pocos estudios publicados sobre PPCRA, en dicho estudio se consideró que podría tratarse de una enfermedad con un patrón de herencia dominante, y tras hipotetizar que el cambio afectaba a un enlace de hidrógeno que podría repercutir de forma importante en la proteína, p.Val162Met se consideró como causante de la enfermedad.

Este cambio también fue identificado en heterocigosis en un paciente en el estudio de O'Sullivan *et al.*, 2012 [113]. En dicho estudio estaban incluidos pacientes con diversas distrofias hereditarias de retina, y no se especifica qué diagnóstico tenía el afecto. El cambio se considera como probablemente patogénico, en base al estudio de McKay *et al.*, 2005.

Los resultados del análisis de conservación evolutiva y de la evaluación *in silico* del presente estudio, junto con el hecho de que no existan estudios donde esta variante se haya descrito en homocigosis o

acompañada por un segundo alelo patogénico, ni se haya asociado a arRP o a LCA, podrían hacer pensar que se trata de una variante rara no patogénica. Sin embargo, debe tenerse en cuenta la posibilidad de que esta variante cause enfermedades dominantes como adRP o PPCRA, tal y como apunta el estudio de McKay *et al.*, 2005. Por lo tanto, son necesarios más estudios que incluyan a esta variante poder llegar a una conclusión clara sobre su patogenicidad.

El cambio **p.Ile205Thr** se observó en cuatro familias, dos LCA (LCA-0012 y LCA-0042) y dos RP-IP (RP-0310 y RP-1317). Este cambio afecta a un residuo moderadamente conservado, no estando presente el nuevo residuo en las especies donde se evaluó la conservación. La evaluación *in silico* no fue concluyente. Además, no estuvo presente en 200 cromosomas control (Vallespín, 2008 [164]), incluidos en el presente estudio.

Sobre este cambio existe además una controversia sobre su patogenicidad, habiendo sido considerado como patogénico (Bernal *et al.*, 2003 [21], posiblemente patogénico o al menos con un papel modificador del fenotipo (Vallespín, 2008), o como un cambio raro no patogénico (den Hollander *et al.*, 2004 [76]; Booij *et al.*, 2005 [25]). En estos dos últimos estudios, también se vio que no cosegregaba con la enfermedad en una familia en cada estudio. En ninguno de los estudios mencionados ni en otros (Henderson *et al.*, 2010 [70]; Walia *et al.*, 2010 [169]), se encontró un segundo alelo mutado que acompañase al cambio p.Ile205Thr. Pero por otra parte, en ninguno de los individuos control de los estudios mencionados se encontró este cambio.

Ante todo esto, sigue sin poder determinarse con claridad la naturaleza de este cambio. Si bien una parte de los factores, como la no cosegregación con la enfermedad o la ausencia de un segundo alelo pueden inclinar a considerar este cambio como no patogénico, la ausencia en controles, así como el hecho de que este cambio aparezca con cierta frecuencia en pacientes de LCA en los diversos estudios realizados hasta ahora, hacen que la cuestión de la patogenicidad de p.Ile205Thr siga abierta, y requiera de más estudios detallados al respecto hasta que se pueda llegar a una conclusión clara. En contra de su patogenicidad, recientemente se ha detectado que la causa genética en la familia LCA-0012 se debe a mutaciones en un gen distinto.

El cambio **p.Thr289Met** fue detectado en un paciente RP-IP (RP-1179). Esta variante afecta a un residuo no conservado. El nuevo residuo está presente en el conejo, y además, esta variante fue detectada en el presente estudio en 1/165 individuos control, en heterocigosis. El análisis *in silico* clasificó de forma unánime a esta variante como no dañina.

Lotery *et al.*, 2001 [97], describieron por primera vez esta variante, en un paciente LCA en el que no se encontró un segundo alelo en *CRB1*. En Bernal *et al.*, 2003 [21], se observó esta variante en un paciente de origen español con diagnóstico de arRP, en el cual no segregó con la enfermedad ni se encontró un segundo alelo en *CRB1*, por lo que se concluyó que se trataba de una variante no patogénica. En den Hollander *et al.*, 2004, se detectó esta variante en un paciente con una distrofia de retina que no se especifica en la publicación, y en este caso, tampoco segregó con la enfermedad, por que lo también se concluyó se trataba de una variante no patogénica. Li *et al.*, 2011 [94], observaron esta variante en un paciente de LCA, y en base a otros estudios indicaban que podría tratarse de un cambio no patogénico.

Por lo tanto, lo visto en el presente estudio así como en los otros estudios indicados apunta a que se trata de una variante probablemente no patogénica.

El cambio **p.Asn894Ser**, que se observó en un paciente LCA (LCA-0066) y en un paciente RP-IP (RP-0457), afecta a un residuo moderadamente conservado, estado el nuevo residuo presente en proteínas ortólogas del pavo y la rana. La evaluación *in silico* tiende a clasificar este cambio como benigno, y la única herramienta que lo clasifica como deletéreo, PROVEAN, le asigna un *score* (-2.544) que está muy cerca del umbral (-2.5) que separa las variantes deletéreas de las neutras.

Además de en el presente estudio, este cambio sólo ha sido observado en los estudios de den Hollander *et al.*, 2001a [73] y 2004 [76], donde se observó en un único paciente RP-IP, en el que cosegregaba con la enfermedad, y no se observó en 90 individuos control. A pesar de esto, dado que no se encontró un segundo alelo, se consideraba la posibilidad de que no fuese patogénico.

El hecho de que el residuo afectado se conserve débilmente, junto a que nuevo residuo esté presente en otras especies, así como la evaluación *in silico*, indican que podría tratarse de una variante rara posiblemente no patogénica, aunque el ínfimo número de pacientes con esta variante de los que se informa en los estudios realizados hasta el momento no ayuda a clarificar la naturaleza de esta variante.

El cambio **p.Arg905Gln** se detectó en un paciente RP-IP (RP-0137), en el cual no cosegregó con la enfermedad (Vallespin *et al.*, 2007d [161]). El residuo afectado no se conserva y además sólo está presente en la proteína humana. El nuevo residuo no está presente en ninguna de las especies evaluadas. Todos los programas empleados en el análisis *in silico* clasificaron este cambio como no dañino (Align-GVGD: clase C0, PolyPhen-2: *score* 0.166, PROVEAN: *score* 0.16, SIFT: *score* 0.08).

den Hollander *et al.*, 2004, describieron por primera vez esta variante en un paciente con una distrofia de retina que no se especifica en la publicación. En este paciente no se encontró un segundo alelo en *CRB1* y el cambio no cosegregó con la enfermedad, por lo que se clasificó este cambio como no patogénico. Bujakowska *et al.*, 2012 [28], detectaron este cambio en un paciente francés con RP, en el que el cambio tampoco cosegregó con la enfermedad, ni se encontró un segundo alelo, y el cambio se clasificó como probablemente no patogénico. Así, probablemente se trate de una variante rara no patogénica.

La variante **p.Arg1331His** fue observada en un único paciente RP-IP (RP-0617). Esta variante afecta a un residuo débilmente conservado, y el nuevo residuo está presente en el orangután de Sumatra y la rana. Tres de las cuatro herramientas de análisis *in silico* clasificaron este cambio como no dañino (Align-GVGD: clase C0, PROVEAN: *score* -1.709, SIFT: *score* 0.19) y sólo una como posiblemente dañino (PolyPhen-2: *score* 0.465)

Lotery *et al.*, 2001, describieron por primera vez esta variante en un individuo control, en heterocigosis. En den Hollander *et al.*, 2004, y Bujakowska *et al.*, 2012, también se menciona este cambio, aunque sin dar detalles de en qué pacientes se observó, y en ambos casos se consideró a esta variante como no patogénica debido a que no cosegregó con la enfermedad, ni se encontró un segundo alelo en *CRB1*, y estaba presente en controles. Por lo tanto, existe una alta probabilidad de que se trate de una variante rara no patogénica.

Por último, es interesante comentar el caso de la variante **p.Ile167\_Gly169del**. Esta variante fue descrita por primera vez por Vallespín *et al.*, 2006a [159], habiendo sido clasificada como patogénica. De hecho, como ya se ha expuesto, fue una de las variantes más frecuentes en la cohorte RP-IP del presente estudio, estando presente en cinco familias en heterocigosis, siempre acompañada de variantes patogénicas. Además, hasta el momento esta variante sólo se ha observado en pacientes españoles RP-IP.

Sin embargo, también en el presente estudio, hubo una sexta familia, la RP-1426, en la cual esta variante fue detectada en homocigosis. Se trata del primer caso documentado en el que se detecta esta variante en homocigosis. En esta familia, p.Ile167\_Gly169del estaba presente en homocigosis tanto en el individuo afecto como en tres hermanos sanos, no segregando con la enfermedad.

Esto lleva a pensar que se trate de una mutación hipomórfica, hipótesis también planteada en por Sánchez-Alcudia *et al.*, 2014 [128]. Se trataría así de un caso similar al de la variante p.Glu257Lys en *NMNAT1*, que provoca LCA (véase el apartado 5.3), si bien son necesarios estudios más detallados sobre p.Ile167\_Gly169del y en cohortes más amplias para poder confirmar esta hipótesis.

#### 5.4.2. Variantes en *AIPL1*

El cambio p.Arg324Leu se encontró en una única familia (LCA-0131). Afecta a un residuo no conservado, no estando el nuevo residuo presente en ninguna de las especies evaluadas. La evaluación *in silico* no fue concluyente, con dos programas clasificando esta variante como dañina (PROVEAN y SIFT) y otros dos como benigna (Align GVGD y Polyphen-2).

Este cambio fue descrito por primera vez en el estudio de Wiszniewski *et al.*, 2011 [178], en dos pacientes LCA. En uno de estos dos pacientes, se encontraron dos alelos patogénicos en el gen *RPE65*, mientras que en el otro paciente no se encontraron más cambios que p.Arg324Leu.

En Tan *et al.*, 2012 [153], basándose en que esta variante estaba presente en su panel de controles, que no parecía tener efecto sobre el *splicing* y en un análisis *in silico*, se consideró que se trataba de un SNP. Todo esto indica que se podría tratar de una variante posiblemente no patogénica.

La variante c.1126C>T; p.Pro376Ser se encontró en una sola familia (LCA-0091). Esta variante, que afecta a un residuo no conservado, se consideró como mutación en Sohocki *et al.*, 2000 [139]. Sin embargo, la secuenciación de todos los exones y regiones de *splicing* del gen *AIPL1* no mostró ningún cambio de secuencia adicional en el ADN del afecto. Posteriormente, el paciente se analizó con la técnica de MLPA con el fin de identificar posibles deleciones o duplicaciones de uno o varios exones del gen *AIPL1*. Para ello, se empleó el *kit* SALSA MLPA KIT P221 LCA mix-1, que para el *AIPL1* contiene una sonda para cada uno de los 6 exones del gen, y además una sonda adicional para el exón 6.

Tras estos análisis, no se detectó ningún cambio que pudiera afectar la región codificante del gen. A ello hay que sumar que el análisis *in silico* clasificó consistentemente esta variante como no patogénica (Align-GVGD: clase C0, PolyPhen-2: *score* 0.001, PROVEAN: *score* 0.053, SIFT: *score* 0.155), y que en Tan *et al.*, 2012, se clasificó esta variante como polimorfismo, variante que consta en dbSNP (rs61757484) con un MAF del 1,52%. Por lo tanto, la variante c.1126C>T; p.Pro376Ser muy probablemente no es patogénica.

### 5.4.3. Variantes en *CRX*

El cambio p.Tyr142Cys fue identificado en un único paciente (LCA-0131). Afecta a un residuo moderadamente conservado. En el análisis *in silico*, este cambio fue calificado como dañino por Polyphen-2 (*score* 0.993) y PROVEAN (*score* -3.05), mientras que Align GVGD lo situó en un nivel intermedio de su escala (clase C35) y sólo SIFT lo calificó como no dañino (*score* 0.17).

Este cambio fue descrito por primera vez en una comunicación personal de Kaplan, 2004. En el estudio de Yzer *et al.*, 2006 [185], se observó el cambio en sólo un paciente LCA, donde estaba presente en heterocigosis. Sin embargo, la madre sana de dicho paciente tenía este mismo cambio en homocigosis, lo que permitió llegar a la conclusión de que se trata de un cambio no patogénico.

Esto se ve apoyado por el hecho de que en Vallespín, 2008 [164], el cambio fue observado en dos familias RP-IP, y aunque se secuenció el gen *CRX*, en ninguna de las dos se encontró un segundo alelo. En el estudio de Eisenberger *et al.*, 2013 [52], este cambio se encontró en un paciente arRP junto a otro cambio *missense*, y se concluyó que ambos eran benignos. Este mismo paciente tenía un alelo mutado en *TULP1*, y no se pudo localizar un segundo alelo mutado. Por lo tanto, probablemente se trate de una variante no patogénica.

### 5.4.4. Variantes en *RPGRIP1*

El cambio p.Ile1120Val se observó en sólo un paciente (LCA-0049). Este cambio afecta a un residuo débilmente conservado estando el nuevo residuo presente en la rana y el pez cebra. El análisis *in silico* calificó unánimemente esta variante como benigna. La secuenciación de los exones del gen *RPGRIP1* no detectó la presencia de una segunda variante. Este cambio fue descrito por primera vez en una familia RP-IP por Vallespín *et al.*, 2007d [161], mientras que en Song *et al.*, 2011 [141], se encontró en un paciente con síndrome de Usher. No se informa sobre un segundo alelo en ninguno de los dos pacientes. En el estudio de Vallespín *et al.*, 2007d, se indica que no se ha probado la patogenicidad de esta variante, mientras que en el estudio de Song *et al.*, 2011, se da por hecho de que se trata de una variante patogénica, en base a la entrada de HGMD. Lo observado en el presente estudio apunta a que posiblemente se trate de una variante rara no patogénica, pero se requieren más estudios con pacientes que tengan este cambio para poder determinar con más seguridad la naturaleza de este cambio.

## 5.5. EVALUACIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS

En el presente estudio se han caracterizado el 30,8% de las familias LCA estudiadas, a lo que hay que añadir un 10% de familias en las que se encontró sólo una mutación, haciendo un total de 40,8% familias con mutaciones detectadas.

Por genes, los más frecuentes fueron *CRB1*, *NMNAT1* y *CEP290*, detectados respectivamente en el 13,8%, el 7,7% y el 6,9% de las familias con mutaciones. Estos resultados confirman, como se vio en el estudio anterior de Vallespín, 2008 [164], que *CRB1* es el gen más prevalente entre los afectados de LCA españoles, a la vez que muestran la importancia de *NMNAT1*. Estos dos genes ya se discutieron en detalle en apartados anteriores, y como allí se mencionó, su prevalencia porcentual es similar a la de otras poblaciones, fundamentalmente europeas y norteamericanas.

Ahora bien, comparada con otras poblaciones las frecuencias de genes de la población española afecta de LCA presentan notables variaciones. Así, en una población mediterránea como la italiana, Simonelli *et al.*, 2007 [136], vieron que *RPE65* y *CRB1* fueron los genes más frecuentes (8,4% y 7,4% de las familias, respectivamente). En la población belga los genes más frecuentes son *CEP290* (30% de las familias) y *CRB1* (16% de las familias) (Coppieters *et al.*, 2010b [41]). En una cohorte del sur de India, Verma *et al.*, 2013 [167], detectaron mutaciones en *RPE65* en el 16,6% de las familias, y en el *GUCY2D* en el 10%, siendo llamativo que no detectasen ninguna mutación en *CRB1*. Sí se detectó *CRB1* en la cohorte china estudiada por Chen *et al.*, 2013 [32], estando presente en el 7% de las familias, por detrás de *GUCY2D*, que estuvo presente en el 10% de las familias. Por el contrario, en nuestra cohorte no se han detectado mutaciones *GUCY2D* y el porcentaje de mutaciones en *CEP290* es bastante inferior al observado en población centroeuropea.

En cuanto al espectro mutacional, las ya mencionadas p.Cys948Tyr en *CRB1* y p.Glu257Lys en *NMNAT1* fueron las mutaciones más frecuentes en la cohorte LCA de este estudio, ambas con un 9% de los alelos mutados (10/111). La segunda mutación más frecuente fue p.Cys998\* en *CEP290*, con un 7,2% de los alelos mutados (8/111). Todas estas mutaciones han sido descritas en otras poblaciones, y son mutaciones muy frecuentes. Esto indica que en la población LCA española no hay variantes fundadoras de especial relevancia.

En el presente trabajo también se estudiaron 290 familias RP-IP españolas en busca de variantes en el gen *CRB1*, y en 37 de ellas también se buscaron mutaciones en el gen *NMNAT1*. En este último gen se halló sólo un alelo mutado, con la variante p.Glu257Lys. En *CRB1* la mutación más frecuente fue también p.Cys948Tyr, con el 16,7% (9/54) de los alelos mutados, mientras que la segunda mutación más frecuente fue p.Ile1100Thr, con el 13% (7/54) de los alelos mutados. A diferencia de las otras variantes, p.Ile1100Thr sólo ha sido descrita en población española hasta el momento, mayoritariamente en pacientes RP-IP, lo que indica que podría tratarse de una mutación fundadora.

Veintisiete variantes han sido descritas por primera vez en el presente estudio, 16 de ellas en la cohorte LCA y 11 en la cohorte RP-IP. Todas las nuevas variantes descritas en la cohorte RP-IP se localizan en el gen *CRB1*, y son mayoritariamente *missense*. En la cohorte LCA, 15 de las 16 nuevas variantes se localizan en los genes *CRB1*, *NMNAT1* y *RPE65*, con 5 variantes en cada uno de ellos.

De las nuevas variantes encontradas, sólo se encontró un alelo en todos los casos, excepto para la variante p.Met1053Val, que se encontró en heterocigosis en dos familias RP-IP. Por lo tanto, son necesarios más estudios para determinar si alguna de estas nuevas variantes es específica de la población española y si alguna de ellas es específica de LCA o de RP-IP o por el contrario están implicadas en otras DR.

## 5.6. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

En cuanto a las técnicas utilizadas, el *microarray* APEX de genotipado demostró ser muy efectivo como primera herramienta de cribado de mutaciones conocidas. Tanto para la confirmación de mutaciones como la detección de nuevas mutaciones, la secuenciación Sanger fue la herramienta fundamental.



Para complementar a la secuenciación Sanger y como cribado previo, además del *microarray* APEX utilizaron otras técnicas. Una de estas técnicas es el mapeo de homocigosidad permite detectar de forma efectiva regiones en homocigosis, tanto en genes conocidos, como otras que podrían albergar *loci* responsables de la enfermedad pero que todavía no han sido descritos, lo que es importante en enfermedades con gran heterogeneidad genética como la LCA. La eficacia de esta aproximación mediante el mapeo de homocigosidad en el caso de LCA y RP, ha quedado demostrada en estudios previos [78, 39]. Además, es de reseñar, que esta técnica no sólo es adecuada para el estudio de pacientes de familias consanguíneas, sino que también permite la identificación en familias aparentemente no consanguíneas portadoras de alelos en homocigosis.

Otra técnica que se usó en este estudio fue HRM para el cribado del gen *CRB1*. Esta técnica puede ser un buen complemento al estudio mediante *microarray* APEX y como paso previo a una secuenciación Sanger, especialmente cuando se trata de genes muy grandes como *CRB1*, reduciendo el tiempo y el coste del análisis. HRM permite detectar nuevas mutaciones, y en el presente estudio permitió detectar el 25% de las nuevas variantes que se detectaron en *CRB1*. Sin embargo, el hecho de que esta técnica no permitiese detectar la variante más común en población española afecta de LCA o RP-IP, p.Cys948Tyr, es un importante factor en contra de su aplicación como herramienta eficiente para la identificación de variantes en esta población. No se ha comprobado la eficacia de la técnica de HRM en otros genes implicados en LCA, aunque sí se está utilizando como método rápido para el estudio de la frecuencia de VUS o nuevas variantes en población control (Fernández San José *et al.*, 2015 [54]).

Esta combinación de técnicas permitió, como ya se ha mencionado, caracterizar el 37,7% de las familias españolas LCA estudiadas. Por lo tanto, un 62,3% de familias de la cohorte estudiada no se han podido caracterizar, lo que es también reflejo de la gran heterogeneidad genética de LCA. En el presente trabajo, la cohorte de familias RP-IP sólo ha sido sometida al estudio de los genes *CRB1* y *NMNAT1*, pero RP-IP también es una patología de gran heterogeneidad genética.

Todas las familias que todavía no se han conseguido caracterizar, ya sea porque sólo se ha detectado una mutación o porque no se ha detectado ninguna, están siendo o van a ser sometidas a sucesivos estudios en trabajos que recogen el testigo del presente trabajo. La cohorte de pacientes RP-IP se ha cribado para genes conocidos como *RP1* (Ávila Fernández *et al.*, 2012 [13]), así como en el estudio de nuevos genes asociados a RP que han sido identificados por nuestro grupo como *ABHD12* (Nishiguchi, Ávila Fernández, van Huet *et al.*, 2012 [111]) y *ZNF408* (Ávila Fernández, Pérez Carro *et al.*, 2015 [14]).

Estos trabajos cuentan con nuevas e importantes herramientas, como son las técnicas de nueva generación o NGS, que permiten la secuenciación completa de grandes fragmentos. Así, se pueden secuenciar numerosos genes simultáneamente al completo, es decir, incluyendo secuencias tanto exónicas como intrónicas. Esto supone una nueva era en el estudio de patologías como LCA y RP-IP, y permite agilizar y aumentar la efectividad del diagnóstico de los pacientes.

## **6. CONCLUSIONES**



1. Las mutaciones en *CRB1* representan la principal causa de LCA y RP-IP en la población española.
2. Las mutaciones en *NMNAT1* y *CEP290*, son responsables de LCA en la población española con una alta frecuencia, en ambos casos alrededor del 5%.
3. Las mutaciones más frecuentes en la población LCA española (p.Cys948Tyr en *CRB1*, p.Glu257Lys en *NMNAT1* y p.Cys998\* en *CEP290*) también han sido descritas en otras poblaciones, no existiendo mutaciones fundadoras específicas de la población española.
4. En la población RP-IP española con mutaciones causantes en *CRB1*, la mutación más frecuente (p.Cys948Tyr) ha sido descrita en otras poblaciones. Existen también otras mutaciones frecuentes (p.Ile1100Thr y p.Ile167\_Gly169del) que podrían ser específicas de la población española.
5. Tanto en el presente estudio como en estudios anteriores realizados en la población española se ha descrito un gran número de nuevas variantes, pero todas ellas con una baja frecuencia. Esto parece indicar que la población española tiene un espectro mutacional más heterogéneo que otras poblaciones. Serían necesarios más estudios para confirmar cuáles de estas mutaciones son específicas de la población española.
6. Para el caso del gen *CRB1*, en la presente cohorte no ha sido posible establecer una clara correlación entre la presencia de unos alelos específicos y un fenotipo determinado, dado que la mayoría de alelos y combinaciones son comunes tanto a LCA como a RP-IP. Ello sugiere una influencia de otros factores como los ambientales o la implicación de modificadores genéticos en la gravedad de la enfermedad.
7. La gran heterogeneidad genética observada en ambas cohortes, hacen que el *microarray* de genotipado sólo sea efectivo como primera herramienta de cribado, y necesite ser complementado por otras técnicas; ninguna de estas técnicas fue especialmente efectiva, lo que impidió diseñar un algoritmo de aplicación sencilla y efectividad generalizada en la práctica clínica.
8. La aparición de las técnicas NGS combinadas con nuevas herramientas bioinformáticas abren una nueva era en el estudio de enfermedades con una alta heterogeneidad genética como son las DR y esto no sólo revolucionará la práctica de investigación, sino también la práctica clínica.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## A

1. Aboshiha, J.; Dubis, A. M.; van der Spuy, J.; Nishiguchi, K. M.; Cheeseman, E. W.; Ayuso, C.; Ehrenberg, M.; Simonelli, F.; Bainbridge, J. W.; y Michaelides, M. (2015). Preserved outer retina in AIPL1 Leber's congenital amaurosis: implications for gene therapy. *Ophthalmology*, 122(4), 862-864.
2. Abu-Safieh, L.; Alrashed, M.; Anazi, S.; Alkuraya, H.; Khan, A. O.; Al-Owain, M.; Al-Zahrani, J.; Al-Abdi, L.; Hashem, M.; Al-Tarimi, S.; Sebai, M.-A.; Shamia, A.; Ray-Zack, M. D.; Nassan, M.; Al-Hassnan, Z. N.; Rahbeeni, Z.; Waheeb, S.; Alkharashi, A.; Abboud, E.; Al-Hazzaa, S. A. F.; et al. (2013). Autozygome-guided exome sequencing in retinal dystrophy patients reveals pathogenetic mutations and novel candidate disease genes. *Genome Research*, 23(2), 236-247.
3. Acland, G. M.; Aguirre, G. D.; Ray, J.; Zhang, Q.; Aleman, T. S.; Cideciyan, A. V.; Pearce-Kelling, S. E.; Anand, V.; Zeng, Y.; Maguire, A. M.; Jacobson, S. G.; Hauswirth, W. W.; y Bennett, J. (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nature Genetics*, 28(1), 92-95.
4. Acland, G. M.; Aguirre, G. D.; Bennett, J.; Aleman, T. S.; Cideciyan, A. V.; Bencicelli, J.; Dejneka, N. S.; Pearce-Kelling, S. E.; Maguire, A. M.; Palczewski, K.; Hauswirth, W. W.; y Jacobson, S. G. (2005). Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 12(6), 1072-1082.
5. Adzhubei, I. A.; Schmidt, S.; Peshkin, L.; Ramensky, V. E.; Gerasimova, A.; Bork, P.; Kondrashov, A. S.; y Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, 7(4), 248-249.
6. Aldahmesh, M. A.; Al-Owain, M.; Alqahtani, F.; Hazzaa, S.; y Alkuraya, F. S. (2010). A null mutation in CABP4 causes Leber's congenital amaurosis-like phenotype. *Molecular Vision*, 16, 207-212.
7. Alonso-Alonso, M. L.; y Srivastava, G. K. (2015). Current focus of stem cell application in retinal repair. *World Journal of Stem Cells*, 7(3), 641-648.
8. Anasagasti, A.; Barandika, O.; Irigoyen, C.; Benitez, B. A.; Cooper, B.; Cruchaga, C.; López de Munain, A.; y Ruiz-Ederra, J. (2013). Genetic highthroughput screening in retinitis pigmentosa based on high resolution melting (HRM) analysis. *Experimental Eye Research*.
9. Arévalo, F. (2007). *Retina médica: temas selectos* (1ª ed.). Caracas (Venezuela): Amolca.
10. Ávila-Fernández, A.; Cantalapedra, D.; Aller, E.; Vallespín, E.; Aguirre-Lambán, J.; Blanco-Kelly, F.; Corton, M.; Riveiro-Álvarez, R.; Allikmets, R.; Trujillo-Tiebas, M. J.; Millán, J. M.; Cremers, F. P. M.; y Ayuso, C. (2010). Mutation analysis of 272 Spanish families affected by autosomal recessive retinitis pigmentosa using a genotyping microarray. *Molecular Vision*, 16, 2550-2558.
11. Ávila-Fernández, A.; Cortón, M.; López-Molina, M. I.; Martín-Garrido, E.; Cantalapedra, D.; Fernández-Sánchez, R.; Blanco-Kelly, F.; Riveiro-Álvarez, R.; Tatu, S. D.; Trujillo-Tiebas, M. J.; García-Sandoval, B.; Ayuso, C.; y Cremers, F. P. M. (2011). Late onset retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*, 118(12), 2523-2524.
12. Ávila Fernández, A. (2011). *Caracterización clínica y genética de familias españolas afectadas de retinosis pigmentaria casos recesivos y esporádicos* (Tesis Doctoral). Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
13. Ávila-Fernandez, A.; Cortón, M.; Nishiguchi, K. M.; Muñoz-Sanz, N.; Benavides-Mori, B.; Blanco-Kelly, F.; Riveiro-Álvarez, R.; García-Sandoval, B.; Rivolta, C.; y Ayuso, C. (2012). Identification of an RP1 prevalent founder mutation and related phenotype in Spanish patients with early-onset autosomal recessive retinitis. *Ophthalmology*, 119(12), 2616-2621.

14. Ávila-Fernández, A.; Perez-Carro, R.; Cortón, M.; López-Molina, M. I.; Campello, L.; Garanto, A.; Fernandez-Sanchez, L.; Duijkers, L.; López-Martínez, M. A.; Riveiro-Álvarez, R.; Da Silva, L. R. J.; Sánchez-Alcudia, R.; Martín-Garrido, E.; Reyes, N.; García-García, F.; Dopazo, J.; García-Sandoval, B.; Collin, R. W. J.; Cuenca, N.; y Ayuso, C. (2015). Whole-exome sequencing reveals ZNF408 as a new gene associated with autosomal recessive retinitis pigmentosa with vitreal alterations. *Human Molecular Genetics*, 24(14), 4037-4048.
15. Ayuso, C.; y Millán, J. M. (2010). Retinitis pigmentosa and allied conditions today: a paradigm of translational research. *Genome Medicine*, 2(5), 34.
16. Azadi, S.; Molday, L. L.; y Molday, R. S. (2010). RD3, the protein associated with Leber congenital amaurosis type 12, is required for guanylate cyclase trafficking in photoreceptor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(49), 21158-21163.

## B

17. Bainbridge, J. W. B.; Smith, A. J.; Barker, S. S.; Robbie, S.; Henderson, R.; Balaggan, K.; Viswanathan, A.; Holder, G. E.; Stockman, A.; Tyler, N.; Petersen-Jones, S.; Bhattacharya, S. S.; Thrasher, A. J.; Fitzke, F. W.; Carter, B. J.; Rubin, G. S.; Moore, A. T.; y Ali, R. R. (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *The New England Journal of Medicine*, 358(21), 2231-2239.
18. Bainbridge, J. W. B.; Mehat, M. S.; Sundaram, V.; Robbie, S. J.; Barker, S. E.; Ripamonti, C.; Georgiadis, A.; Mowat, F. M.; Beattie, S. G.; Gardner, P. J.; Feathers, K. L.; Luong, V. A.; Yzer, S.; Balaggan, K.; Viswanathan, A.; de Ravel, T. J. L.; Casteels, I.; Holder, G. E.; Tyler, N.; Fitzke, F. W.; et al. (2015). Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis. *The New England Journal of Medicine*, 372(20), 1887-1897.
19. Bemelmans, A.-P.; Kostic, C.; Crippa, S. V.; Hauswirth, W. W.; Lem, J.; Munier, F. L.; Seeliger, M. W.; Wenzel, A.; y Arsenijevic, Y. (2006). Lentiviral gene transfer of RPE65 rescues survival and function of cones in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *PLoS medicine*, 3(10), e347.
20. Berger, W.; Kloeckener-Gruissem, B.; y Neidhardt, J. (2010). The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*, 29(5), 335-375.
21. Bernal, S.; Calaf, M.; Garcia-Hoyos, M.; Garcia-Sandoval, B.; Rosell, J.; Adan, A.; Ayuso, C.; y Baiget, M. (2003). Study of the involvement of the RGR, CRPB1, and CRB1 genes in the pathogenesis of autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Journal of Medical Genetics*, 40(7), e89.
22. Beryozkin, A.; Zelinger, L.; Bandah-Rozenfeld, D.; Harel, A.; Strom, T. A.; Merin, S.; Chowers, I.; Banin, E.; y Sharon, D. (2013). Mutations in CRB1 are a relatively common cause of autosomal recessive early-onset retinal degeneration in the Israeli and Palestinian populations. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(3), 2068-2075.
23. Blanco-Kelly, F.; García-Hoyos, M.; Cortón, M.; Avila-Fernández, A.; Riveiro-Álvarez, R.; Giménez, A.; Hernan, I.; Carballo, M.; y Ayuso, C. (2012). Genotyping microarray: mutation screening in Spanish families with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Molecular Vision*, 18, 1478-1483.
24. Boldt, K.; Mans, D. A.; Won, J.; van Reeuwijk, J.; Vogt, A.; Kinkl, N.; Letteboer, S. J. F.; Hicks, W. L.; Hurd, R. E.; Naggert, J. K.; Texier, Y.; den Hollander, A. I.; Koenekoop, R. K.; Bennett, J.; Cremers, F. P. M.; Gloeckner, C. J.; Nishina, P. M.; Roepman, R.; y Ueffing, M. (2011). Disruption of intraflagellar protein transport in photoreceptor cilia causes Leber congenital amaurosis in humans and mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6), 2169-2180.
25. Booij, J. C.; Florijn, R. J.; ten Brink, J. B.; Loves, W.; Meire, F.; van Schooneveld, M. J.; de Jong, P. T. V. M.; y Bergen, A. a. B. (2005). Identification of mutations in the AIPL1, CRB1, GUCY2D, RPE65, and RPGRIP1 genes in patients with juvenile retinitis pigmentosa. *Journal of Medical Genetics*, 42(11), e67.

26. Bowne, S. J.; Sullivan, L. S.; Mortimer, S. E.; Hedstrom, L.; Zhu, J.; Spellicy, C. J.; Gire, A. I.; Hughbanks-Wheaton, D.; Birch, D. G.; Lewis, R. A.; Heckenlively, J. R.; y Daiger, S. P. (2006). Spectrum and frequency of mutations in IMPDH1 associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa and leber congenital amaurosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47(1), 34-42.
27. Brea-Fernández, A. J.; Pomares, E.; Brión, M. J.; Marfany, G.; Blanco, M. J.; Sánchez-Salorio, M.; González-Duarte, R.; y Carracedo, A. (2008). Novel splice donor site mutation in MERTK gene associated with retinitis pigmentosa. *The British Journal of Ophthalmology*, 92(10), 1419-1423.
28. Bujakowska, K.; Audo, I.; Mohand-Saïd, S.; Lancelot, M.-E.; Antonio, A.; Germain, A.; Léveillard, T.; Letexier, M.; Saraiva, J.-P.; Lonjou, C.; Carpentier, W.; Sahel, J.-A.; Bhattacharya, S. S.; y Zeitze, C. (2012). CRB1 mutations in inherited retinal dystrophies. *Human Mutation*, 33(2), 306-315.
29. Burnight, E. R.; Wiley, L. A.; Drack, A. V.; Braun, T. A.; Anfinson, K. R.; Kaalberg, E. E.; Halder, J. A.; Affatigato, L. M.; Mullins, R. F.; Stone, E. M.; y Tucker, B. A. (2014). CEP290 gene transfer rescues Leber congenital amaurosis cellular phenotype. *Gene Therapy*, 21(7), 662-672.

## C

30. de Castro-Miró, M.; Pomares, E.; Lorés-Motta, L.; Tonda, R.; Dopazo, J.; Marfany, G.; y González-Duarte, R. (2014). Combined genetic and high-throughput strategies for molecular diagnosis of inherited retinal dystrophies. *PloS One*, 9(2), e88410.
31. Chang, B.; Khanna, H.; Hawes, N.; Jimeno, D.; He, S.; Lillo, C.; Parapuram, S. K.; Cheng, H.; Scott, A.; Hurd, R. E.; Sayer, J. A.; Otto, E. A.; Attanasio, M.; O'Toole, J. F.; Jin, G.; Shou, C.; Hildebrandt, F.; Williams, D. S.; Heckenlively, J. R.; y Swaroop, A. (2006). In-frame deletion in a novel centrosomal/ciliary protein CEP290/NPHP6 perturbs its interaction with RPGR and results in early-onset retinal degeneration in the rd16 mouse. *Human Molecular Genetics*, 15(11), 1847-1857.
32. Chen, Y.; Zhang, Q.; Shen, T.; Xiao, X.; Li, S.; Guan, L.; Zhang, J.; Zhu, Z.; Yin, Y.; Wang, P.; Guo, X.; Wang, J.; y Zhang, Q. (2013). Comprehensive mutation analysis by whole-exome sequencing in 41 Chinese families with Leber congenital amaurosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(6), 4351-4357.
33. Chiang, P.-W.; Wang, J.; Chen, Y.; Fu, Q.; Zhong, J.; Chen, Y.; Yi, X.; Wu, R.; Gan, H.; Shi, Y.; Chen, Y.; Barnett, C.; Wheaton, D.; Day, M.; Sutherland, J.; Heon, E.; Weleber, R. G.; Gabriel, L. A. R.; Cong, P.; Chuang, K.; et al. (2012). Exome sequencing identifies NMNAT1 mutations as a cause of Leber congenital amaurosis. *Nature Genetics*, 44(9), 972-974.
34. Choi, Y.; Sims, G. E.; Murphy, S.; Miller, J. R.; y Chan, A. P. (2012). Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PloS One*, 7(10), e46688.
35. Cideciyan, A. V.; Aleman, T. S.; Jacobson, S. G.; Khanna, H.; Sumaroka, A.; Aguirre, G. K.; Schwartz, S. B.; Windsor, E. A. M.; He, S.; Chang, B.; Stone, E. M.; y Swaroop, A. (2007). Centrosomal-ciliary gene CEP290/NPHP6 mutations result in blindness with unexpected sparing of photoreceptors and visual brain: implications for therapy of Leber congenital amaurosis. *Human Mutation*, 28(11), 1074-1083.
36. Cideciyan, A. V.; Aleman, T. S.; Boye, S. L.; Schwartz, S. B.; Kaushal, S.; Roman, A. J.; Pang, J.-J.; Sumaroka, A.; Windsor, E. A. M.; Wilson, J. M.; Flotte, T. R.; Fishman, G. A.; Heon, E.; Stone, E. M.; Byrne, B. J.; Jacobson, S. G.; y Hauswirth, W. W. (2008). Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), 15112-15117.
37. Cideciyan, A. V. (2010). Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy. *Progress in Retinal and Eye Research*, 29(5), 398-427.

38. Cideciyan, A. V.; Jacobson, S. G.; Beltran, W. A.; Sumaroka, A.; Swider, M.; Iwabe, S.; Roman, A. J.; Olivares, M. B.; Schwartz, S. B.; Komáromy, A. M.; Hauswirth, W. W.; y Aguirre, G. D. (2013). Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(6), E517-525.
39. Collin, R. W.; den Hollander, A. I.; van der Velde-Visser, S. D.; Bennicelli, J.; Bennett, J.; y Cremers, F. P. (2012). Antisense Oligonucleotide (AON)-based Therapy for Leber Congenital Amaurosis Caused by a Frequent Mutation in CEP290. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 1, e14.
40. Coppieeters, F.; Lefever, S.; Leroy, B. P.; y De Baere, E. (2010a). CEP290, a gene with many faces: mutation overview and presentation of CEP290base. *Human Mutation*, 31(10), 1097-1108.
41. Coppieeters, F.; Casteels, I.; Meire, F.; De Jaegere, S.; Hooghe, S.; van Regemorter, N.; Van Esch, H.; Matuleviciene, A.; Nunes, L.; Meersschaut, V.; Walraedt, S.; Standaert, L.; Coucke, P.; Hoeben, H.; Kroes, H. Y.; Vande Walle, J.; de Ravel, T.; Leroy, B. P.; y De Baere, E. (2010b). Genetic screening of LCA in Belgium: predominance of CEP290 and identification of potential modifier alleles in AHI1 of CEP290-related phenotypes. *Human Mutation*, 31(10), E1709-1766.
42. Corton, M.; Blanco, M. J.; Torres, M.; Sanchez-Salorio, M.; Carracedo, A.; y Brion, M. (2010). Identification of a novel mutation in the human PDE6A gene in autosomal recessive retinitis pigmentosa: homology with the nmf28/nmf28 mice model. *Clinical Genetics*, 78(5), 495-498.
43. Corton, M.; Tatu, S. D.; Avila-Fernandez, A.; Vallespín, E.; Tapias, I.; Cantalapiedra, D.; Blanco-Kelly, F.; Riveiro-Alvarez, R.; Bernal, S.; García-Sandoval, B.; Baiget, M.; y Ayuso, C. (2013). High frequency of CRB1 mutations as cause of Early-Onset Retinal Dystrophies in the Spanish population. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8, 20.
44. Corton, M.; Nishiguchi, K. M.; Avila-Fernández, A.; Nikopoulos, K.; Riveiro-Alvarez, R.; Tatu, S. D.; Ayuso, C.; y Rivolta, C. (2013b). Exome sequencing of index patients with retinal dystrophies as a tool for molecular diagnosis. *PLoS One*, 8(6), e65574.
45. Corton, M.; Avila-Fernandez, A.; Vallespín, E.; López-Molina, M. I.; Almoguera, B.; Martín-Garrido, E.; Tatu, S. D.; Khan, M. I.; Blanco-Kelly, F.; Riveiro-Alvarez, R.; Brión, M.; García-Sandoval, B.; Cremers, F. P. M.; Carracedo, A.; y Ayuso, C. (2014). Involvement of LCA5 in Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa in the Spanish population. *Ophthalmology*, 121(1), 399-407.

## D

46. Dalkara, D.; y Sahel, J.-A. (2014). Gene therapy for inherited retinal degenerations. *Comptes Rendus Biologies*, 337(3), 185-192.
47. D'Cruz, P. M.; Yasumura, D.; Weir, J.; Matthes, M. T.; Abderrahim, H.; LaVail, M. M.; y Vollrath, D. (2000). Mutation of the receptor tyrosine kinase gene Mertk in the retinal dystrophic RCS rat. *Human Molecular Genetics*, 9(4), 645-651.
48. Dharmaraj, S.; Li, Y.; Robitaille, J. M.; Silva, E.; Zhu, D.; Mitchell, T. N.; Maltby, L. P.; Baffoe-Bonnie, A. B.; y Maumenee, I. H. (2000). A novel locus for Leber congenital amaurosis maps to chromosome 6q. *American Journal of Human Genetics*, 66(1), 319-326.
49. Dryja, T. P.; Adams, S. M.; Grimsby, J. L.; McGee, T. L.; Hong, D. H.; Li, T.; Andréasson, S.; y Berson, E. L. (2001). Null RPGRIP1 alleles in patients with Leber congenital amaurosis. *American Journal of Human Genetics*, 68(5), 1295-1298.



## E

50. Ebermann, I.; Walger, M.; Scholl, H. P. N.; Charbel Issa, P.; Lüke, C.; Nürnberg, G.; Lang-Roth, R.; Becker, C.; Nürnberg, P.; y Bolz, H. J. (2007). Truncating mutation of the DFN59 gene causes cochlear hearing impairment and central vestibular dysfunction. *Human Mutation*, 28(6), 571-577.
51. Ehrenberg, M.; Pierce, E. A.; Cox, G. F.; y Fulton, A. B. (2013). CRB1: one gene, many phenotypes. *Seminars in Ophthalmology*, 28(5-6), 397-405.
52. Eisenberger, T.; Neuhaus, C.; Khan, A. O.; Decker, C.; Preising, M. N.; Friedburg, C.; Bieg, A.; Gliem, M.; Charbel Issa, P.; Holz, F. G.; Baig, S. M.; Hellenbroich, Y.; Galvez, A.; Platzer, K.; Wollnik, B.; Laddach, N.; Ghaffari, S. R.; Rafati, M.; Botzenhart, E.; Tinschert, S.; et al. (2013). Increasing the yield in targeted next-generation sequencing by implicating CNV analysis, non-coding exons and the overall variant load: the example of retinal dystrophies. *PLoS One*, 8(11), e78496.

## F

53. Falk, M. J.; Zhang, Q.; Nakamaru-Ogiso, E.; Kannabiran, C.; Fonseca-Kelly, Z.; Chakarova, C.; Audo, I.; Mackay, D. S.; Zeitz, C.; Borman, A. D.; Staniszevska, M.; Shukla, R.; Palavalli, L.; Mohand-Said, S.; Waseem, N. H.; Jalali, S.; Perin, J. C.; Place, E.; Ostrovsky, J.; Xiao, R.; et al. (2012). NMNAT1 mutations cause Leber congenital amaurosis. *Nature Genetics*, 44(9), 1040-1045.
54. Fernandez-San Jose, P.; Corton, M.; Blanco-Kelly, F.; Avila-Fernandez, A.; Lopez-Martinez, M. A.; Sanchez-Navarro, I.; Sanchez-Alcudia, R.; Perez-Carro, R.; Zurita, O.; Sanchez-Bolivar, N.; Lopez-Molina, M. I.; Garcia-Sandoval, B.; Riveiro-Alvarez, R.; y Ayuso, C. (2015). Targeted Next-Generation Sequencing Improves the Diagnosis of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa in Spanish Patients. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56(4), 2173-2182.
55. Franceschetti, A.; y Dieterle, P. (1954). Diagnostic and prognostic importance of the electroretinogram in tapetoretinal degeneration with reduction of the visual field and hemeralopia. *Confinia Neurologica*, 14(2-3), 184-186.
56. Freund, C. L.; Wang, Q. L.; Chen, S.; Muskat, B. L.; Wiles, C. D.; Sheffield, V. C.; Jacobson, S. G.; McInnes, R. R.; Zack, D. J.; y Stone, E. M. (1998). De novo mutations in the CRX homeobox gene associated with Leber congenital amaurosis. *Nature Genetics*, 18(4), 311-312.
57. Fu, Y.; y Zhang, T. (2014). Pathophysiological mechanism and treatment strategies for Leber congenital amaurosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 801, 791-796.

## G

58. Gal, A.; Li, Y.; Thompson, D. A.; Weir, J.; Orth, U.; Jacobson, S. G.; Apfelstedt-Sylla, E.; y Vollrath, D. (2000). Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nature Genetics*, 26(3), 270-271.
59. Garcia, J. M.; Mendonça, L.; Brant, R.; Abud, M.; Regatieri, C.; y Diniz, B. (2015). Stem cell therapy for retinal diseases. *World Journal of Stem Cells*, 7(1), 160-164.
60. Gerber, S.; Hanein, S.; Perrault, I.; Delphin, N.; Aboussair, N.; Leowski, C.; Dufier, J.-L.; Roche, O.; Munnich, A.; Kaplan, J.; y Rozet, J.-M. (2007). Mutations in LCA5 are an uncommon cause of Leber congenital amaurosis (LCA) type II. *Human Mutation*, 28(12), 1245.
61. Gu, S. M.; Thompson, D. A.; Srikumari, C. R.; Lorenz, B.; Finckh, U.; Nicoletti, A.; Murthy, K. R.; Rathmann, M.; Kumaramanickavel, G.; Denton, M. J.; y Gal, A. (1997). Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nature Genetics*, 17(2), 194-197.

## H

62. Haeseleer, F.; Jang, G.-F.; Imanishi, Y.; Driessen, C. A. G. G.; Matsumura, M.; Nelson, P. S.; y Palczewski, K. (2002). Dual-substrate specificity short chain retinol dehydrogenases from the vertebrate retina. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 45537-45546.
63. Hameed, A.; Khaliq, S.; Ismail, M.; Anwar, K.; Ebenezer, N. D.; Jordan, T.; Mehdi, S. Q.; Payne, A. M.; y Bhattacharya, S. S. (2000). A novel locus for Leber congenital amaurosis (LCA4) with anterior keratoconus mapping to chromosome 17p13. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41(3), 629-633.
64. Hamel, C. P.; Tsilou, E.; Pfeffer, B. A.; Hooks, J. J.; Detrick, B.; y Redmond, T. M. (1993a). Molecular cloning and expression of RPE65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(21), 15751-15757.
65. Hamel, C. P.; Tsilou, E.; Harris, E.; Pfeffer, B. A.; Hooks, J. J.; Detrick, B.; y Redmond, T. M. (1993b). A developmentally regulated microsomal protein specific for the pigment epithelium of the vertebrate retina. *Journal of Neuroscience Research*, 34(4), 414-425.
66. Hamel, C. P.; Jenkins, N. A.; Gilbert, D. J.; Copeland, N. G.; y Redmond, T. M. (1994). The gene for the retinal pigment epithelium-specific protein RPE65 is localized to human 1p31 and mouse 3. *Genomics*, 20(3), 509-512.
67. Hanein, S.; Perrault, I.; Gerber, S.; Tanguy, G.; Barbet, F.; Ducroq, D.; Calvas, P.; Dollfus, H.; Hamel, C.; Lopponen, T.; Munier, F.; Santos, L.; Shalev, S.; Zafeiriou, D.; Dufier, J.-L.; Munnich, A.; Rozet, J.-M.; y Kaplan, J. (2004). Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. *Human Mutation*, 23(4), 306-317.
68. Hanein, S.; Perrault, I.; Gerber, S.; Tanguy, G.; Rozet, J.-M.; y Kaplan, J. (2006). Leber congenital amaurosis: survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition and phenotype-genotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. Clinical and molecular survey in LCA. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 572, 15-20.
69. Henderson, R. H.; Waseem, N.; Searle, R.; van der Spuy, J.; Russell-Eggitt, I.; Bhattacharya, S. S.; Thompson, D. A.; Holder, G. E.; Cheetham, M. E.; Webster, A. R.; y Moore, A. T. (2007). An assessment of the apex microarray technology in genotyping patients with Leber congenital amaurosis and early-onset severe retinal dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(12), 5684-5689.
70. Henderson, R. H.; Mackay, D. S.; Li, Z.; Moradi, P.; Sergouniotis, P.; Russell-Eggitt, I.; Thompson, D. A.; Robson, A. G.; Holder, G. E.; Webster, A. R.; y Moore, A. T. (2011). Phenotypic variability in patients with retinal dystrophies due to mutations in CRB1. *The British Journal of Ophthalmology*, 95(6), 811-817.
71. Hirsch, J.; y Curcio, C. A. (1989). The spatial resolution capacity of human foveal retina. *Vision Research*, 29(9), 1095-1101.
72. den Hollander, A. I.; ten Brink, J. B.; de Kok, Y. J.; van Soest, S.; van den Born, L. I.; van Driel, M. A.; van de Pol, D. J.; Payne, A. M.; Bhattacharya, S. S.; Kellner, U.; Hoyng, C. B.; Westerveld, A.; Brunner, H. G.; Bleeker-Wagemakers, E. M.; Deutman, A. F.; Heckenlively, J. R.; Cremers, F. P.; y Bergen, A. A. (1999). Mutations in a human homologue of *Drosophila* crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nature Genetics*, 23(2), 217-221.



73. den Hollander, A. I.; Heckenlively, J. R.; van den Born, L. I.; de Kok, Y. J.; van der Velde-Visser, S. D.; Kellner, U.; Jurkles, B.; van Schooneveld, M. J.; Blankenagel, A.; Rohrschneider, K.; Wissinger, B.; Cruysberg, J. R.; Deutman, A. F.; Brunner, H. G.; Apfelstedt-Sylla, E.; Hoyng, C. B.; y Cremers, F. P. (2001a). Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (CRB1) gene. *American Journal of Human Genetics*, 69(1), 198-203.
74. den Hollander, A. I.; Johnson, K.; de Kok, Y. J.; Klebes, A.; Brunner, H. G.; Knust, E.; y Cremers, F. P. (2001b). CRB1 has a cytoplasmic domain that is functionally conserved between human and *Drosophila*. *Human Molecular Genetics*, 10(24), 2767-2773.
75. den Hollander, A. I.; Ghiani, M.; de Kok, Y. J. M.; Wijnholds, J.; Ballabio, A.; Cremers, F. P. M.; y Broccoli, V. (2002). Isolation of Crb1, a mouse homologue of *Drosophila* crumbs, and analysis of its expression pattern in eye and brain. *Mechanisms of Development*, 110(1-2), 203-207.
76. den Hollander, A. I.; Davis, J.; van der Velde-Visser, S. D.; Zonneveld, M. N.; Pierrottet, C. O.; Koenekoop, R. K.; Kellner, U.; van den Born, L. I.; Heckenlively, J. R.; Hoyng, C. B.; Handford, P. A.; Roepman, R.; y Cremers, F. P. M. (2004). CRB1 mutation spectrum in inherited retinal dystrophies. *Human Mutation*, 24(5), 355-369.
77. den Hollander, A. I.; Koenekoop, R. K.; Yzer, S.; Lopez, I.; Arends, M. L.; Voesenek, K. E. J.; Zonneveld, M. N.; Strom, T. M.; Meitinger, T.; Brunner, H. G.; Hoyng, C. B.; van den Born, L. I.; Rohrschneider, K.; y Cremers, F. P. M. (2006). Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis. *American Journal of Human Genetics*, 79(3), 556-561.
78. den Hollander, A. I.; Koenekoop, R. K.; Mohamed, M. D.; Arts, H. H.; Boldt, K.; Towns, K. V.; Sedmak, T.; Beer, M.; Nagel-Wolfrum, K.; McKibbin, M.; Dharmaraj, S.; Lopez, I.; Ivings, L.; Williams, G. A.; Springell, K.; Woods, C. G.; Jafri, H.; Rashid, Y.; Strom, T. M.; van der Zwaag, B.; et al. (2007). Mutations in LCA5, encoding the ciliary protein lebercilin, cause Leber congenital amaurosis. *Nature Genetics*, 39(7), 889-895.
79. den Hollander, A. I.; Roepman, R.; Koenekoop, R. K.; y Cremers, F. P. M. (2008). Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Progress in Retinal and Eye Research*, 27(4), 391-419.

## J

80. Jaakson, K.; Zernant, J.; Külm, M.; Hutchinson, A.; Tonisson, N.; Glavac, D.; Ravnik-Glavac, M.; Hawlina, M.; Meltzer, M. R.; Caruso, R. C.; Testa, F.; Maugeri, A.; Hoyng, C. B.; Gouras, P.; Simonelli, F.; Lewis, R. A.; Lupski, J. R.; Cremers, F. P. M.; y Allikmets, R. (2003). Genotyping microarray (gene chip) for the ABCR (ABCA4) gene. *Human Mutation*, 22(5), 395-403.
81. Jacobson, S. G.; Cideciyan, A. V.; Aleman, T. S.; Pianta, M. J.; Sumaroka, A.; Schwartz, S. B.; Smilko, E. E.; Milam, A. H.; Sheffield, V. C.; y Stone, E. M. (2003). Crumbs homolog 1 (CRB1) mutations result in a thick human retina with abnormal lamination. *Human Molecular Genetics*, 12(9), 1073-1078.
82. Jacobson, S. G.; Cideciyan, A. V.; Roman, A. J.; Sumaroka, A.; Schwartz, S. B.; Heon, E.; y Hauswirth, W. W. (2015). Improvement and decline in vision with gene therapy in childhood blindness. *The New England Journal of Medicine*, 372(20), 1920-1926.
83. Janecke, A. R.; Thompson, D. A.; Utermann, G.; Becker, C.; Hübner, C. A.; Schmid, E.; McHenry, C. L.; Nair, A. R.; Rüschenhoff, F.; Heckenlively, J.; Wissinger, B.; Nürnberg, P.; y Gal, A. (2004). Mutations in RDH12 encoding a photoreceptor cell retinol dehydrogenase cause childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nature Genetics*, 36(8), 850-854.

**K**

84. Keen, T. J.; Mohamed, M. D.; McKibbin, M.; Rashid, Y.; Jafri, H.; Maumenee, I. H.; y Inglehearn, C. F. (2003). Identification of a locus (LCA9) for Leber's congenital amaurosis on chromosome 1p36. *European journal of human genetics: EJHG*, 11(5), 420-423.
85. Kiser, P. D.; Golczak, M.; Maeda, A.; y Palczewski, K. (2012). Key enzymes of the retinoid (visual) cycle in vertebrate retina. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1821(1), 137-151.
86. Koenekoop, R. K. (2004). An overview of Leber congenital amaurosis: a model to understand human retinal development. *Survey of Ophthalmology*, 49(4), 379-398.
87. Koenekoop, R. K.; Lopez, I.; den Hollander, A. I.; Allikmets, R.; y Cremers, F. P. M. (2007). Genetic testing for retinal dystrophies and dysfunctions: benefits, dilemmas and solutions. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 35(5), 473-485.
88. Koenekoop, R. K.; Wang, H.; Majewski, J.; Wang, X.; Lopez, I.; Ren, H.; Chen, Y.; Li, Y.; Fishman, G. A.; Genead, M.; Schwartzentruber, J.; Solanki, N.; Traboulsi, E. I.; Cheng, J.; Logan, C. V.; McKibbin, M.; Hayward, B. E.; Parry, D. A.; Johnson, C. A.; Nageeb, M.; et al. (2012). Mutations in NMNAT1 cause Leber congenital amaurosis and identify a new disease pathway for retinal degeneration. *Nature Genetics*, 44(9), 1035-1039.
89. Ku, C. A.; Chiodo, V. A.; Boye, S. L.; Goldberg, A. F. X.; Li, T.; Hauswirth, W. W.; y Ramamurthy, V. (2011). Gene therapy using self-complementary Y733F capsid mutant AAV2/8 restores vision in a model of early onset Leber congenital amaurosis. *Human Molecular Genetics*, 20(23), 4569-4581.
90. Kumar, P.; Henikoff, S.; y Ng, P. C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*, 4(7), 1073-1081.

**L**

91. de Laey, J. J. (1991). Leber's congenital amaurosis. *Bulletin De La Société Belge D'ophtalmologie*, 241, 41-50.
92. Leber, T. (1869). Über Retinitis pigmentosa und angeborene Amaurose. *Archiv für Ophthalmologie*, 15(3), 1-25.
93. Leutelt, J.; Oehlmann, R.; Younus, F.; van den Born, L. I.; Weber, J. L.; Denton, M. J.; Mehdi, S. Q.; y Gal, A. (1995). Autosomal recessive retinitis pigmentosa locus maps on chromosome 1q in a large consanguineous family from Pakistan. *Clinical Genetics*, 47(3), 122-124.
94. Li, L.; Xiao, X.; Li, S.; Jia, X.; Wang, P.; Guo, X.; Jiao, X.; Zhang, Q.; y Hejtmancik, J. F. (2011). Detection of variants in 15 genes in 87 unrelated Chinese patients with Leber congenital amaurosis. *PloS One*, 6(5), e19458.
95. Lin, M.; Wei, L.-J.; Sellers, W. R.; Lieberfarb, M.; Wong, W. H.; y Li, C. (2004). dChipSNP: significance curve and clustering of SNP-array-based loss-of-heterozygosity data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 20(8), 1233-1240.
96. Lotery, A. J.; Namperumalsamy, P.; Jacobson, S. G.; Weleber, R. G.; Fishman, G. A.; Musarella, M. A.; Hoyt, C. S.; Héon, E.; Levin, A.; Jan, J.; Lam, B.; Carr, R. E.; Franklin, A.; Radha, S.; Andorf, J. L.; Sheffield, V. C.; y Stone, E. M. (2000). Mutation analysis of 3 genes in patients with Leber congenital amaurosis. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)*, 118(4), 538-543.
97. Lotery, A. J.; Jacobson, S. G.; Fishman, G. A.; Weleber, R. G.; Fulton, A. B.; Namperumalsamy, P.; Héon, E.; Levin, A. V.; Grover, S.; Rosenow, J. R.; Kopp, K. K.; Sheffield, V. C.; y Stone, E. M. (2001a). Mutations in the CRB1 gene cause Leber congenital amaurosis. *Archives of Ophthalmology*, 119(3), 415-420.

98. Lotery, A. J.; Malik, A.; Shami, S. A.; Sindhi, M.; Chohan, B.; Maqbool, C.; Moore, P. A.; Denton, M. J.; y Stone, E. M. (2001b). CRB1 mutations may result in retinitis pigmentosa without para-arteriolar RPE preservation. *Ophthalmic Genetics*, 22(3), 163-169.
99. Lozano, P.; y Iborra, J. L. (1996). *Bioquímica de la visión* (2ª ed.). Murcia: Servicio de Publicaciones, Universidad de Murcia.
100. Lukovic, D.; Artero Castro, A.; Delgado, A. B. G.; Bernal, M. de los A. M.; Luna Pelaez, N.; Díez Lloret, A.; Perez Espejo, R.; Kamenarova, K.; Fernández Sánchez, L.; Cuenca, N.; Cortón, M.; Avila Fernandez, A.; Sorkio, A.; Skottman, H.; Ayuso, C.; Erceg, S.; y Bhattacharya, S. S. (2015). Human iPSC derived disease model of MERTK-associated retinitis pigmentosa. *Scientific Reports*, 5, 12910.
101. Lustremant, C.; Habeler, W.; Plancheron, A.; Goureau, O.; Grenot, L.; de la Grange, P.; Audou, I.; Nandrot, E. F.; y Monville, C. (2013). Human induced pluripotent stem cells as a tool to model a form of Leber congenital amaurosis. *Cellular Reprogramming*, 15(3), 233-246.

## M

102. Ma, H.; Thapa, A.; Morris, L.; Redmond, T. M.; Baehr, W.; y Ding, X.-Q. (2014). Suppressing thyroid hormone signaling preserves cone photoreceptors in mouse models of retinal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(9), 3602-3607.
103. Mackay, D. S.; Dev Borman, A.; Moradi, P.; Henderson, R. H.; Li, Z.; Wright, G. A.; Waseem, N.; Gandra, M.; Thompson, D. A.; Bhattacharya, S. S.; Holder, G. E.; Webster, A. R.; y Moore, A. T. (2011). RDH12 retinopathy: novel mutations and phenotypic description. *Molecular Vision*, 17, 2706-2716.
104. Mackay, D. S.; Borman, A. D.; Sui, R.; van den Born, L. I.; Berson, E. L.; Ocaka, L. A.; Davidson, A. E.; Heckenlively, J. R.; Branham, K.; Ren, H.; Lopez, I.; Maria, M.; Azam, M.; Henkes, A.; Blokland, E.; LCA5 Study Group; Andreasson, S.; de Baere, E.; Bennett, J.; Chader, G. J.; et al. (2013). Screening of a large cohort of leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa patients identifies novel LCA5 mutations and new genotype-phenotype correlations. *Human Mutation*, 34(11), 1537-1546.
105. Maguire, A. M.; Simonelli, F.; Pierce, E. A.; Pugh, E. N.; Mingozzi, F.; Bencicelli, J.; Banfi, S.; Marshall, K. A.; Testa, F.; Surace, E. M.; Rossi, S.; Lyubarsky, A.; Arruda, V. R.; Konkle, B.; Stone, E.; Sun, J.; Jacobs, J.; Dell'Osso, L.; Hertle, R.; Ma, J.; et al. (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *The New England Journal of Medicine*, 358(21), 2240-2248.
106. Maguire, A. M.; High, K. A.; Auricchio, A.; Wright, J. F.; Pierce, E. A.; Testa, F.; Mingozzi, F.; Bencicelli, J. L.; Ying, G.; Rossi, S.; Fulton, A.; Marshall, K. A.; Banfi, S.; Chung, D. C.; Morgan, J. I. W.; Hauck, B.; Zeleniaia, O.; Zhu, X.; Raffini, L.; Coppieters, F.; et al. (2009). Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*, 374(9701), 1597-1605.
107. Marlhens, F.; Bareil, C.; Griffoin, J. M.; Zrenner, E.; Amalric, P.; Eliaou, C.; Liu, S. Y.; Harris, E.; Redmond, T. M.; Arnaud, B.; Claustres, M.; y Hamel, C. P. (1997). Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nature Genetics*, 17(2), 139-141.
108. McKay, G. J.; Clarke, S.; Davis, J. A.; Simpson, D. A. C.; y Silvestri, G. (2005). Pigmented paravenous chorioretinal atrophy is associated with a mutation within the crumbs homolog 1 (CRB1) gene. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(1), 322-328.
109. Morimura, H.; Fishman, G. A.; Grover, S. A.; Fulton, A. B.; Berson, E. L.; y Dryja, T. P. (1998). Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or leber congenital amaurosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), 3088-3093.

**N**

110. Neveling, K.; den Hollander, A. I.; Cremers, F. P. M.; y Collin, R. W. J. (2013). Identification and analysis of inherited retinal disease genes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 935, 3-23.
111. Nishiguchi, K. M.; Avila-Fernandez, A.; van Huet, R. A. C.; Corton, M.; Pérez-Carro, R.; Martín-Garrido, E.; López-Molina, M. I.; Blanco-Kelly, F.; Hoefsloot, L. H.; van Zelst-Stams, W. A.; García-Ruiz, P. J.; Del Val, J.; Di Gioia, S. A.; Klevering, B. J.; van de Warrenburg, B. P. C.; Vazquez, C.; Cremers, F. P. M.; García-Sandoval, B.; Hoyng, C. B.; Collin, R. W. J.; et al. (2014). Exome sequencing extends the phenotypic spectrum for ABHD12 mutations: from syndromic to nonsyndromic retinal degeneration. *Ophthalmology*, 121(8), 1620-1627.
112. North, M. A.; Naggert, J. K.; Yan, Y.; Noben-Trauth, K.; y Nishina, P. M. (1997). Molecular characterization of TUB, TULP1, and TULP2, members of the novel tubby gene family and their possible relation to ocular diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), 3128-3133.

**O**

113. O'Sullivan, J.; Mullaney, B. G.; Bhaskar, S. S.; Dickerson, J. E.; Hall, G.; O'Grady, A.; Webster, A.; Ramsden, S. C.; y Black, G. C. (2012). A paradigm shift in the delivery of services for diagnosis of inherited retinal disease. *Journal of Medical Genetics*, 49(5), 322-326.

**P**

114. van de Pavert, S. A.; Kantardzhieva, A.; Malysheva, A.; Meuleman, J.; Versteeg, I.; Levelt, C.; Klooster, J.; Geiger, S.; Seeliger, M. W.; Rashbass, P.; Le Bivic, A.; y Wijnholds, J. (2004). Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 18), 4169-4177.
115. Pellikka, M.; Tanentzapf, G.; Pinto, M.; Smith, C.; McGlade, C. J.; Ready, D. F.; y Tepass, U. (2002). Crumbs, the Drosophila homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature*, 416(6877), 143-149.
116. Pereiro, I.; Hoskins, B. E.; Marshall, J. D.; Collin, G. B.; Naggert, J. K.; Piñeiro-Gallego, T.; Oitmaa, E.; Katsanis, N.; Valverde, D.; y Beales, P. L. (2011). Arrayed primer extension technology simplifies mutation detection in Bardet-Biedl and Alström syndrome. *European journal of human genetics: EJHG*, 19(4), 485-488.
117. Perrault, I.; Rozet, J. M.; Gerber, S.; Ghazi, I.; Leowski, C.; Ducroq, D.; Souied, E.; Dufier, J. L.; Munnich, A.; y Kaplan, J. (1999). Leber congenital amaurosis. *Molecular Genetics and Metabolism*, 68(2), 200-208.
118. Perrault, I.; Hanein, S.; Gerber, S.; Barbet, F.; Dufier, J.; Munnich, A.; Rozet, J.; y Kaplan, J. (2003a). Evidence of autosomal dominant Leber congenital amaurosis (LCA) underlain by a CRX heterozygous null allele. *Journal of Medical Genetics*, 40(7), e90.
119. Perrault, I.; Gerber, S.; Hanein, S.; Picaud, S.; Rozet, J.-M.; Dufier, J.-L.; Munnich, A.; Sahel, J.; y Kaplan, J. (2003b). Leber Congenital Amaurosis — Genotyping Required for Possible Inclusion in a Clinical Trial. En M. M. LaVail, J. G. Hollyfield, y R. E. Anderson (Eds.), *Retinal Degenerations, Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp 69-77). Springer US.
120. Perrault, I.; Hanein, S.; Gerber, S.; Barbet, F.; Ducroq, D.; Dollfus, H.; Hamel, C.; Dufier, J.-L.; Munnich, A.; Kaplan, J.; y Rozet, J.-M. (2004). Retinal Dehydrogenase 12 (RDH12) Mutations in Leber Congenital Amaurosis. *American Journal of Human Genetics*, 75(4), 639-646.

121. Perrault, I.; Delphin, N.; Hanein, S.; Gerber, S.; Dufier, J.-L.; Roche, O.; Defoort-Dhellemmes, S.; Dollfus, H.; Fazzi, E.; Munnich, A.; Kaplan, J.; y Rozet, J.-M. (2007). Spectrum of NPHP6/CEP290 mutations in Leber congenital amaurosis and delineation of the associated phenotype. *Human Mutation*, 28(4), 416.
122. Perrault, I.; Hanein, S.; Zanlonghi, X.; Serre, V.; Nicouleau, M.; Defoort-Delhemmes, S.; Delphin, N.; Fares-Taie, L.; Gerber, S.; Xerri, O.; Edelson, C.; Goldenberg, A.; Duncombe, A.; Le Meur, G.; Hamel, C.; Silva, E.; Nitschke, P.; Calvas, P.; Munnich, A.; Roche, O.; et al. (2012). Mutations in NMNAT1 cause Leber congenital amaurosis with early-onset severe macular and optic atrophy. *Nature Genetics*, 44(9), 975-977.
123. Perusek, L.; y Maeda, T. (2013). Vitamin A derivatives as treatment options for retinal degenerative diseases. *Nutrients*, 5(7), 2646-2666.
124. Piskulich Crespo, Z.; y Sánchez Vuelvas, E. (2007). Fisiología de la retina. En F. Arévalo (Ed.), *Retina médica: temas selectos* (1ª ed.). Caracas (Venezuela): Amolca.

## R

125. Ramón y Cajal, S. (1893). La rétine des vertébrés. *La Cellule*, 9(1), 119-259.
126. Ramprasad, V. L.; Soumittra, N.; Nancarrow, D.; Sen, P.; McKibbin, M.; Williams, G. A.; Arokiasamy, T.; Lakshmipathy, P.; Inglehearn, C. F.; y Kumaramanickavel, G. (2008). Identification of a novel splice-site mutation in the Lebercilin (LCA5) gene causing Leber congenital amaurosis. *Molecular Vision*, 14, 481-486.
127. Rolling, F.; Le Meur, G.; Stieger, K.; Smith, A. J.; Weber, M.; Deschamps, J. Y.; Nivard, D.; Mendes-Madeira, A.; Provost, N.; Péréon, Y.; Cherel, Y.; Ali, R. R.; Hamel, C.; Moullier, P.; y Rolling, F. (2006). Gene therapeutic prospects in early onset of severe retinal dystrophy: restoration of vision in RPE65 Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Bulletin Et Mémoires De l'Académie Royale De Médecine De Belgique*, 161(10-12), 497-509.

## S

128. Sánchez-Alcudia, R.; Cortón, M.; Ávila-Fernández, A.; Zurita, O.; Tatu, S. D.; Pérez-Carro, R.; Fernandez-San Jose, P.; Lopez-Martinez, M. Á.; del Castillo, F. J.; Millan, J. M.; Blanco-Kelly, F.; García-Sandoval, B.; Lopez-Molina, M. I.; Riveiro-Alvarez, R.; y Ayuso, C. (2014). Contribution of mutation load to the intrafamilial genetic heterogeneity in a large cohort of Spanish retinal dystrophies families. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(11), 7562-7571.
129. Schork, N. J., D. Fallin, y J. S. Lanchbury. «Single Nucleotide Polymorphisms and the Future of Genetic Epidemiology». *Clinical Genetics* 58, n.º 4 (octubre de 2000): 250-64.
130. Schouten, Jan P., Cathal J. McElgunn, Raymond Waaijer, Danny Zwijnenburg, Filip Diepvens, y Gerard Pals. «Relative Quantification of 40 Nucleic Acid Sequences by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification». *Nucleic Acids Research* 30, n.º 12 (15 de junio de 2002): e57.
131. Sénéchal, A.; Humbert, G.; Surget, M.-O.; Bazalgette, C.; Bazalgette, C.; Arnaud, B.; Arndt, C.; Laurent, E.; Brabet, P.; y Hamel, C. P. (2006). Screening genes of the retinoid metabolism: novel LRAT mutation in leber congenital amaurosis. *American Journal of Ophthalmology*, 142(4), 702-704.
132. Sergouniotis, P. I.; Davidson, A. E.; Mackay, D. S.; Li, Z.; Yang, X.; Plagnol, V.; Moore, A. T.; y Webster, A. R. (2011). Recessive mutations in KCNJ13, encoding an inwardly rectifying potassium channel subunit, cause leber congenital amaurosis. *American Journal of Human Genetics*, 89(1), 183-190.



133. Siemiakowska, A. M.; van den Born, L. I.; van Genderen, M. M.; Bertelsen, M.; Zobor, D.; Rohrschneider, K.; van Huet, R. A. C.; Nurohmah, S.; Klevering, B. J.; Kohl, S.; Faradz, S. M. H.; Rosenberg, T.; den Hollander, A. I.; Collin, R. W. J.; y Cremers, F. P. M. (2014a). Novel compound heterozygous NMNAT1 variants associated with Leber congenital amaurosis. *Molecular Vision*, 20, 753-759.
134. Siemiakowska, A. M.; Schuurs-Hoeijmakers, J. H. M.; Bosch, D. G. M.; Boonstra, F. N.; Riemsdag, F. C. C.; Ruiters, M.; de Vries, B. B. A.; den Hollander, A. I.; Collin, R. W. J.; y Cremers, F. P. M. (2014b). Nonpenetrance of the most frequent autosomal recessive leber congenital amaurosis mutation in NMNAT1. *JAMA ophthalmology*, 132(8), 1002-1004.
135. Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; Thompson, J. D.; y Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7, 539.
136. Simonelli, F.; Ziviello, C.; Testa, F.; Rossi, S.; Fazzi, E.; Bianchi, P. E.; Fossarello, M.; Signorini, S.; Bertone, C.; Galantuomo, S.; Brancati, F.; Valente, E. M.; Ciccodicola, A.; Rinaldi, E.; Auricchio, A.; y Banfi, S. (2007). Clinical and molecular genetics of Leber's congenital amaurosis: a multicenter study of Italian patients. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(9), 4284-4290.
137. van Soest, S.; van den Born, L. I.; Gal, A.; Farrar, G. J.; Bleeker-Wagemakers, L. M.; Westerveld, A.; Humphries, P.; Sandkuijl, L. A.; y Bergen, A. A. (1994). Assignment of a gene for autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP12) to chromosome 1q31-q32.1 in an inbred and genetically heterogeneous disease population. *Genomics*, 22(3), 499-504.
138. Sohocki, M. M.; Sullivan, L. S.; Mintz-Hittner, H. A.; Birch, D.; Heckenlively, J. R.; Freund, C. L.; McInnes, R. R.; y Daiger, S. P. (1998). A range of clinical phenotypes associated with mutations in CRX, a photoreceptor transcription-factor gene. *American Journal of Human Genetics*, 63(5), 1307-1315.
139. Sohocki, M. M.; Bowne, S. J.; Sullivan, L. S.; Blackshaw, S.; Cepko, C. L.; Payne, A. M.; Bhattacharya, S. S.; Khaliq, S.; Qasim Mehdi, S.; Birch, D. G.; Harrison, W. R.; Elder, F. F.; Heckenlively, J. R.; y Daiger, S. P. (2000). Mutations in a new photoreceptor-pineal gene on 17p cause Leber congenital amaurosis. *Nature Genetics*, 24(1), 79-83.
140. Solinís, M. Á.; del Pozo-Rodríguez, A.; Apaolaza, P. S.; y Rodríguez-Gascón, A. (2014). Treatment of ocular disorders by gene therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*
141. Song, J.; Smaoui, N.; Ayyagari, R.; Stiles, D.; Benhamed, S.; MacDonald, I. M.; Daiger, S. P.; Tumminia, S. J.; Hejtmancik, F.; y Wang, X. (2011). High-throughput retina-array for screening 93 genes involved in inherited retinal dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(12), 9053-9060.
142. van der Spuy, J.; Chapple, J. P.; Clark, B. J.; Luthert, P. J.; Sethi, C. S.; y Cheetham, M. E. (2002). The Leber congenital amaurosis gene product AIPL1 is localized exclusively in rod photoreceptors of the adult human retina. *Human Molecular Genetics*, 11(7), 823-831.
143. van der Spuy, J.; Kim, J. H.; Yu, Y. S.; Szel, A.; Luthert, P. J.; Clark, B. J.; y Cheetham, M. E. (2003). The expression of the Leber congenital amaurosis protein AIPL1 coincides with rod and cone photoreceptor development. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(12), 5396-5403.
144. Stein, L. R.; y Imai, S. (2012). The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 23(9), 420-428.
145. Stingl, K.; Bartz-Schmidt, K. U.; Besch, D.; Braun, A.; Bruckmann, A.; Gekeler, F.; Greppmaier, U.; Hipp, S.; Hörtdörfer, G.; Kernstock, C.; Koitschev, A.; Kusnyerik, A.; Sachs, H.; Schatz, A.; Stingl, K. T.; Peters, T.; Wilhelm, B.; y Zrenner, E. (2013). Artificial vision with wirelessly powered subretinal electronic implant alpha-IMS. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 280(1757), 20130077.

146. Stingl, K.; Bartz-Schmidt, K.-U.; Besch, D.; Chee, C. K.; Cottrill, C.; Gekeler, F.; Groppe, M.; Jackson, T. L.; MacLaren, R. E.; Koitschev, A.; Kusnyerik, A.; Neffendorf, J.; Nemeth, J.; Naeem, M. A. N.; Peters, T.; Sachs, H.; Simpson, A.; Singh, M. S.; Wilhelm, B.; Wong, D.; et al. (2015). Subretinal visual Implant Alpha IMS - Clinical trial interim report. *Vision Research*.
147. Stockton, D. W.; Lewis, R. A.; Abboud, E. B.; Al-Rajhi, A.; Jabak, M.; Anderson, K. L.; y Lupski, J. R. (1998). A novel locus for Leber congenital amaurosis on chromosome 14q24. *Human Genetics*, 103(3), 328-333.
148. Stone, E. M. (2007). Leber congenital amaurosis - a model for efficient genetic testing of heterogeneous disorders: LXIV Edward Jackson Memorial Lecture. *American Journal of Ophthalmology*, 144(6), 791-811.
149. Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews*, 85(3), 845-881.
150. Sundaram, V.; Moore, A. T.; Ali, R. R.; y Bainbridge, J. W. (2012). Retinal dystrophies and gene therapy. *European Journal of Pediatrics*, 171(5), 757-765.
151. Sun, X.; Pawlyk, B.; Xu, X.; Liu, X.; Bulgakov, O. V.; Adamian, M.; Sandberg, M. A.; Khani, S. C.; Tan, M.-H.; Smith, A. J.; Ali, R. R.; y Li, T. (2010). Gene therapy with a promoter targeting both rods and cones rescues retinal degeneration caused by AIPL1 mutations. *Gene Therapy*, 17(1), 117-131.
- T**
152. Tan, M. H.; Smith, A. J.; Pawlyk, B.; Xu, X.; Liu, X.; Bainbridge, J. B.; Basche, M.; McIntosh, J.; Tran, H. V.; Nathwani, A.; Li, T.; y Ali, R. R. (2009). Gene therapy for retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis caused by defects in AIPL1: effective rescue of mouse models of partial and complete Aipl1 deficiency using AAV2/2 and AAV2/8 vectors. *Human Molecular Genetics*, 18(12), 2099-2114.
153. Tan, M. H.; Mackay, D. S.; Cowing, J.; Tran, H. V.; Smith, A. J.; Wright, G. A.; Dev-Borman, A.; Henderson, R. H.; Moradi, P.; Russell-Eggitt, I.; MacLaren, R. E.; Robson, A. G.; Cheetham, M. E.; Thompson, D. A.; Webster, A. R.; Michaelides, M.; Ali, R. R.; y Moore, A. T. (2012). Leber congenital amaurosis associated with AIPL1: challenges in ascribing disease causation, clinical findings, and implications for gene therapy. *PLoS One*, 7(3), e32330.
154. Tavtigian, S. V.; Deffenbaugh, A. M.; Yin, L.; Judkins, T.; Scholl, T.; Samollow, P. B.; de Silva, D.; Zharkikh, A.; y Thomas, A. (2006). Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *Journal of Medical Genetics*, 43(4), 295-305.
155. Thompson, D. A.; Janecke, A. R.; Lange, J.; Feathers, K. L.; Hübner, C. A.; McHenry, C. L.; Stockton, D. W.; Rammesmayr, G.; Lupski, J. R.; Antinolo, G.; Ayuso, C.; Baiget, M.; Gouras, P.; Heckenlively, J. R.; den Hollander, A.; Jacobson, S. G.; Lewis, R. A.; Sieving, P. A.; Wissinger, B.; Yzer, S.; et al. (2005). Retinal degeneration associated with RDH12 mutations results from decreased 11-cis retinal synthesis due to disruption of the visual cycle. *Human Molecular Genetics*, 14(24), 3865-3875.
156. Tory, K.; Lacoste, T.; Burglen, L.; Morinière, V.; Boddaert, N.; Macher, M.-A.; Llanas, B.; Nivet, H.; Bensman, A.; Niaudet, P.; Antignac, C.; Salomon, R.; y Saunier, S. (2007). High NPHP1 and NPHP6 mutation rate in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis: potential epistatic effect of NPHP6 and AHI1 mutations in patients with NPHP1 mutations. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 18(5), 1566-1575.

157. Tucker, B. A.; Cranston, C. M.; Anfinson, K. A.; Shrestha, S.; Streb, L. M.; Leon, A.; Mullins, R. F.; y Stone, E. M. (2015). Using patient-specific induced pluripotent stem cells to interrogate the pathogenicity of a novel retinal pigment epithelium-specific 65 kDa cryptic splice site mutation and confirm eligibility for enrollment into a clinical gene augmentation trial. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*.

## U

158. Urtubia Vicario, C. (1999). *Neurobiología de la visión* (2ª ed.). Barcelona: Edicions UPC.

## V

159. Vallespin, E.; Cantalapiedra, D.; Garcia-Hoyos, M.; Riveiro, R.; Villaverde, C.; Trujillo-Tiebas, M. J.; y Ayuso, C. (2006a). Gene symbol: CRB1. Disease: Leber congenital amaurosis. Accession #Hd0510. *Human Genetics*, 118(6), 774.
160. Vallespin, E.; Cantalapiedra, D.; Garcia-Hoyos, M.; Riveiro, R.; Villaverde, C.; Trujillo-Tiebas, M. J.; y Ayuso, C. (2006b). Gene symbol: CRB1. Disease: Leber congenital amaurosis. Accession #Hm0534. *Human Genetics*, 118(6), 777.
161. Vallespin, E.; Cantalapiedra, D.; Riveiro-Alvarez, R.; Wilke, R.; Aguirre-Lamban, J.; Avila-Fernandez, A.; Lopez-Martinez, M. A.; Gimenez, A.; y Trujillo-Tiebas, M. J. (2007a). Mutation screening of 299 Spanish families with retinal dystrophies by Leber congenital amaurosis genotyping microarray. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(12), 5653-5661.
162. Vallespin, E.; Riveiro-Alvarez, R.; Cantalapiedra, D.; Aguirre-Lamban, J.; Avila-Fernandez, A.; Lopez-Martinez, M. A.; Gallego-Merlo, J.; Trujillo-Tiebas, M. J.; y Ayuso, C. (2007b). Gene symbol: CRB1. *Human Genetics*, 121(2), 287-288.
163. Vallespin, E.; Lopez-Martinez, M.-A.; Cantalapiedra, D.; Riveiro-Alvarez, R.; Aguirre-Lamban, J.; Avila-Fernandez, A.; Villaverde, C.; Trujillo-Tiebas, M.-J.; y Ayuso, C. (2007c). Frequency of CEP290 c.2991\_1655A>G mutation in 175 Spanish families affected with Leber congenital amaurosis and early-onset retinitis pigmentosa. *Molecular Vision*, 13, 2160-2162.
164. Vallespín García, E. (2008). *Amaurosis congénita de Leber y retinosis pigmentaria de inicio precoz: estudio clínico y genético* (Tesis Doctoral). Madrid: Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología.
165. Vallespin, E.; Avila-Fernandez, A.; Velez-Monsalve, C.; Almoguera, B.; Martinez-Garcia, M.; Gomez-Dominguez, B.; Gonzalez-Roubaud, C.; Cantalapiedra, D.; Trujillo-Tiebas, M. J.; y Ayuso, C. (2010a). Novel human pathological mutations. Gene symbol: CRB1. Disease: Leber congenital amaurosis. *Human Genetics*, 127(1), 119.
166. Vallespin, E.; Avila-Fernandez, A.; Almoguera, B.; Velez-Monsalve, C.; Cantalapiedra, D.; Garcia-Hoyos, M.; Riveiro-Alvarez, R.; Aguirre-Lamban, J.; Bustamante-Aragones, A.; Trujillo-Tiebas, M. J.; y Ayuso, C. (2010b). Novel human pathological mutations. Gene symbol: LCA5. Disease: Leber congenital amaurosis. *Human Genetics*, 127(4), 487.
167. Verma, A.; Perumalsamy, V.; Shetty, S.; Kulm, M.; y Sundaresan, P. (2013). Mutational screening of LCA genes emphasizing RPE65 in South Indian cohort of patients. *PloS One*, 8(9), e73172.
168. Vossen, R. H. A. M.; Aten, E.; Roos, A.; y den Dunnen, J. T. (2009). High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Human Mutation*, 30(6), 860-866.



## W

169. Walia, S.; Fishman, G. A.; Jacobson, S. G.; Aleman, T. S.; Koenekoop, R. K.; Traboulsi, E. I.; Weleber, R. G.; Pennesi, M. E.; Heon, E.; Drack, A.; Lam, B. L.; Allikmets, R.; y Stone, E. M. (2010). Visual acuity in patients with Leber's congenital amaurosis and early childhood-onset retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*, *117*(6), 1190-1198.
170. Wang, H.; den Hollander, A. I.; Moayed, Y.; Abulimiti, A.; Li, Y.; Collin, R. W. J.; Hoyng, C. B.; Lopez, I.; Abboud, E. B.; Al-Rajhi, A. A.; Bray, M.; Lewis, R. A.; Lupski, J. R.; Mardon, G.; Koenekoop, R. K.; y Chen, R. (2009). Mutations in SPATA7 cause Leber congenital amaurosis and juvenile retinitis pigmentosa. *American Journal of Human Genetics*, *84*(3), 380-387.
171. Wang, X.; Wang, H.; Cao, M.; Li, Z.; Chen, X.; Patenia, C.; Gore, A.; Abboud, E. B.; Al-Rajhi, A. A.; Lewis, R. A.; Lupski, J. R.; Mardon, G.; Zhang, K.; Muzny, D.; Gibbs, R. A.; y Chen, R. (2011). Whole-exome sequencing identifies ALMS1, IQCB1, CNGA3, and MYO7A mutations in patients with Leber congenital amaurosis. *Human Mutation*, *32*(12), 1450-1459.
172. Wang, X.; Wang, H.; Sun, V.; Tuan, H.-F.; Keser, V.; Wang, K.; Ren, H.; Lopez, I.; Zaneveld, J. E.; Siddiqui, S.; Bowles, S.; Khan, A.; Salvo, J.; Jacobson, S. G.; Iannaccone, A.; Wang, F.; Birch, D.; Heckenlively, J. R.; Fishman, G. A.; Traboulsi, E. I.; et al. (2013). Comprehensive molecular diagnosis of 179 Leber congenital amaurosis and juvenile retinitis pigmentosa patients by targeted next generation sequencing. *Journal of Medical Genetics*, *50*(10), 674-688.
173. Wang, H.; Wang, X.; Zou, X.; Xu, S.; Li, H.; Soens, Z. T.; Wang, K.; Li, Y.; Dong, F.; Chen, R.; y Sui, R. (2015). Comprehensive Molecular Diagnosis of a Large Chinese Leber Congenital Amaurosis Cohort. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *56*(6), 3642-3655.
174. Wässle, H.; y Boycott, B. B. (1991). Functional architecture of the mammalian retina. *Physiological Reviews*, *71*(2), 447-480.
175. Waterhouse, A. M.; Procter, J. B.; Martin, D. M. A.; Clamp, M.; y Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *25*(9), 1189-1191.
176. Weier, H. U.; Fung, J.; y Lersch, R. A. (1999). Assignment of protooncogene MERTK (a.k.a. c-mer) to human chromosome 2q14.1 by in situ hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics*, *84*(1-2), 91-92.
177. Weleber, R. G.; Francis, P. J.; Trzuppek, K. M.; y Beattie, C. (1993). Leber Congenital Amaurosis. En R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger, T. D. Bird, C. R. Dolan, C.-T. Fong, R. J. Smith, y K. Stephens (Eds.), *GeneReviews*(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle.
178. Wiszniewski, W.; Lewis, R. A.; Stockton, D. W.; Peng, J.; Mardon, G.; Chen, R.; y Lupski, J. R. (2011). Potential involvement of more than one locus in trait manifestation for individuals with Leber congenital amaurosis. *Human Genetics*, *129*(3), 319-327.
179. Wittwer, C. T.; Reed, G. H.; Gundry, C. N.; Vandersteen, J. G.; y Pryor, R. J. (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry*, *49*(6 Pt 1), 853-860.
180. Wittwer, C. T. (2009). High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Human Mutation*, *30*(6), 857-859.
181. Wright, A. F.; Chakarova, C. F.; Abd El-Aziz, M. M.; y Bhattacharya, S. S. (2010). Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nature Reviews. Genetics*, *11*(4), 273-284.
182. Wright, A. F. (2015). Long-Term Effects of Retinal Gene Therapy in Childhood Blindness. *New England Journal of Medicine*, *372*(20), 1954-1955.

**Y**

183. Yang, L.; Wu, L.; Yin, X.; Chen, N.; Li, G.; y Ma, Z. (2014). Novel mutations of CRB1 in Chinese families presenting with retinal dystrophies. *Molecular Vision*, 20, 359-367.
184. Yvon, C.; Ramsden, C. M.; Lane, A.; Powner, M. B.; da Cruz, L.; Coffey, P. J.; y Carr, A.-J. F. (s.f.). Using Stem Cells to Model Diseases of the Outer Retina. *Computational and Structural Biotechnology Journal*.
185. Yzer, S.; Leroy, B. P.; De Baere, E.; de Ravel, T. J.; Zonneveld, M. N.; Voesenek, K.; Kellner, U.; Ciriano, J. P. M.; de Faber, J.-T. H. N.; Rohrschneider, K.; Roepman, R.; den Hollander, A. I.; Cruysberg, J. R.; Meire, F.; Casteels, I.; van Moll-Ramirez, N. G.; Allikmets, R.; van den Born, L. I.; y Cremers, F. P. M. (2006). Microarray-based mutation detection and phenotypic characterization of patients with Leber congenital amaurosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47(3), 1167-1176.

**Z**

186. Zernant, J.; Külm, M.; Dharmaraj, S.; den Hollander, A. I.; Perrault, I.; Preising, M. N.; Lorenz, B.; Kaplan, J.; Cremers, F. P. M.; Maumenee, I.; Koenekoop, R. K.; y Allikmets, R. (2005). Genotyping microarray (disease chip) for Leber congenital amaurosis: detection of modifier alleles. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(9), 3052-3059.
187. Zrenner, E.; Bartz-Schmidt, K. U.; Benav, H.; Besch, D.; Bruckmann, A.; Gabel, V.-P.; Gekeler, F.; Greppmaier, U.; Harscher, A.; Kibbel, S.; Koch, J.; Kusnyerik, A.; Peters, T.; Stingl, K.; Sachs, H.; Stett, A.; Szurman, P.; Wilhelm, B.; y Wilke, R. (2011). Subretinal electronic chips allow blind patients to read letters and combine them to words. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 278(1711), 1489-1497.

## **ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO**

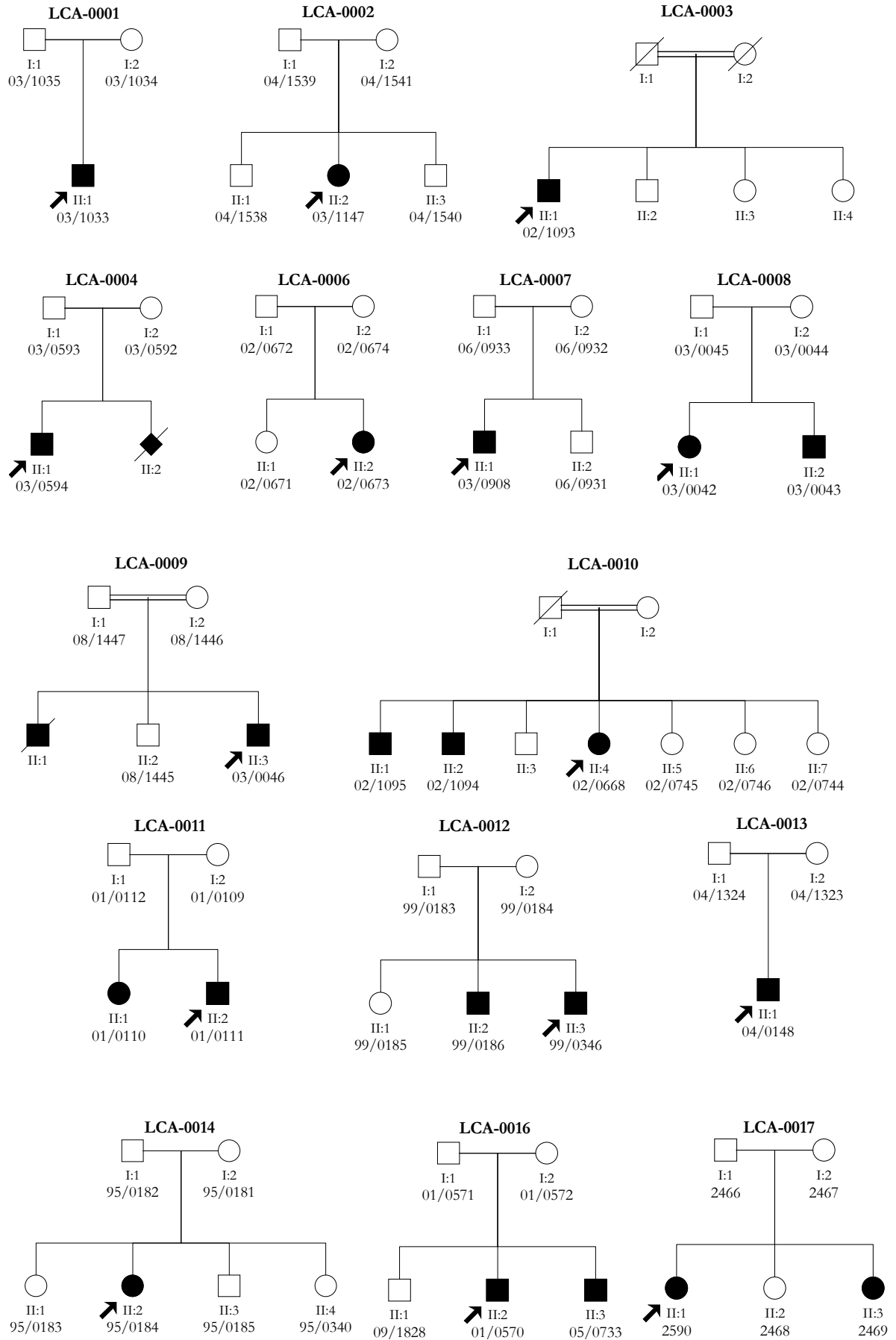
## TABLAS

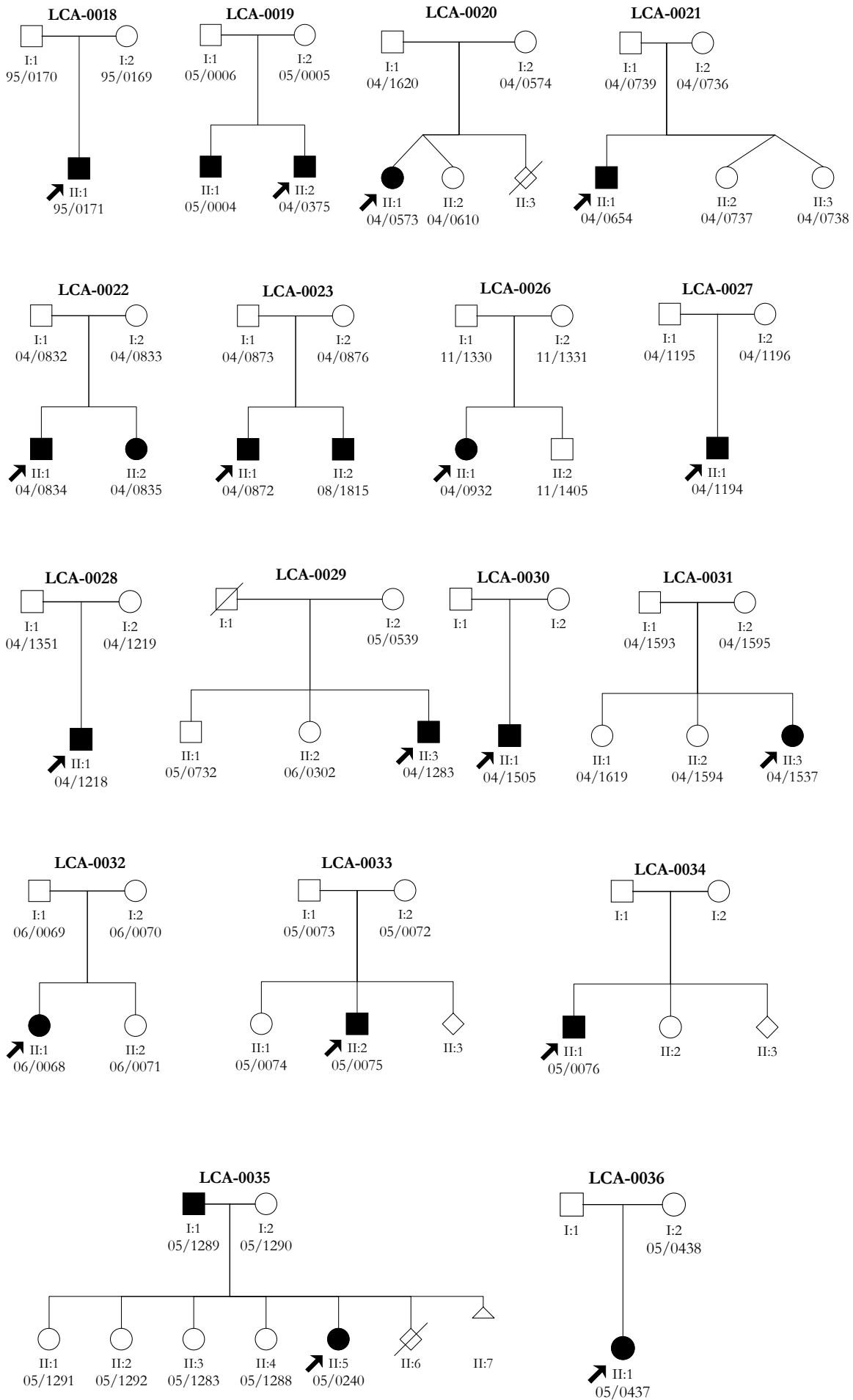
**Tabla I.** Comparación de resultados de diferentes estudios empleando el microarray de LCA.

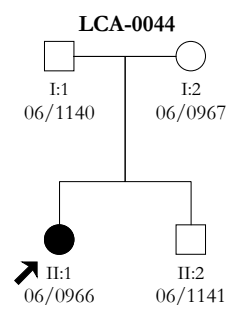
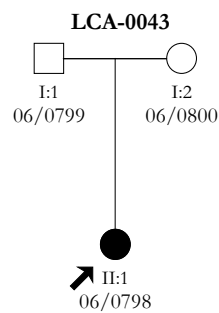
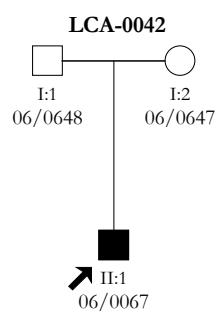
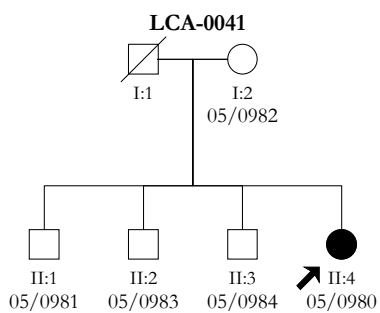
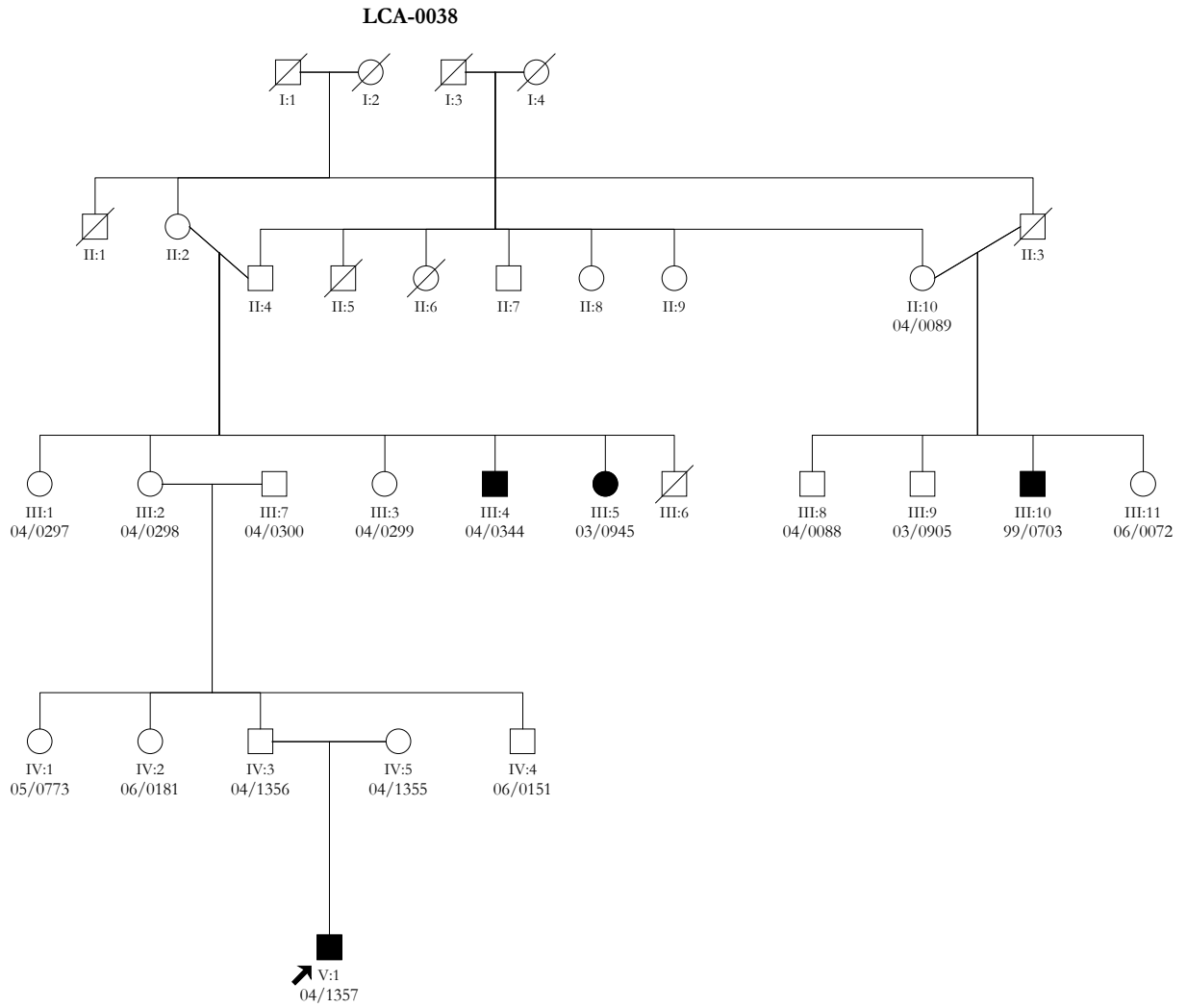
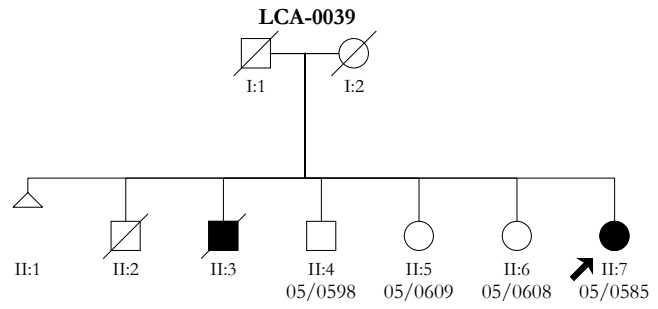
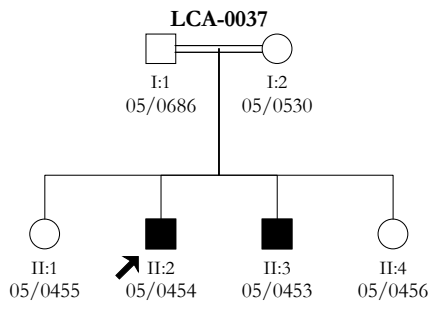
Estudio	Cohorte estudiada		Versión microarray LCA		Variantes detectadas								Gen más frecuente		Fisher*	
	Origen	Familias	Genes	Variantes	Alelos		Fam. con mutaciones		Fam. con 2 mutaciones		Fam. con 1 mutación		Gen	Familias		
					Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%		Nº		%
Este estudio	España	130	15	780	57	21,92	38	29,23	19	14,62	19	14,62	<i>CRB1</i>	14	10,77	-
Vallespín, 2008	España	44	10	417	16	18,18	12	27,27	4	9,09	8	18,18	<i>CRB1</i>	8	18,18	0,850
Henderson <i>et al.</i> , 2007	R. Unido, India, Pakistán, otros países europeos y asiáticos	59	8	344	36	30,51	27	45,76	9	15,25	18	30,51	<i>GUCY2D</i>	9	15,25	0,032
Yzer <i>et al.</i> , 2006	Holanda, Bélgica, Alemania	58	6	301	33	28,45	19	32,76	14	24,14	5	8,62	<i>CRB1</i>	9	15,52	0,731
Zernant <i>et al.</i> , 2005	EE.UU.	105			50	23,81	37	35,24	13	12,38	24	22,86	<i>GUCY2D</i>	12	11,43	0,329
	Canadá	59	8	307	24	20,34	18	30,51	6	10,17	12	20,34	<i>GUCY2D</i>	8	13,56	0,865
	Holanda, Bélgica, Alemania, Francia	41			17	20,73	14	34,15	3	7,32	11	26,83	<i>AIPL1</i>	8	19,51	0,564

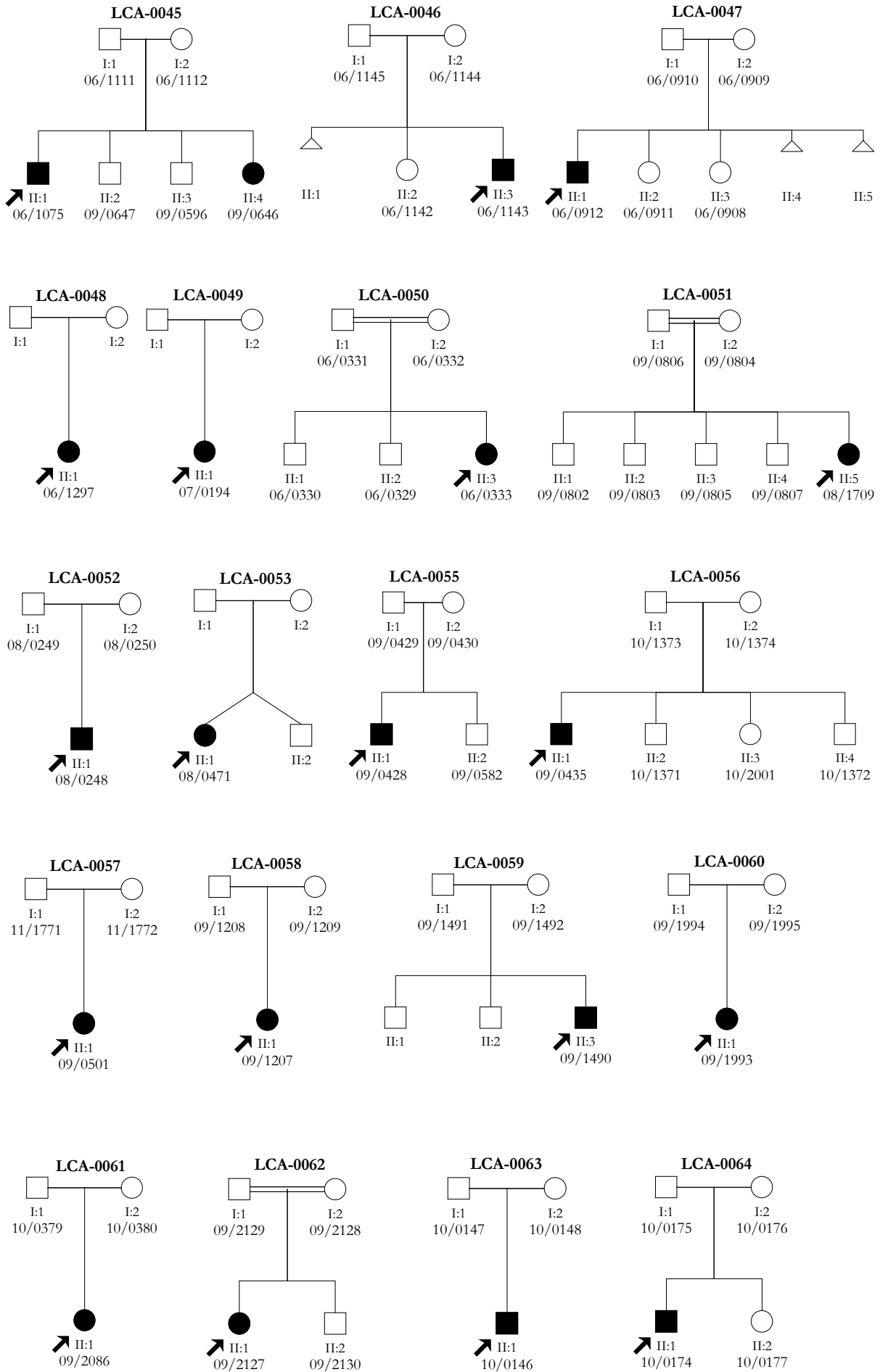
\* Resultados del test de Fisher, para el número de familias con mutaciones

**ESTRUCTURA DE LAS 130 FAMILIAS LCA ESTUDIADAS**

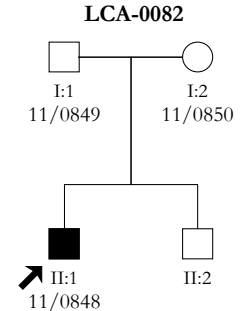
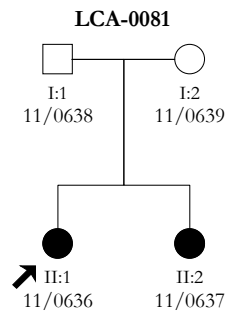
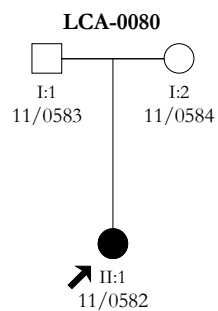
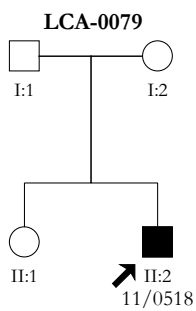
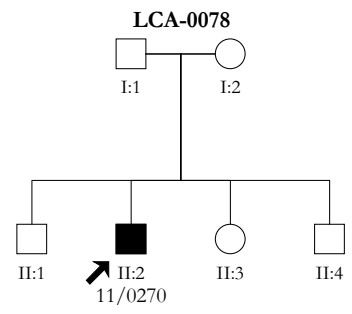
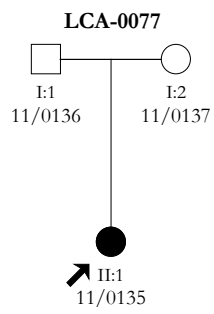
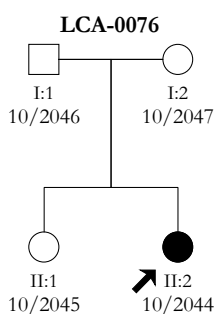
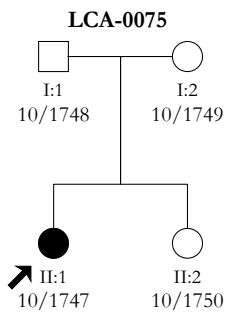
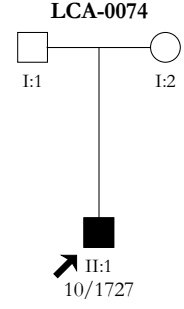
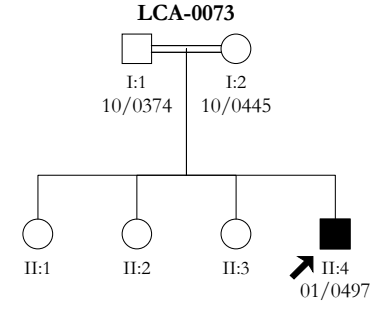
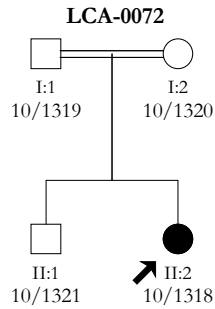
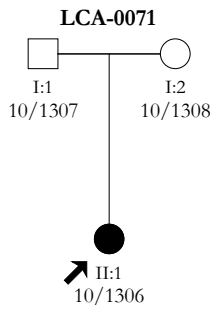
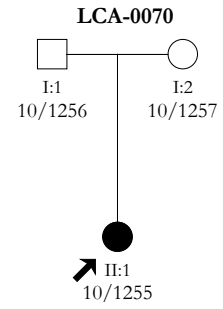
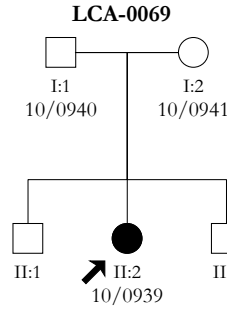
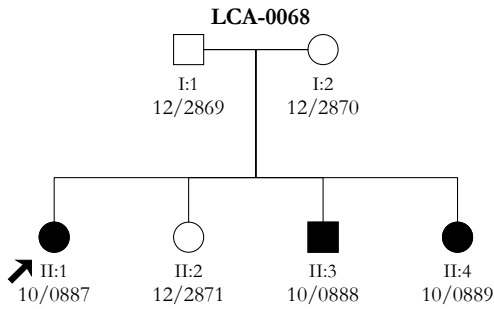
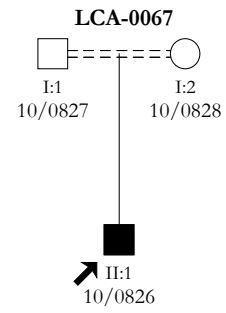
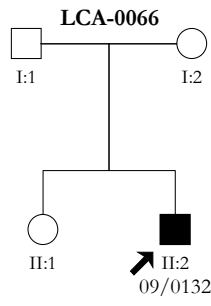
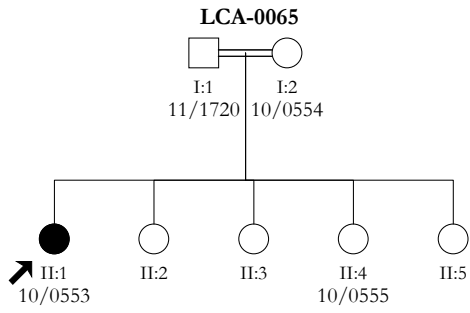


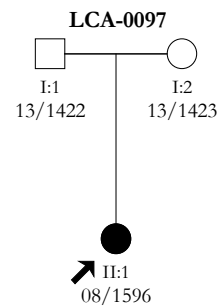
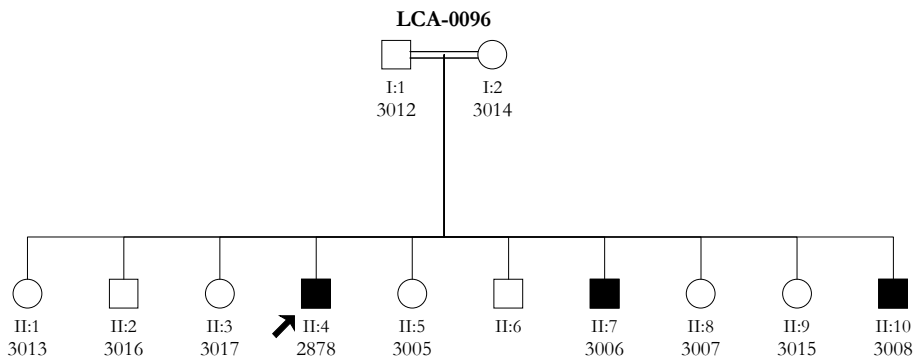
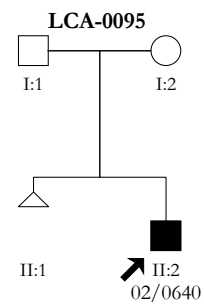
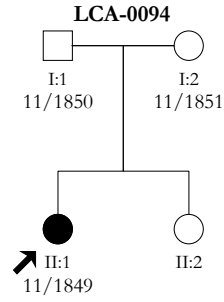
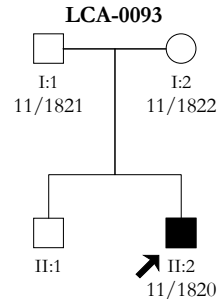
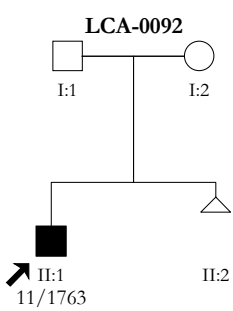
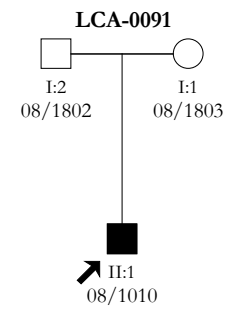
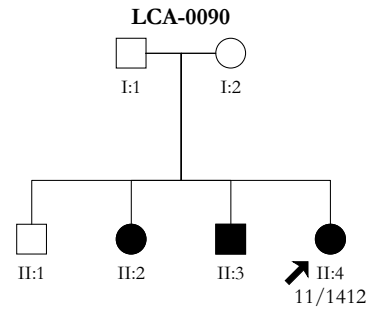
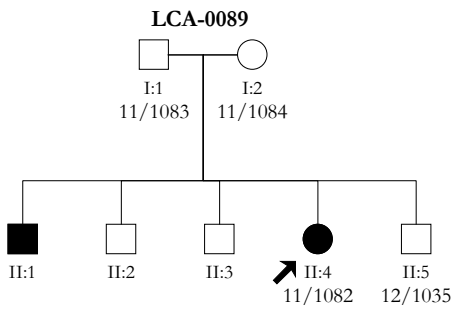
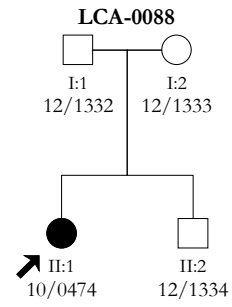
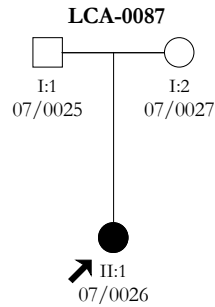
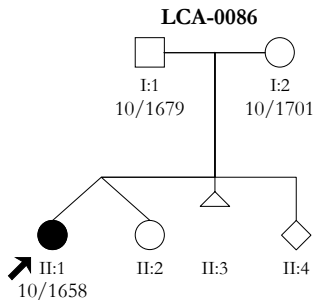
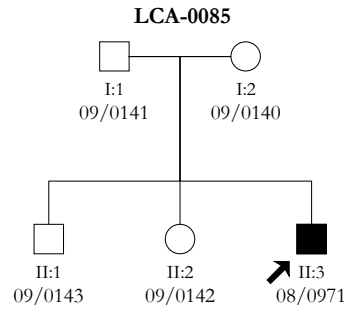
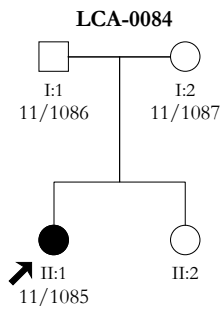
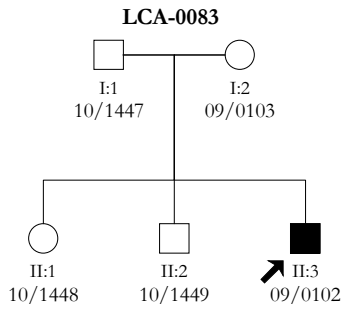


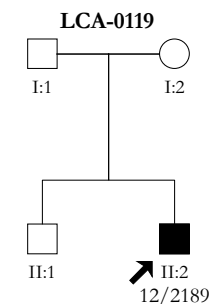
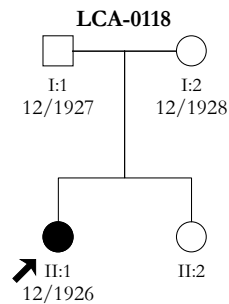
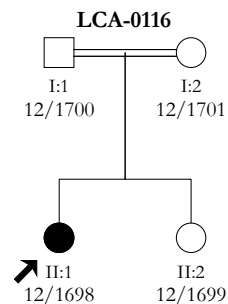
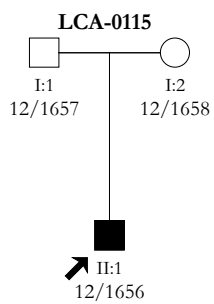
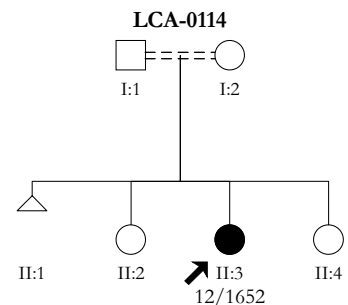
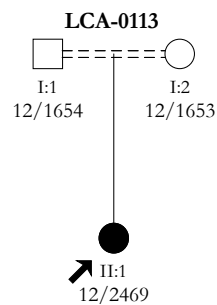
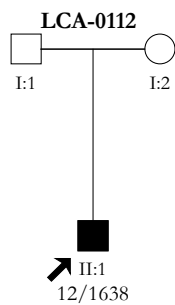
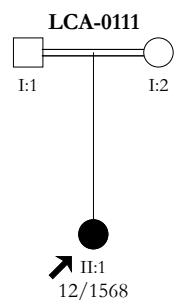
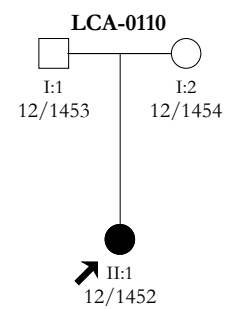
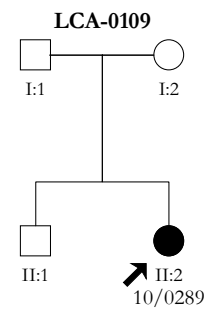
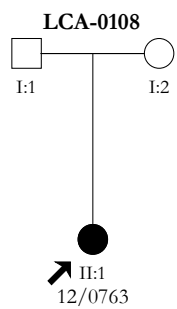
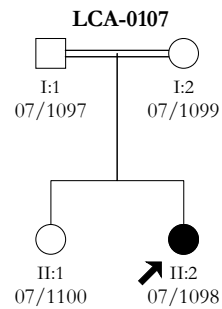
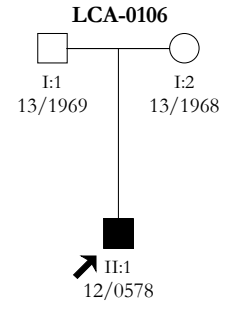
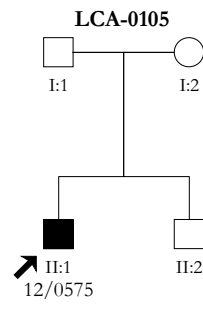
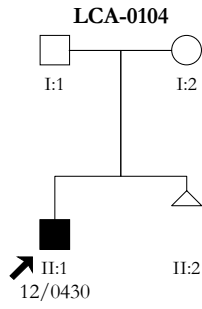
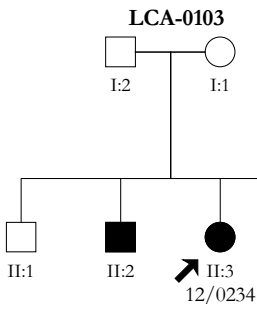
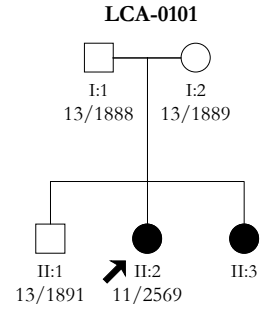
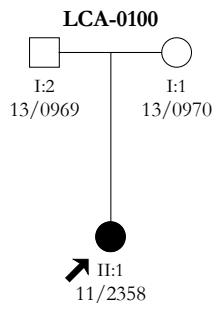
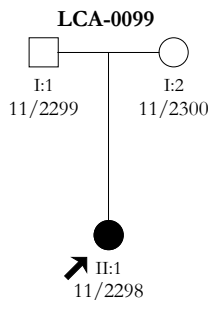
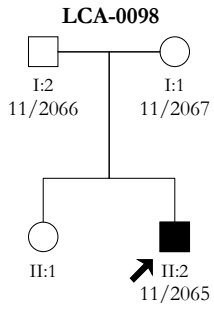


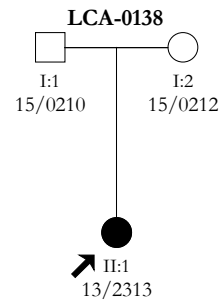
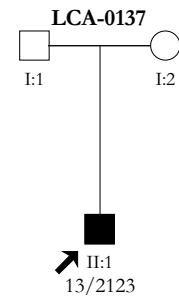
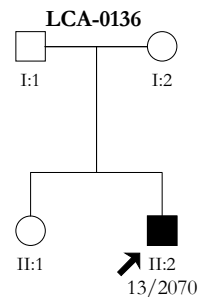
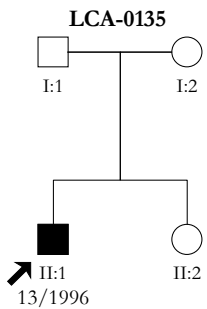
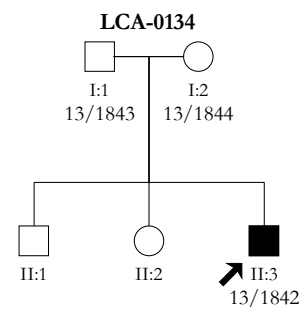
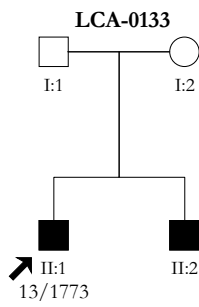
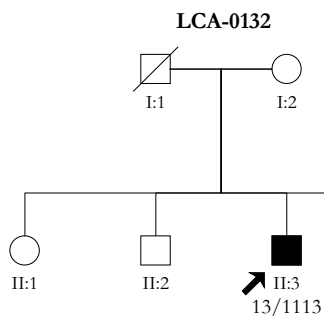
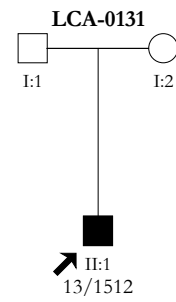
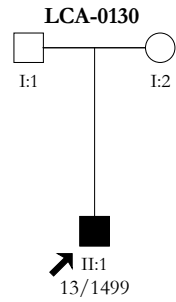
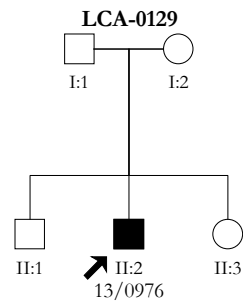
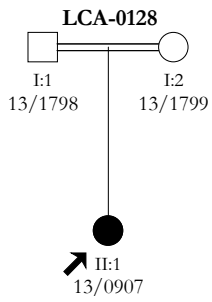
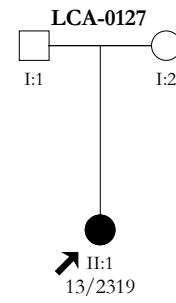
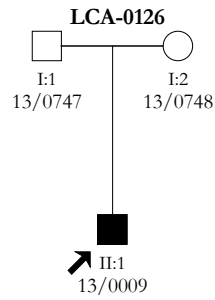
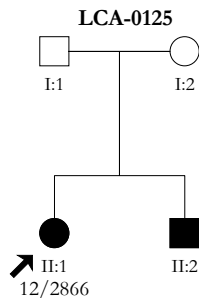
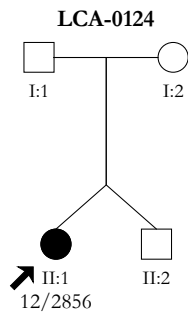
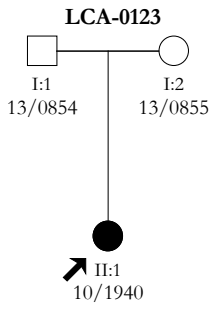
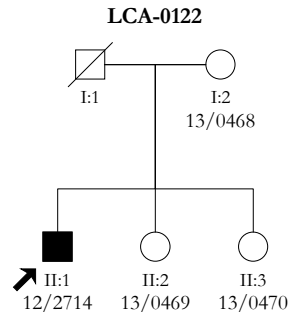
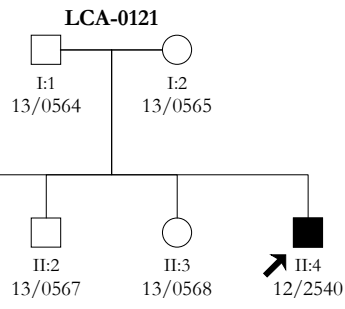
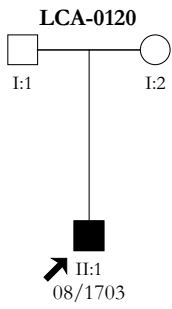




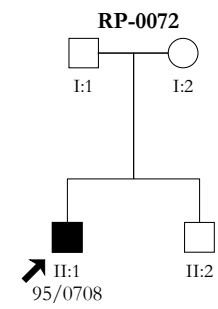
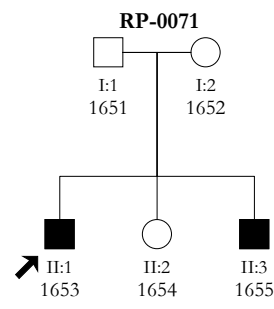
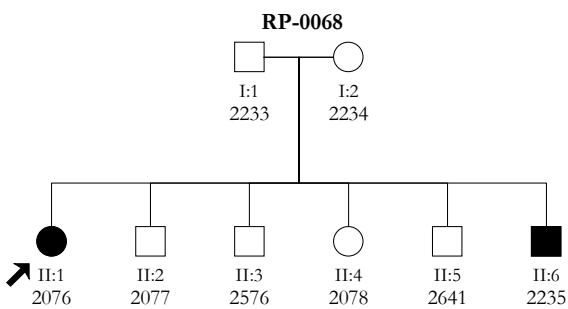
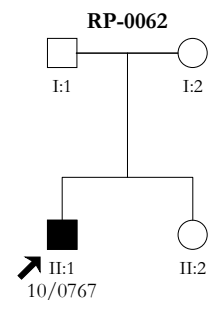
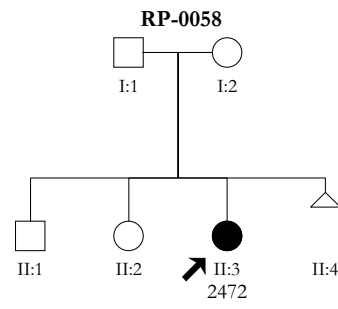
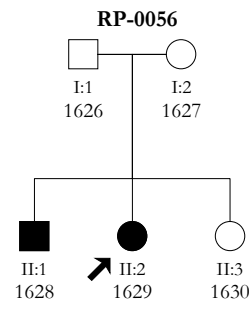
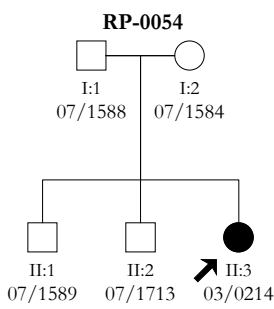
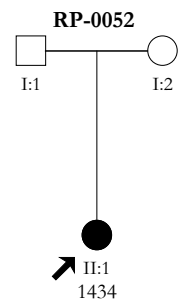
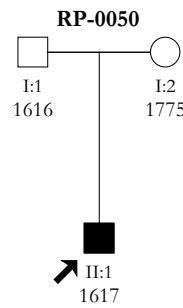
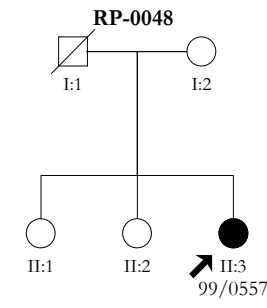
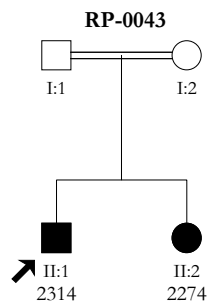
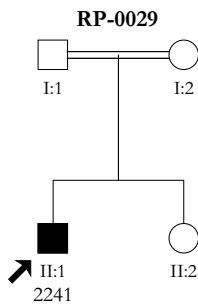
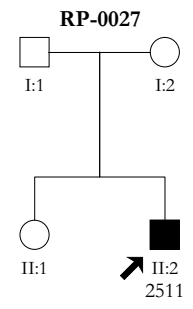
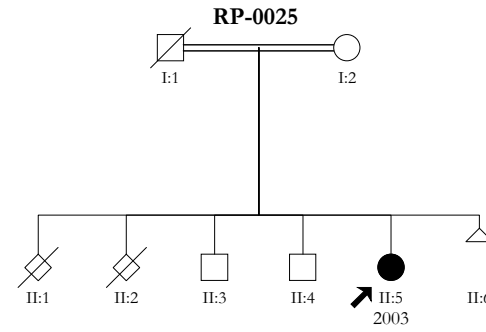
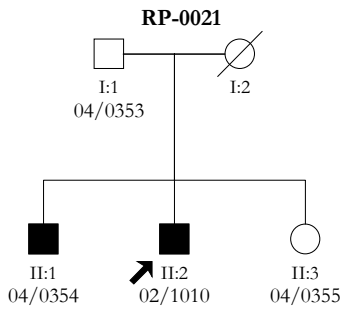
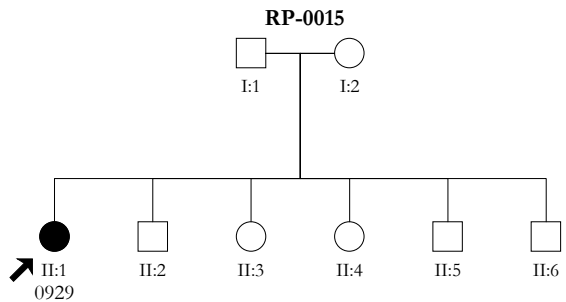
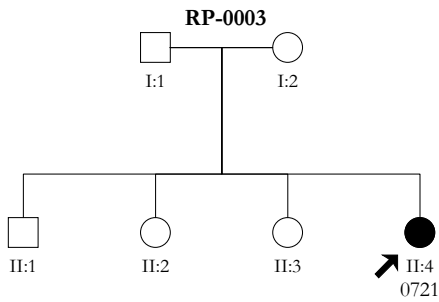


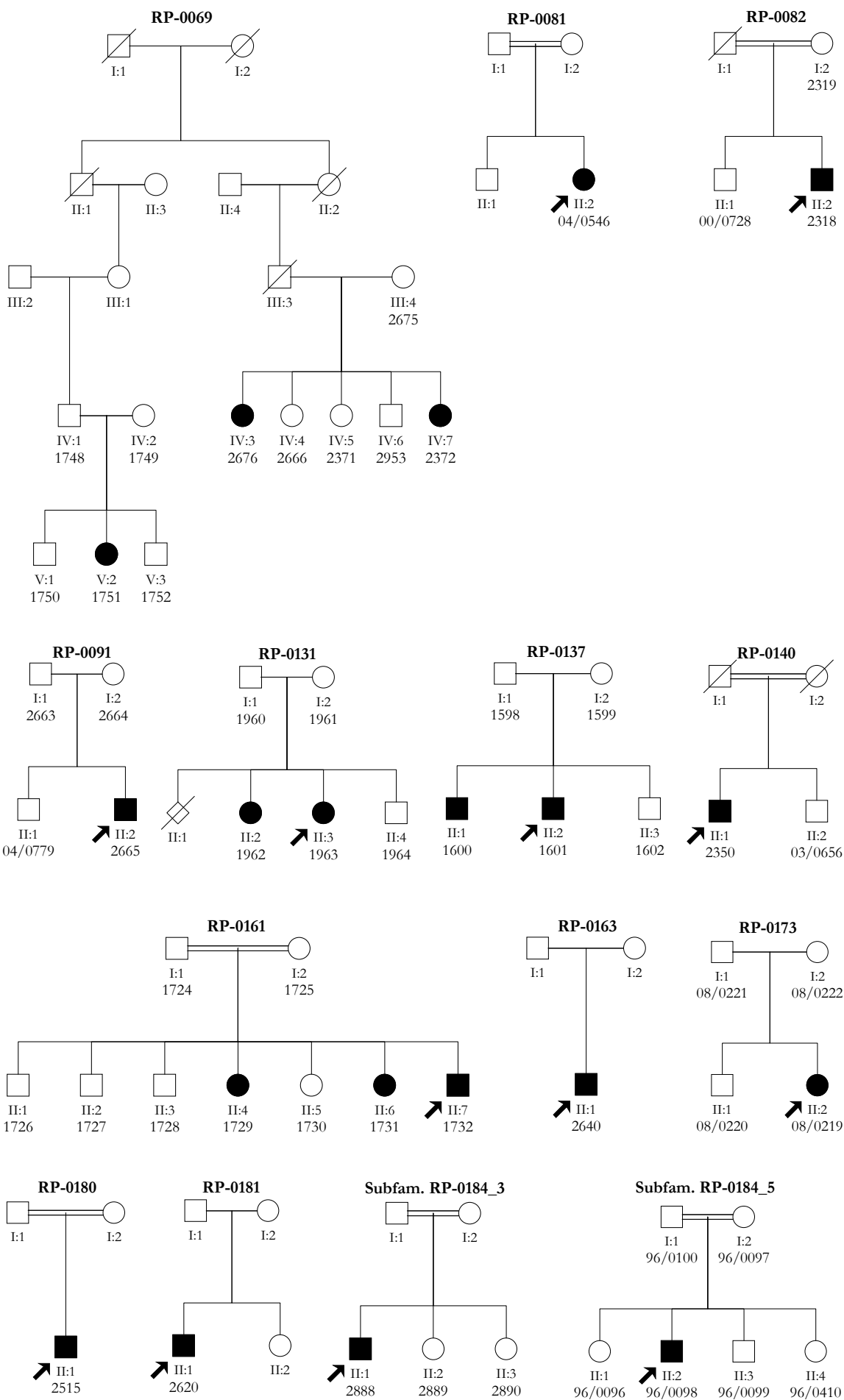




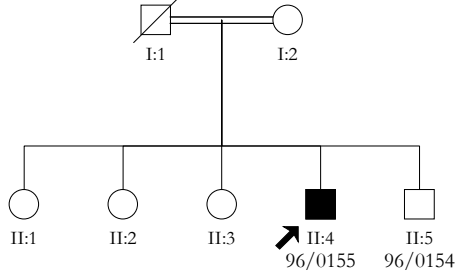


ESTRUCTURA DE LAS 290 FAMILIAS RP-IP ESTUDIADAS

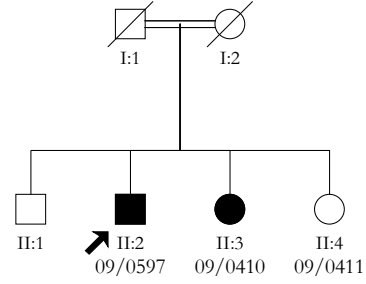




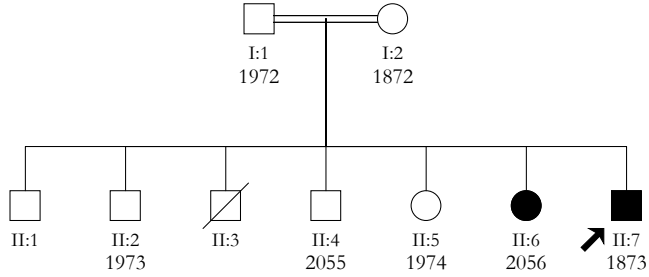
Subfam. RP-0184\_6



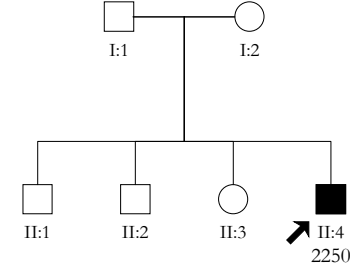
RP-0186



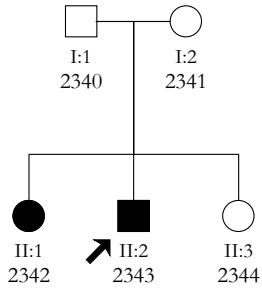
RP-0201



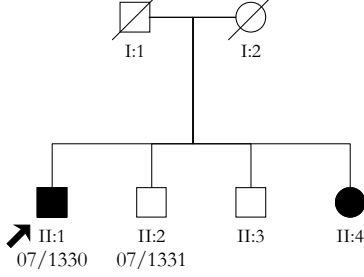
RP-0223



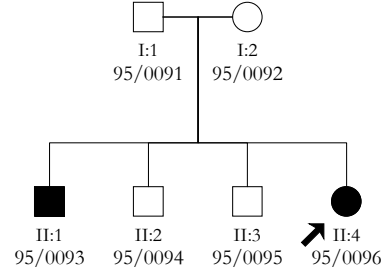
RP-0235



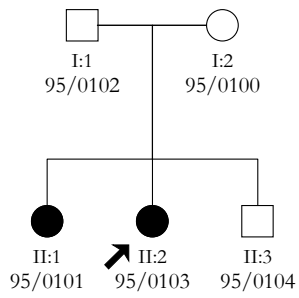
RP-0261



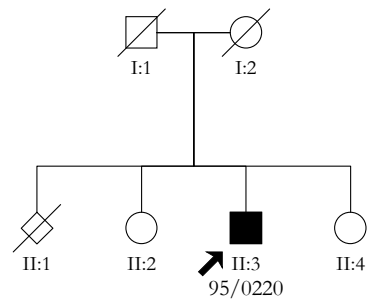
RP-0280



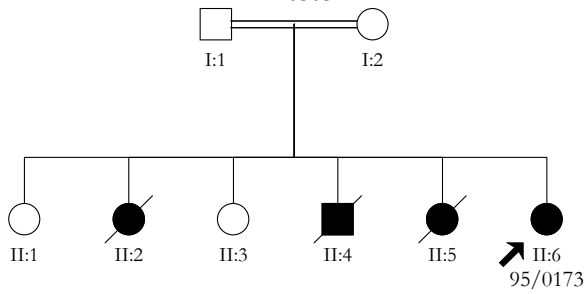
RP-0298



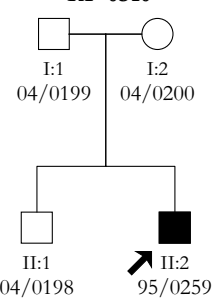
RP-0302



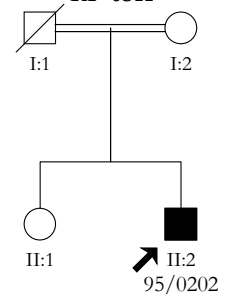
RP-0305

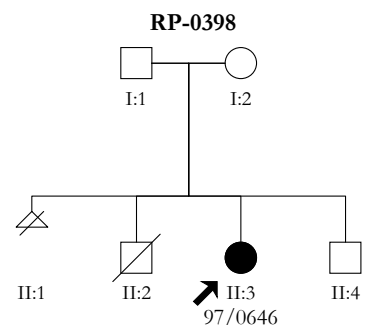
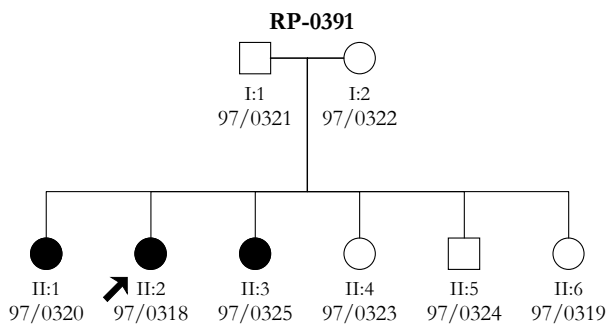
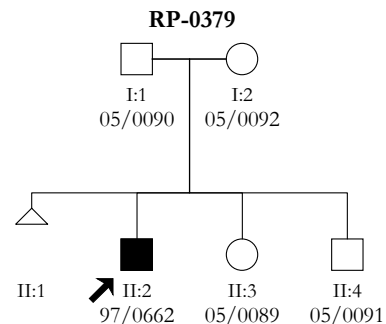
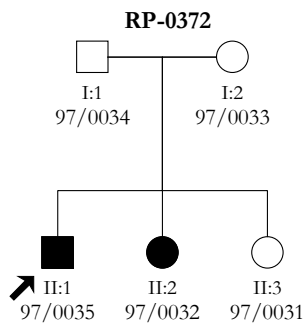
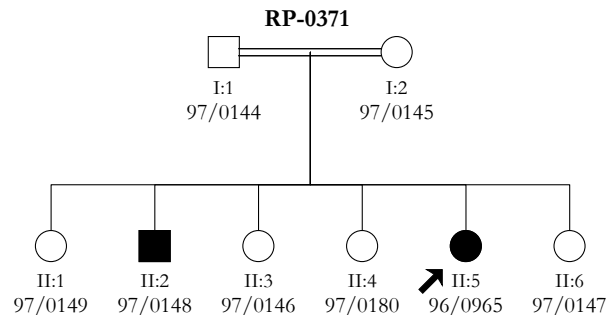
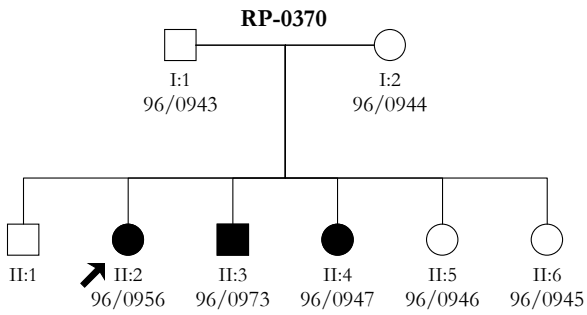
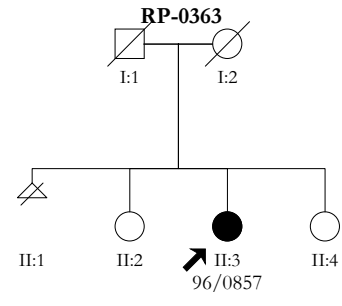
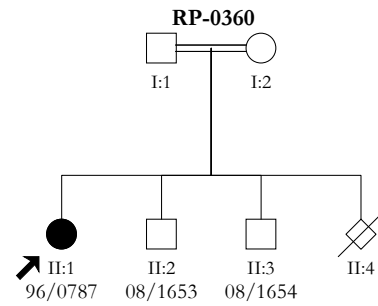
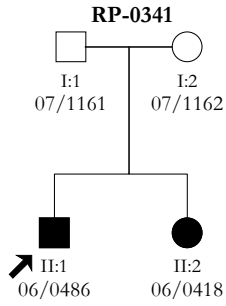
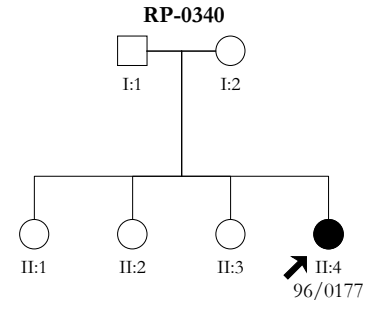
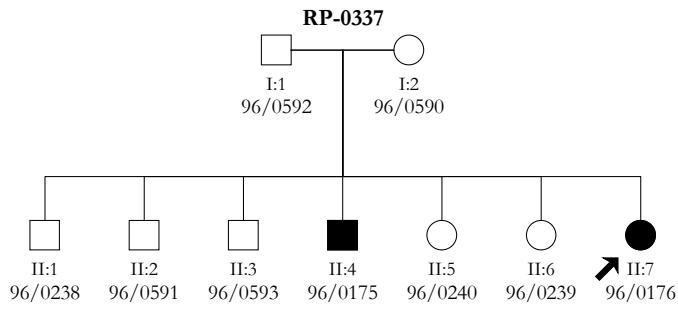


RP-0310

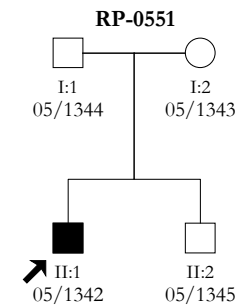
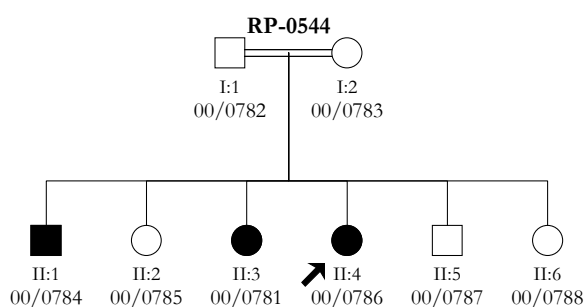
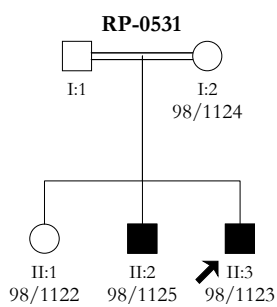
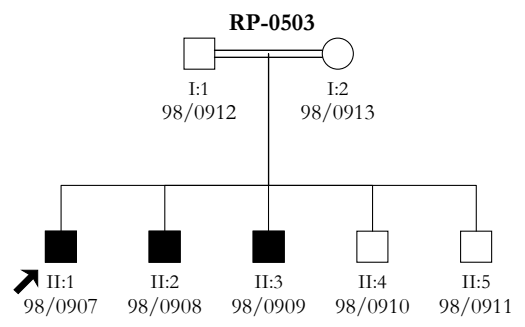
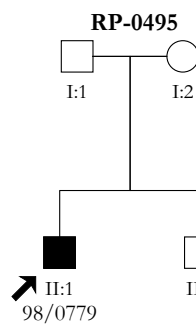
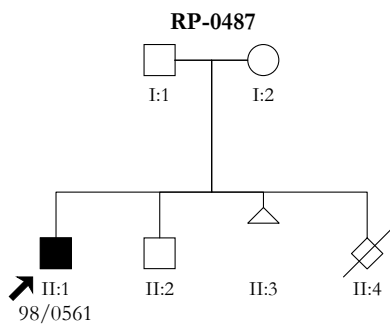
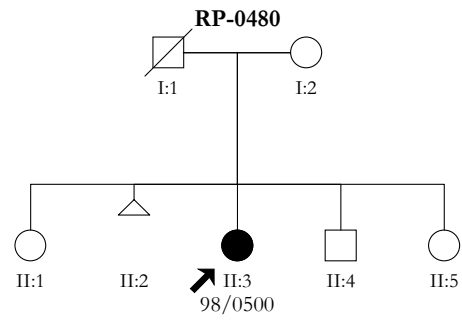
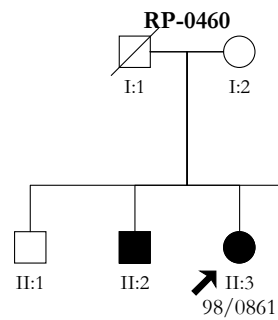
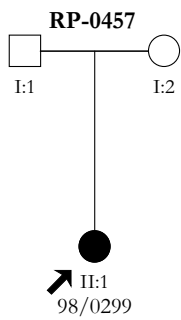
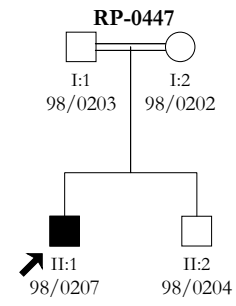
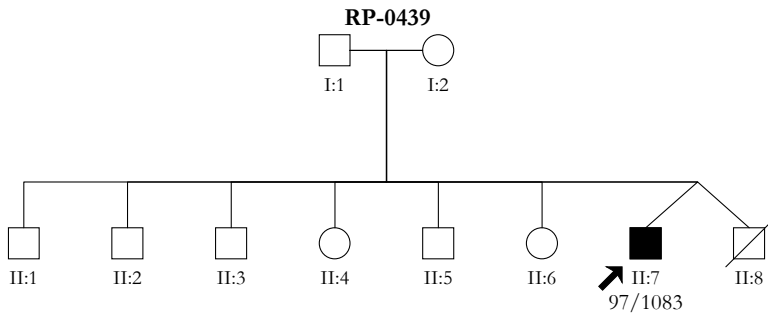
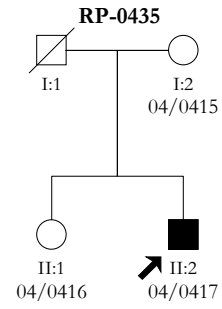
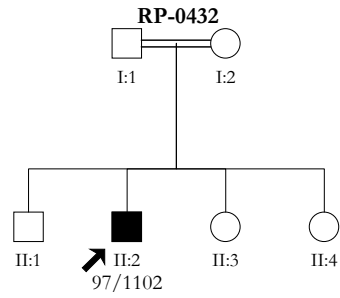


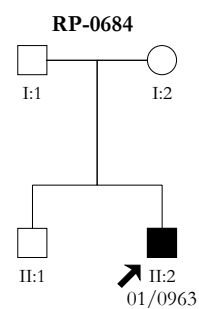
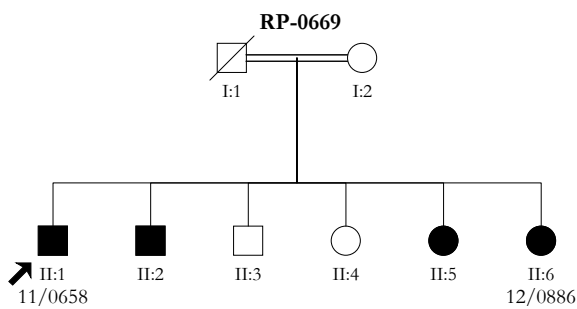
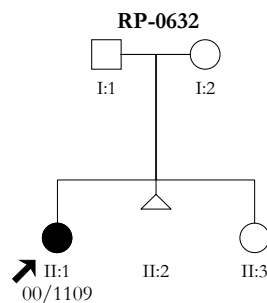
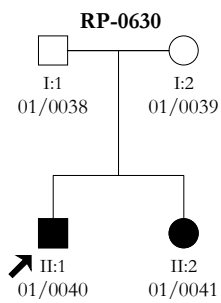
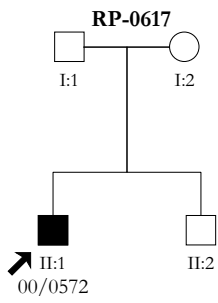
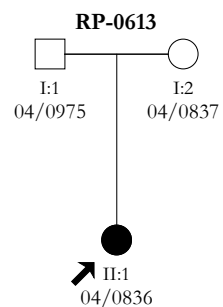
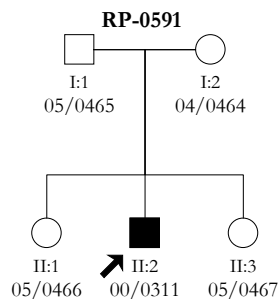
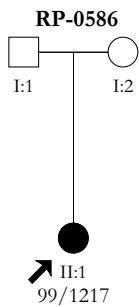
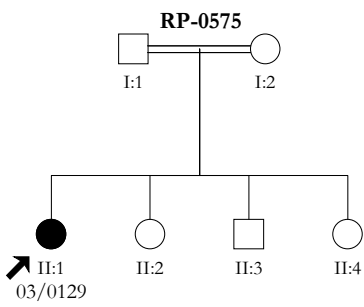
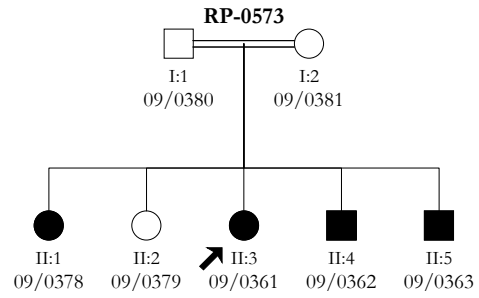
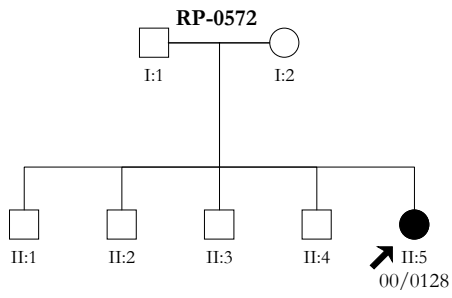
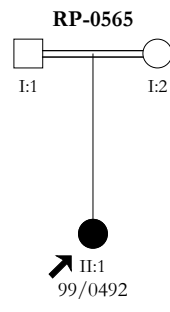
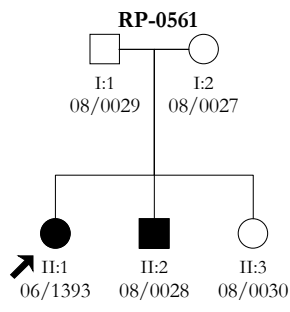
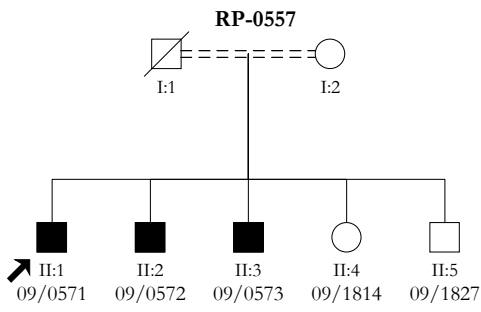
RP-0311

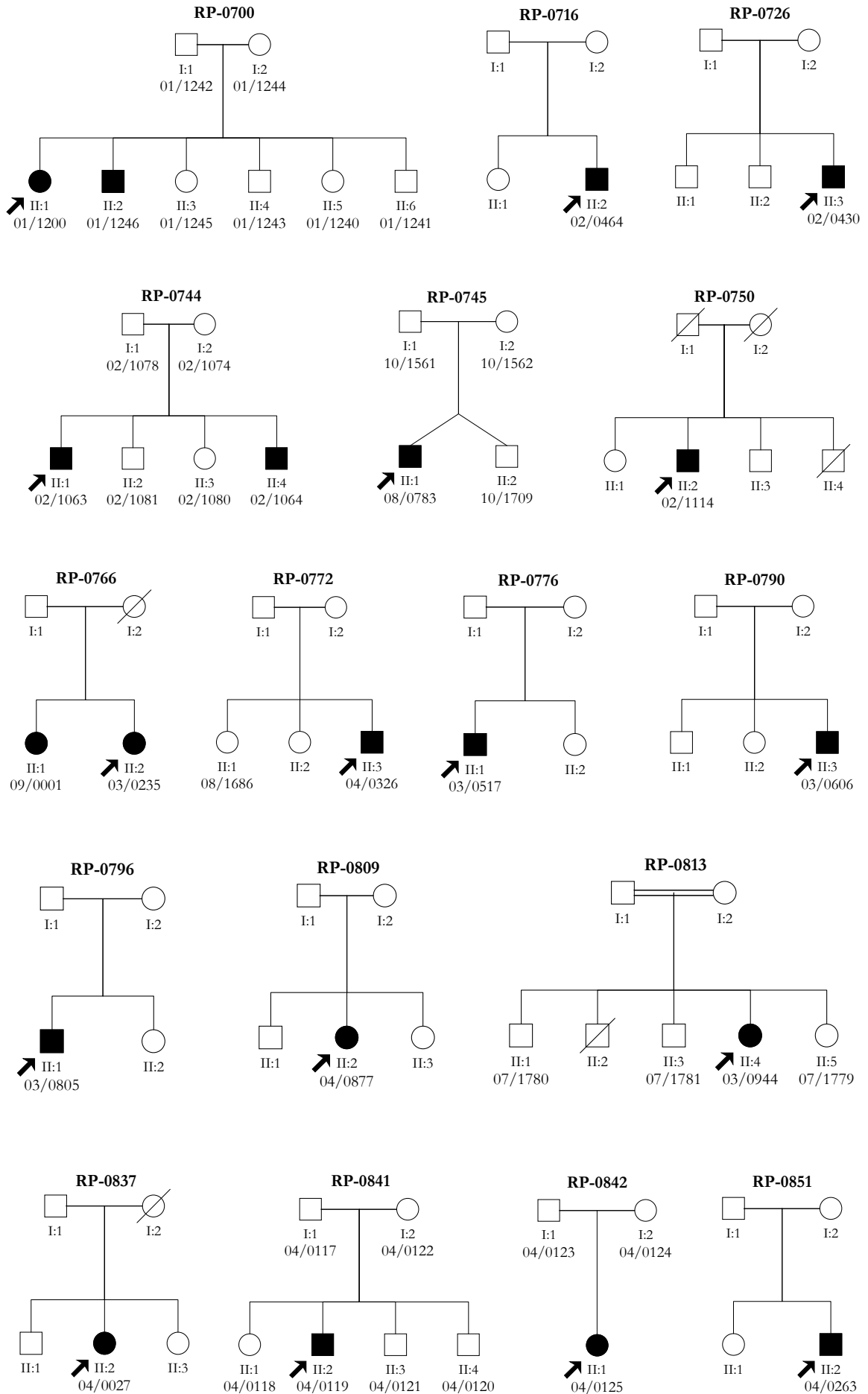


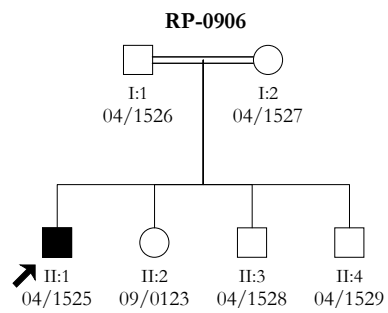
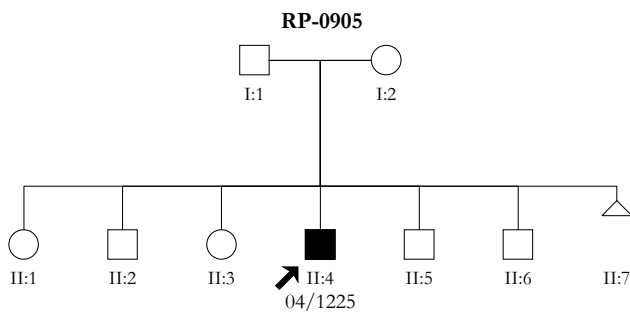
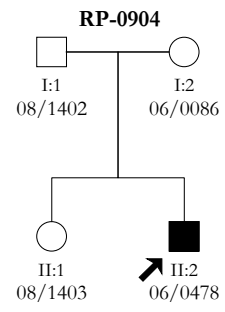
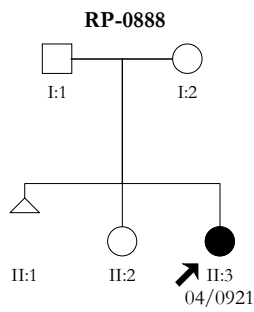
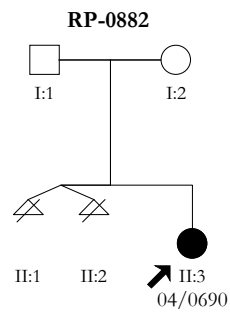
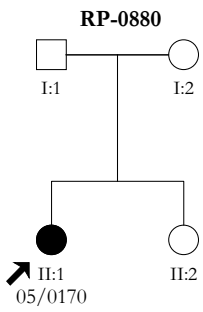
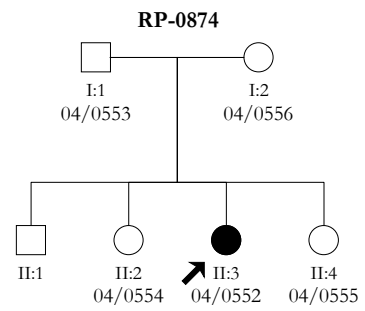
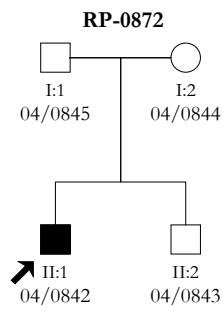
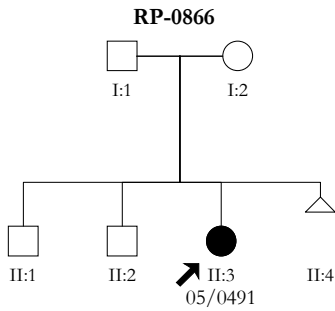
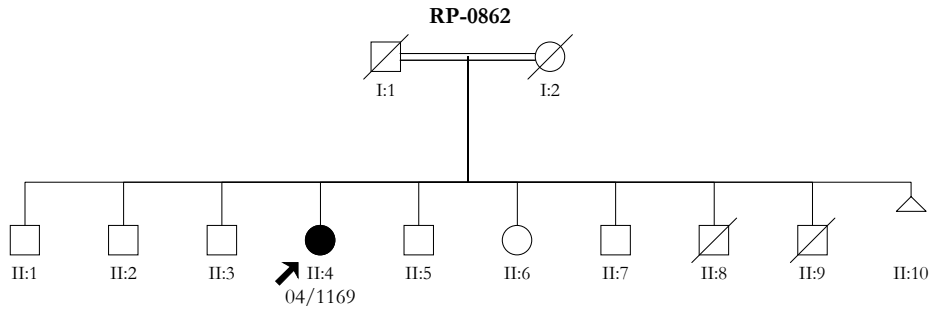
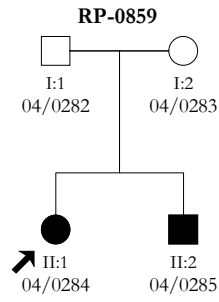
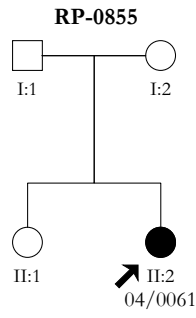


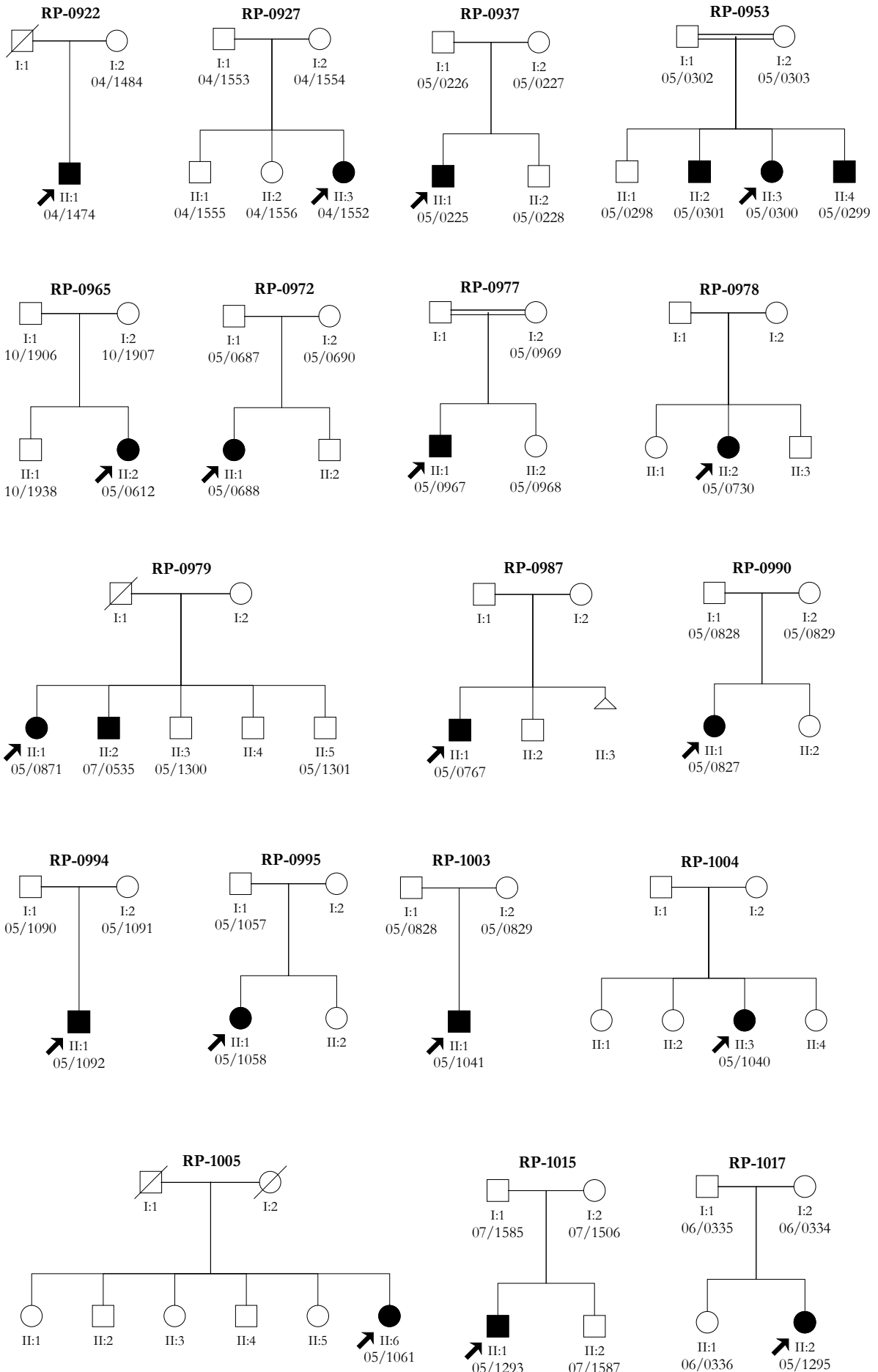


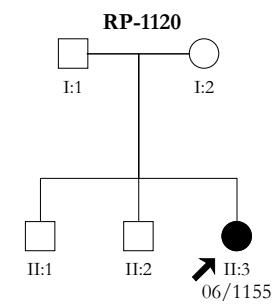
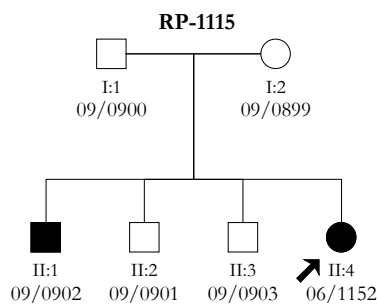
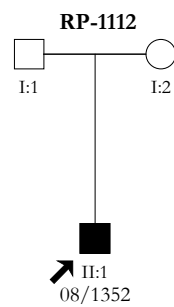
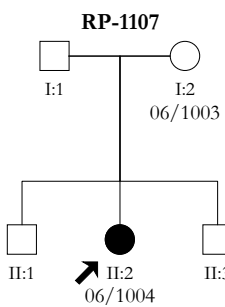
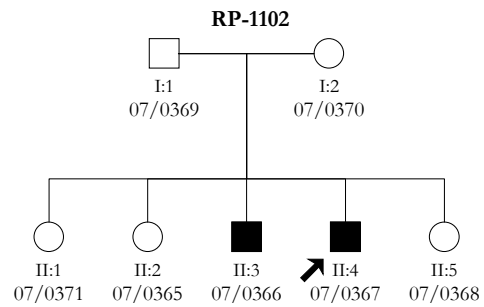
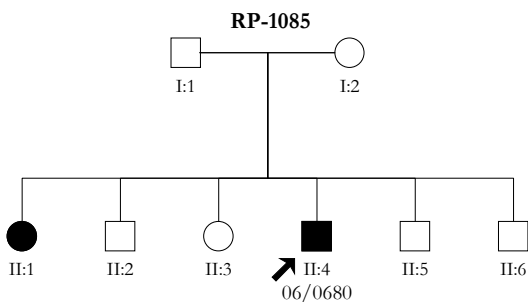
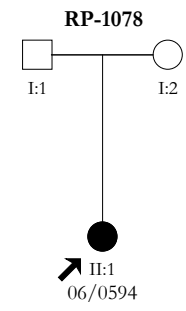
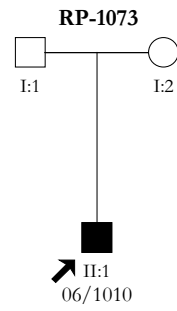
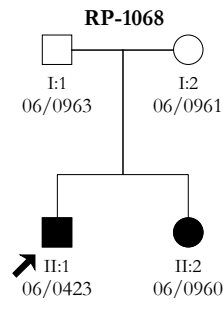
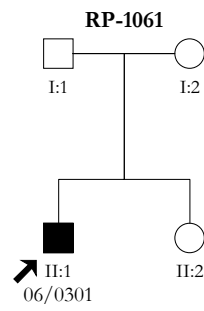
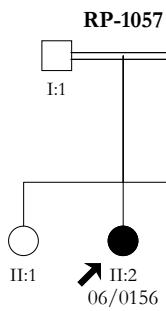
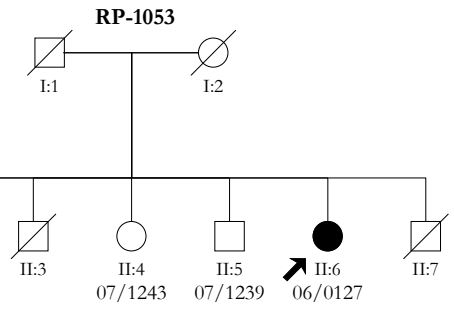
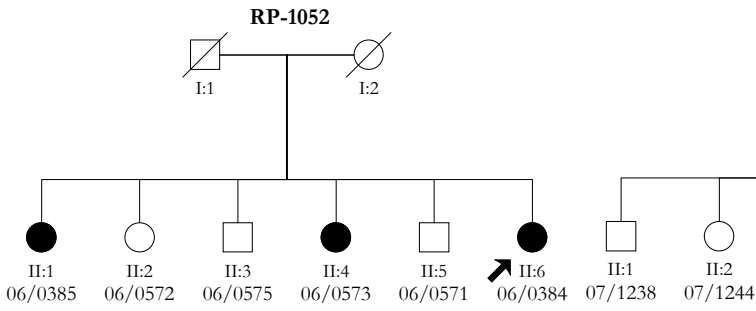
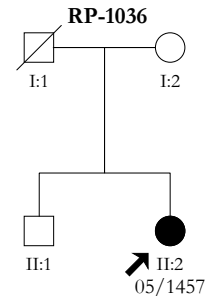
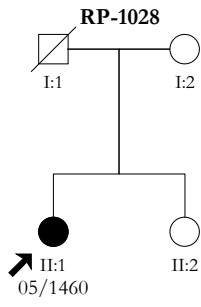
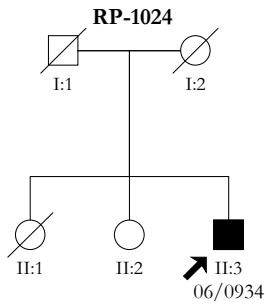


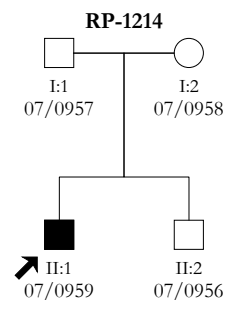
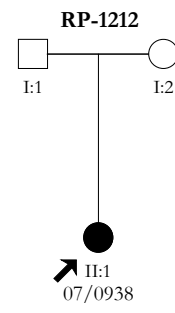
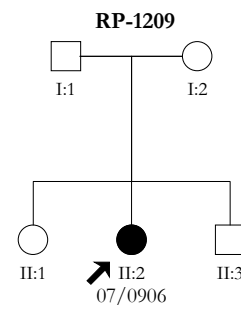
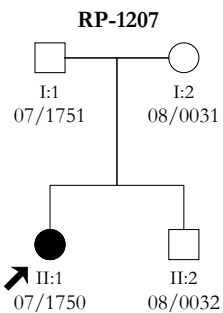
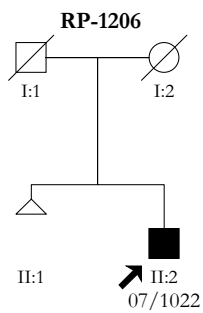
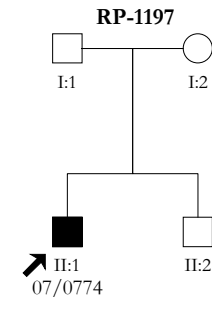
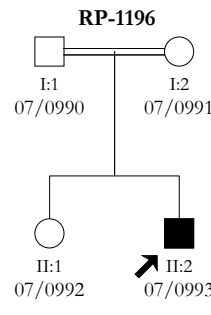
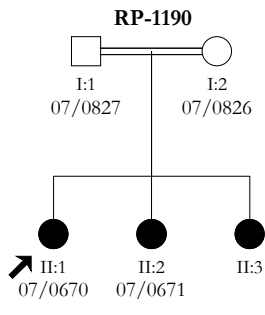
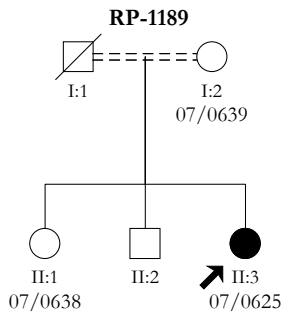
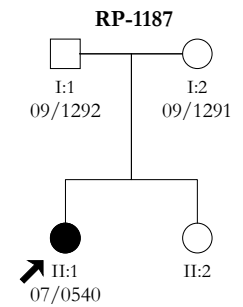
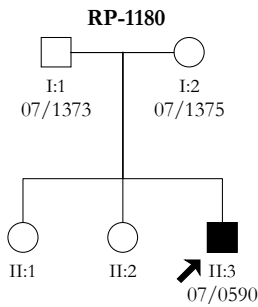
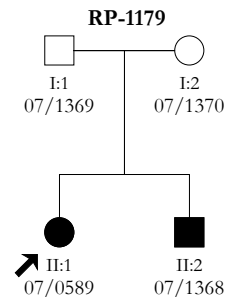
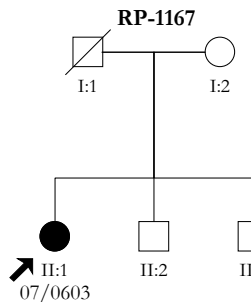
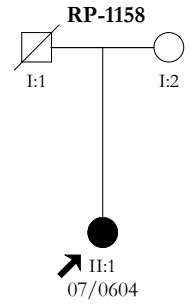
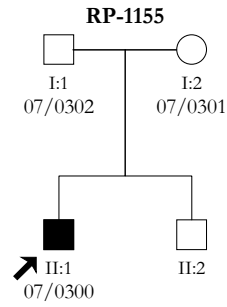
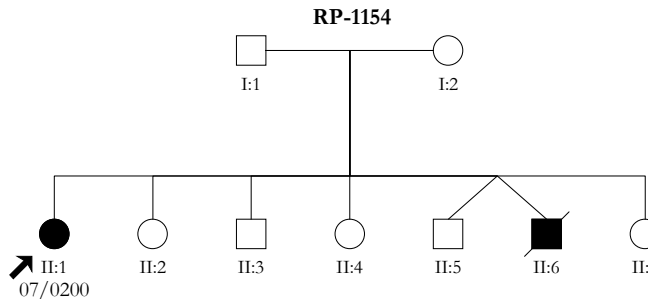
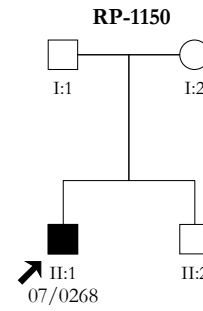
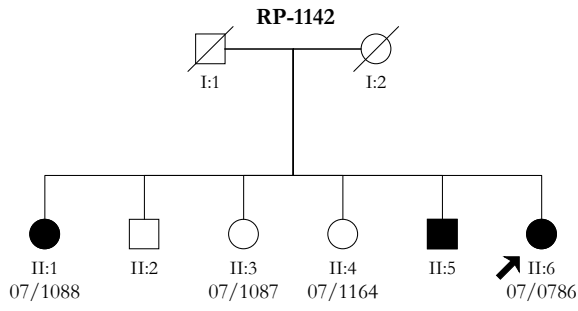


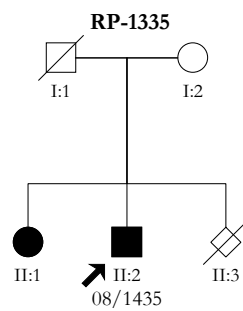
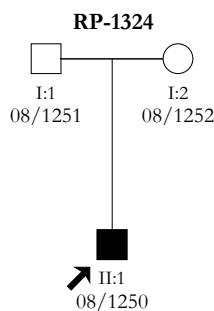
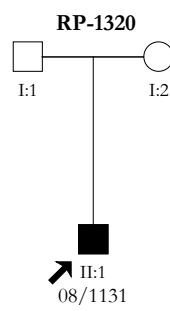
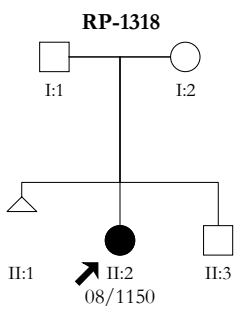
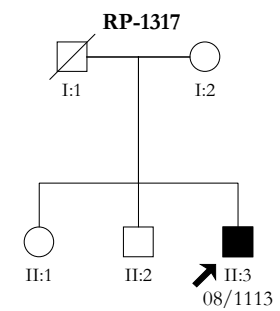
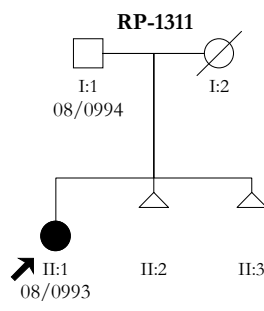
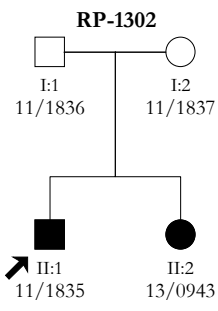
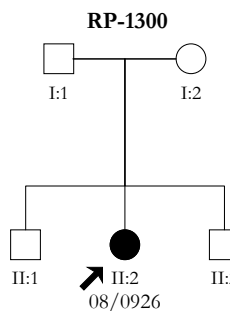
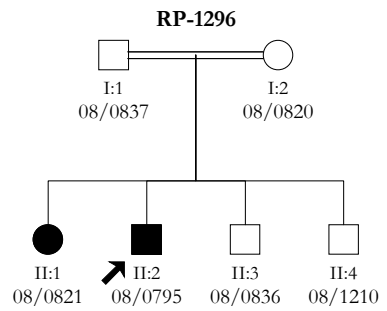
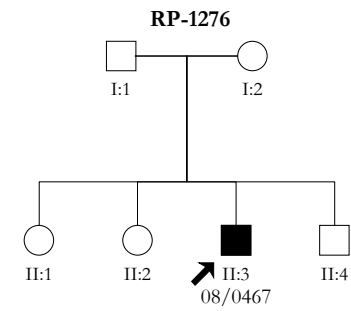
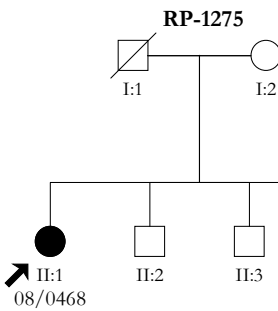
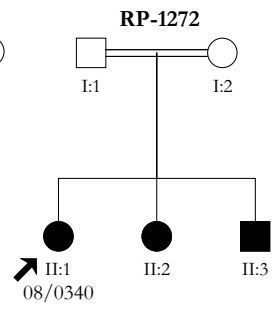
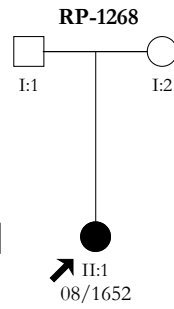
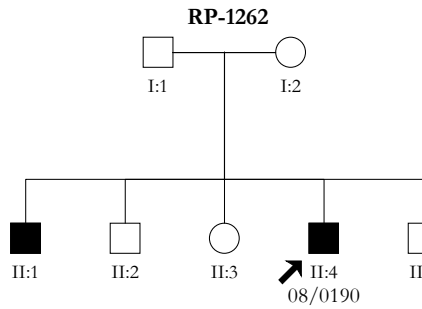
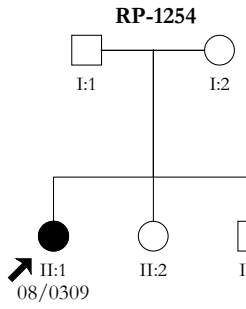
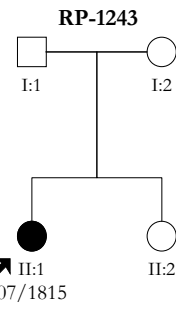
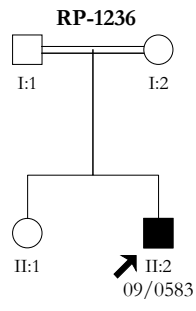
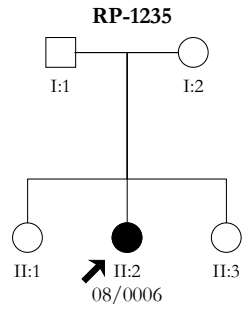
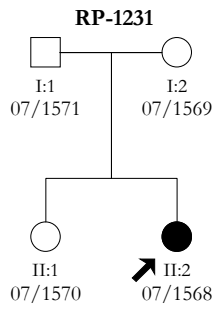




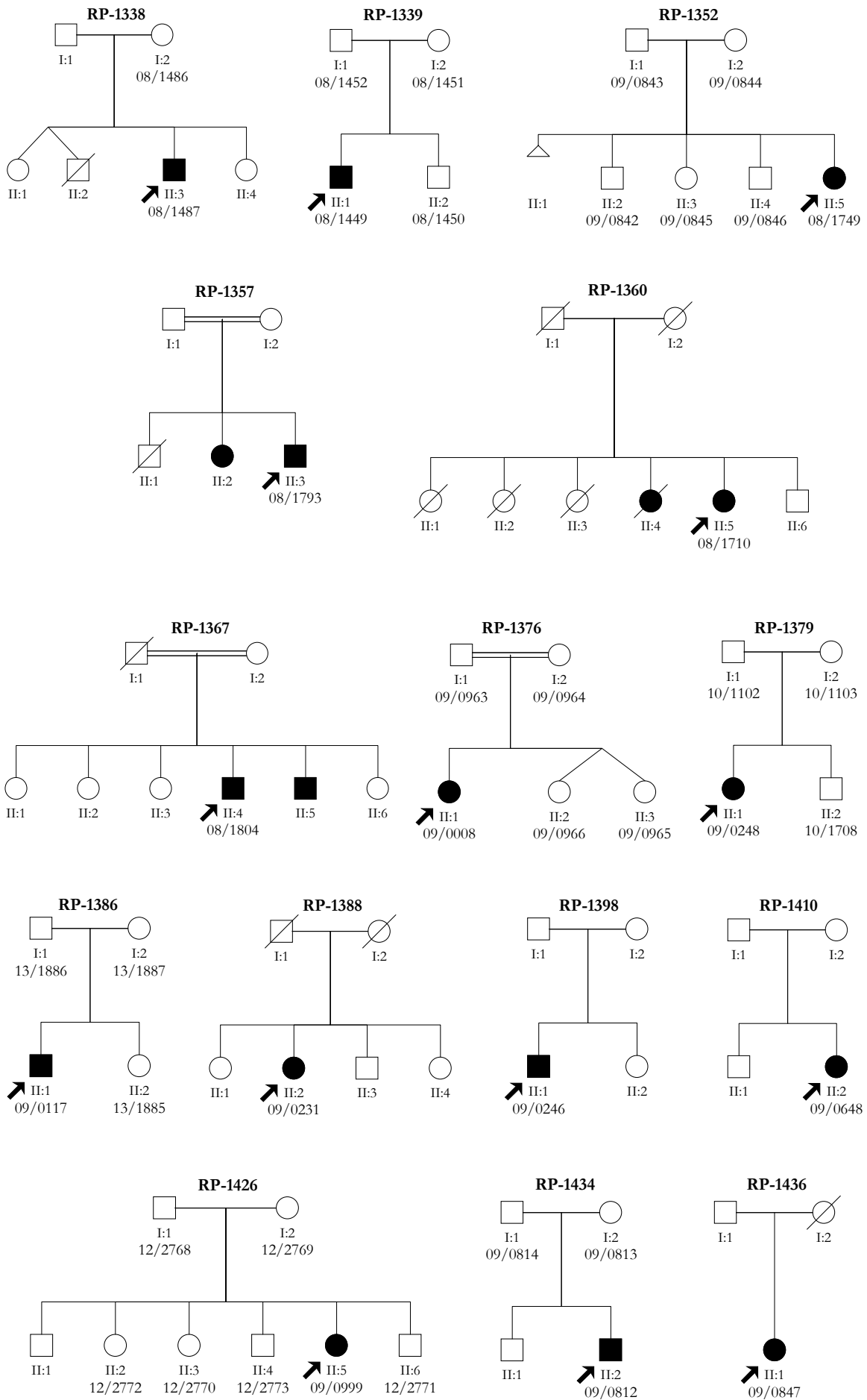


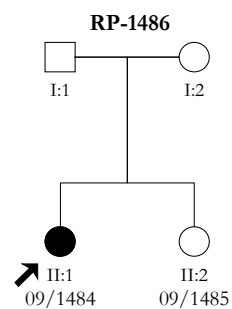
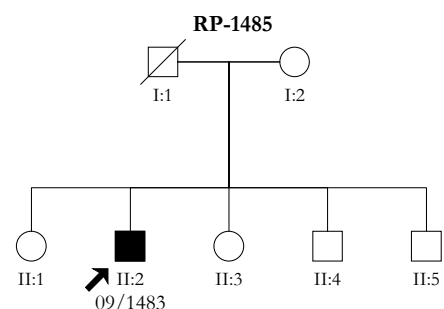
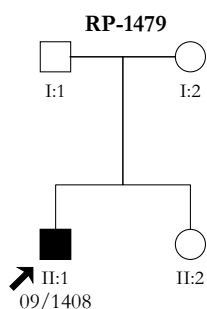
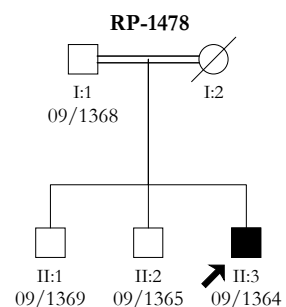
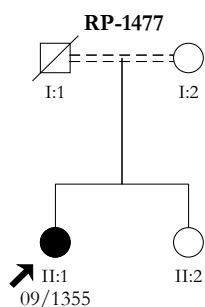
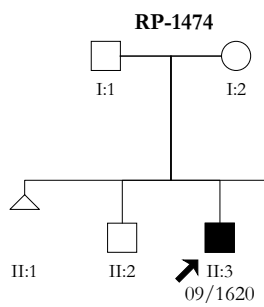
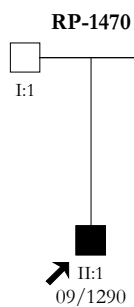
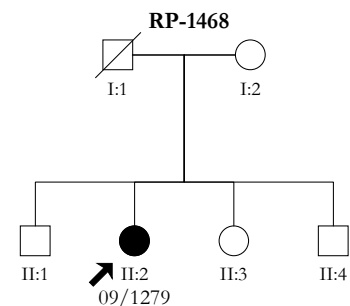
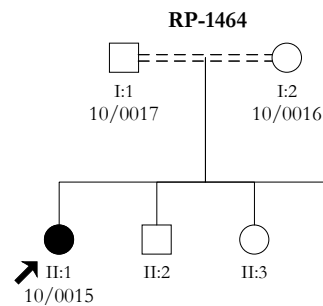
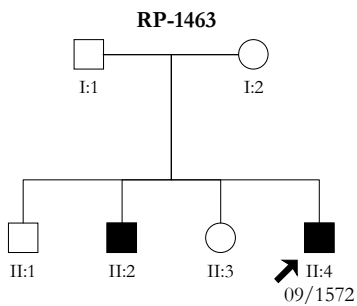
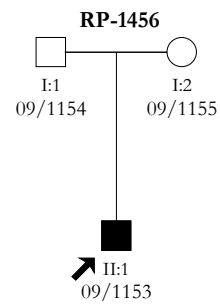
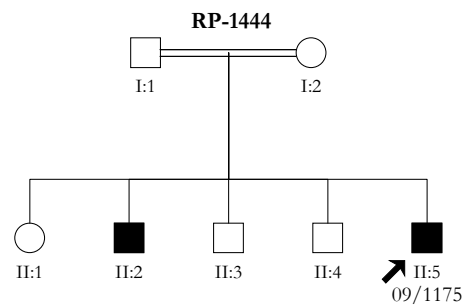
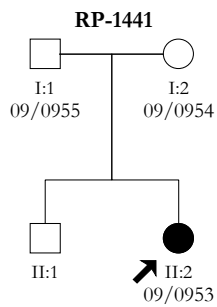
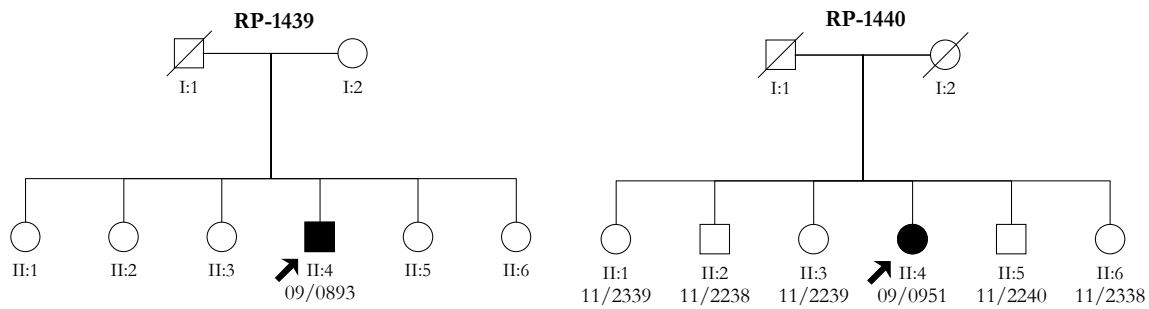


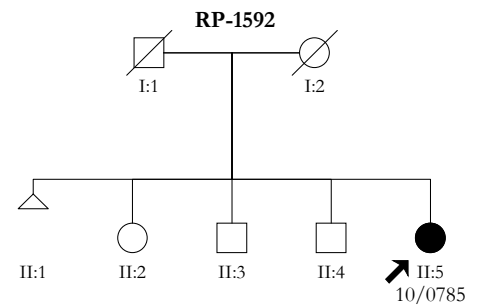
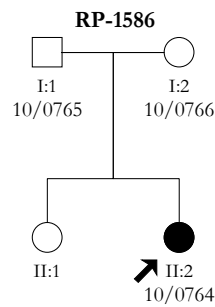
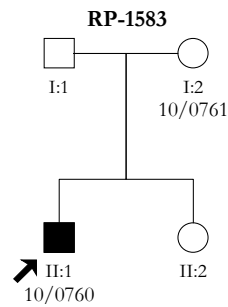
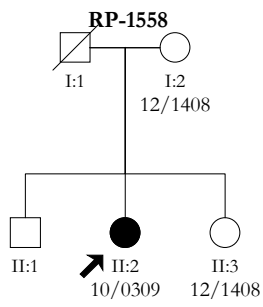
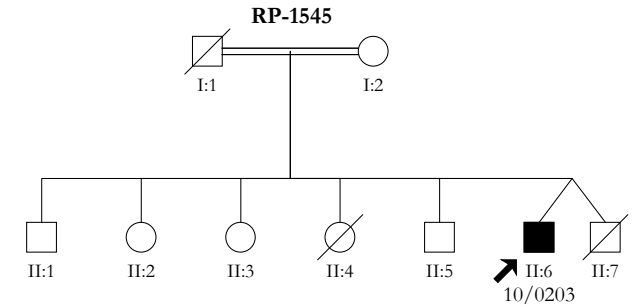
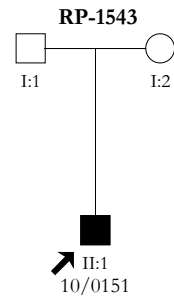
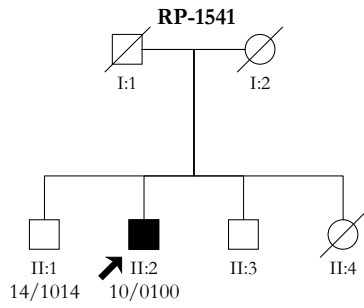
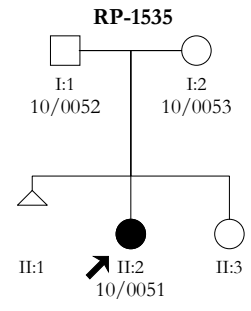
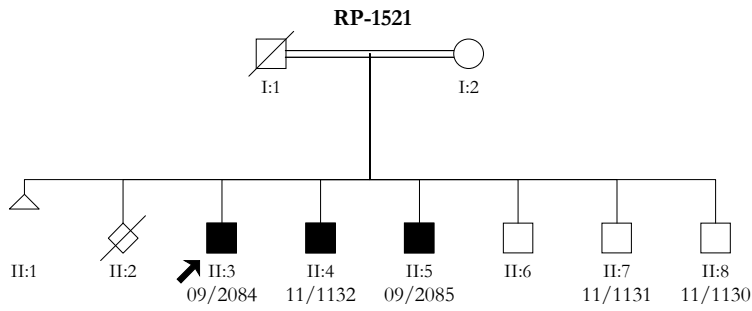
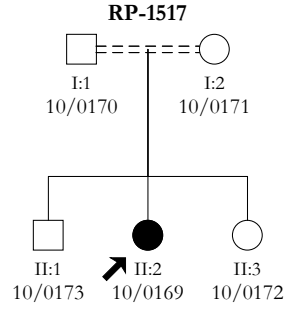
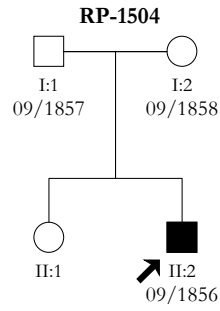
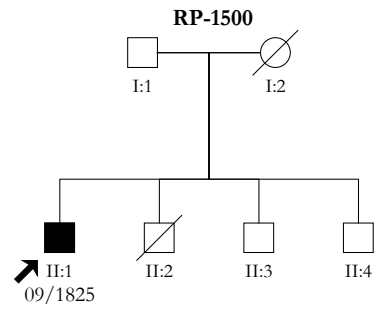
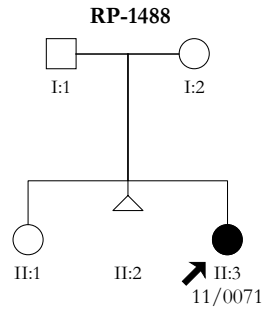
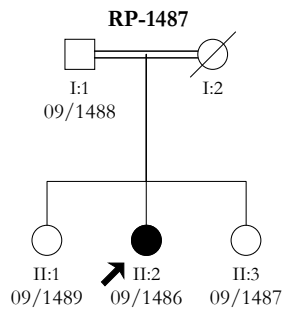


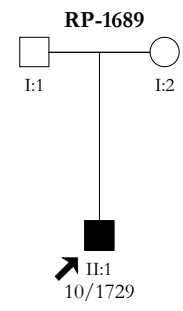
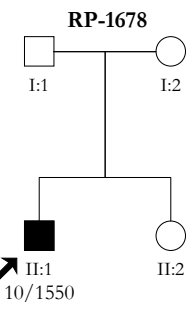
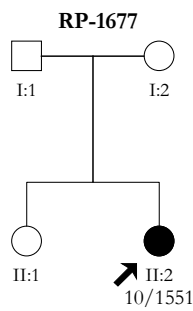
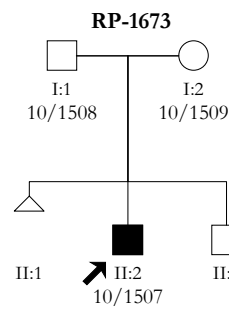
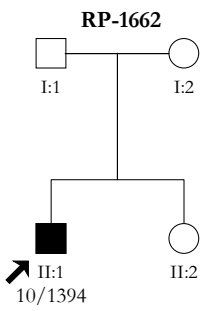
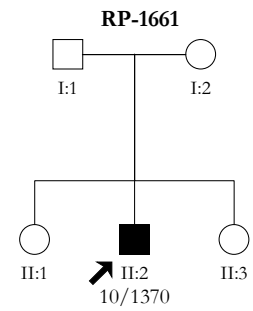
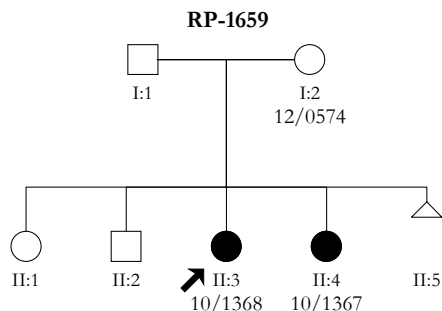
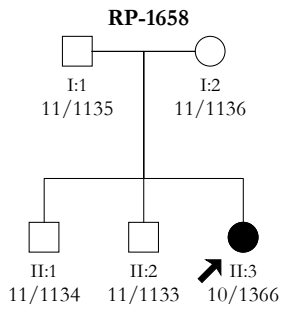
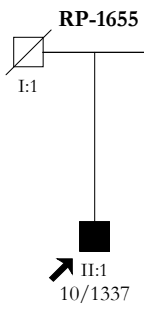
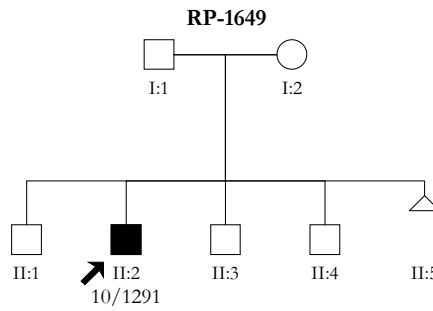
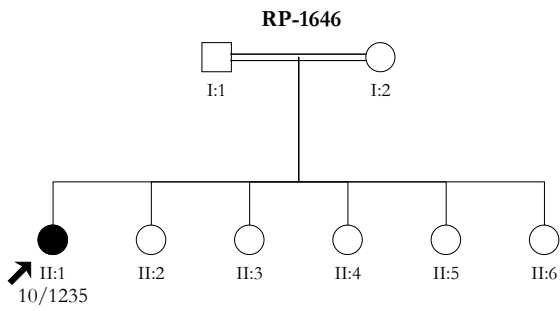
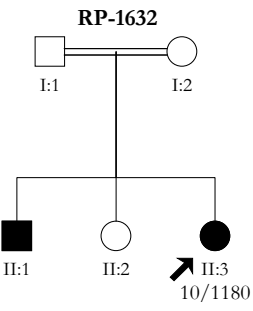
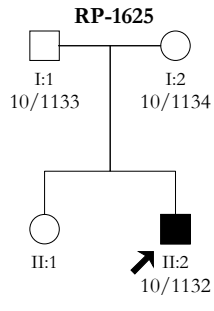
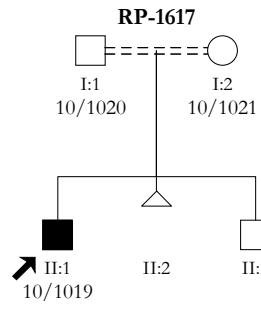
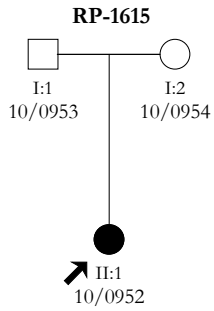
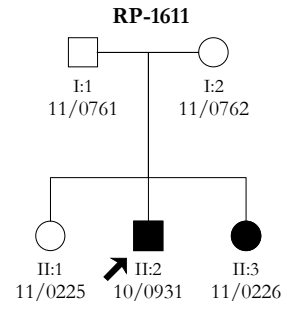
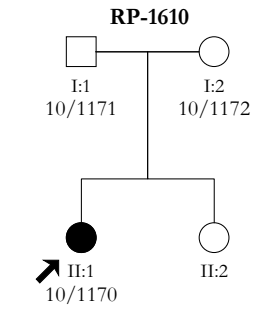
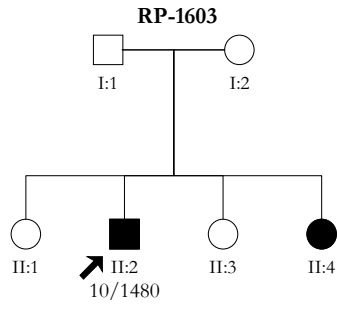
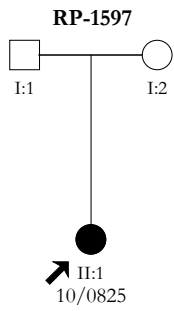


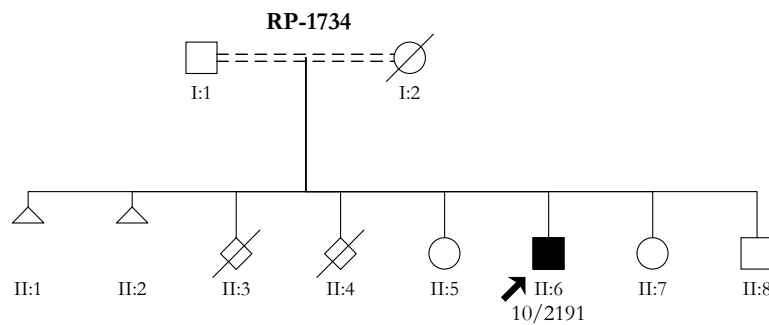
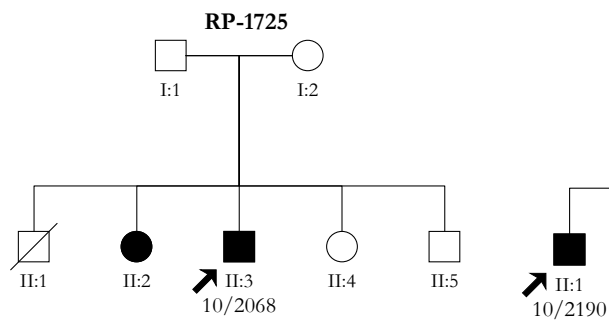
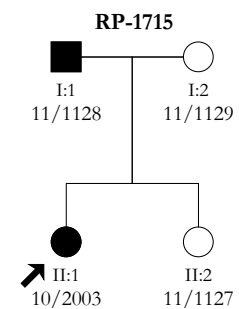
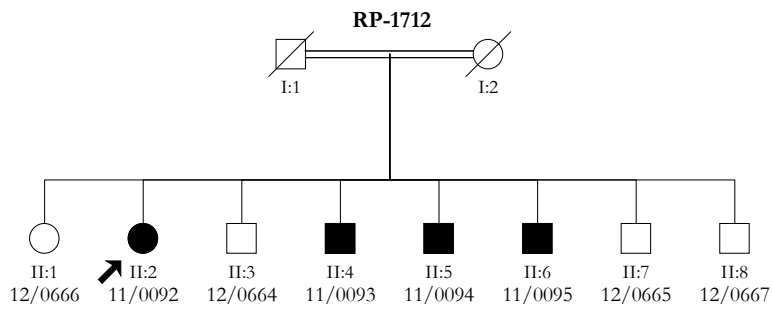
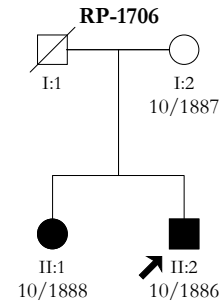
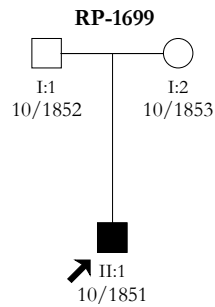
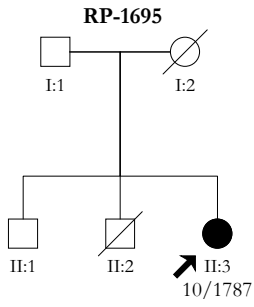
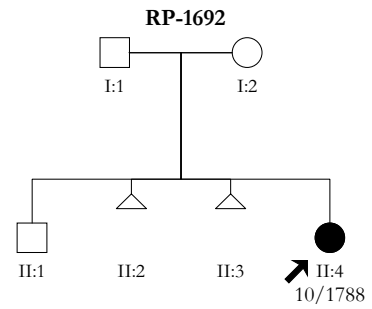
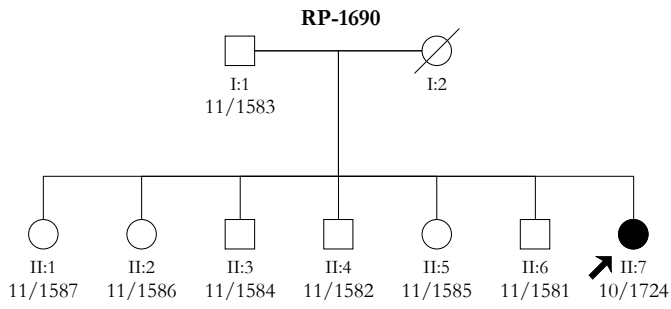


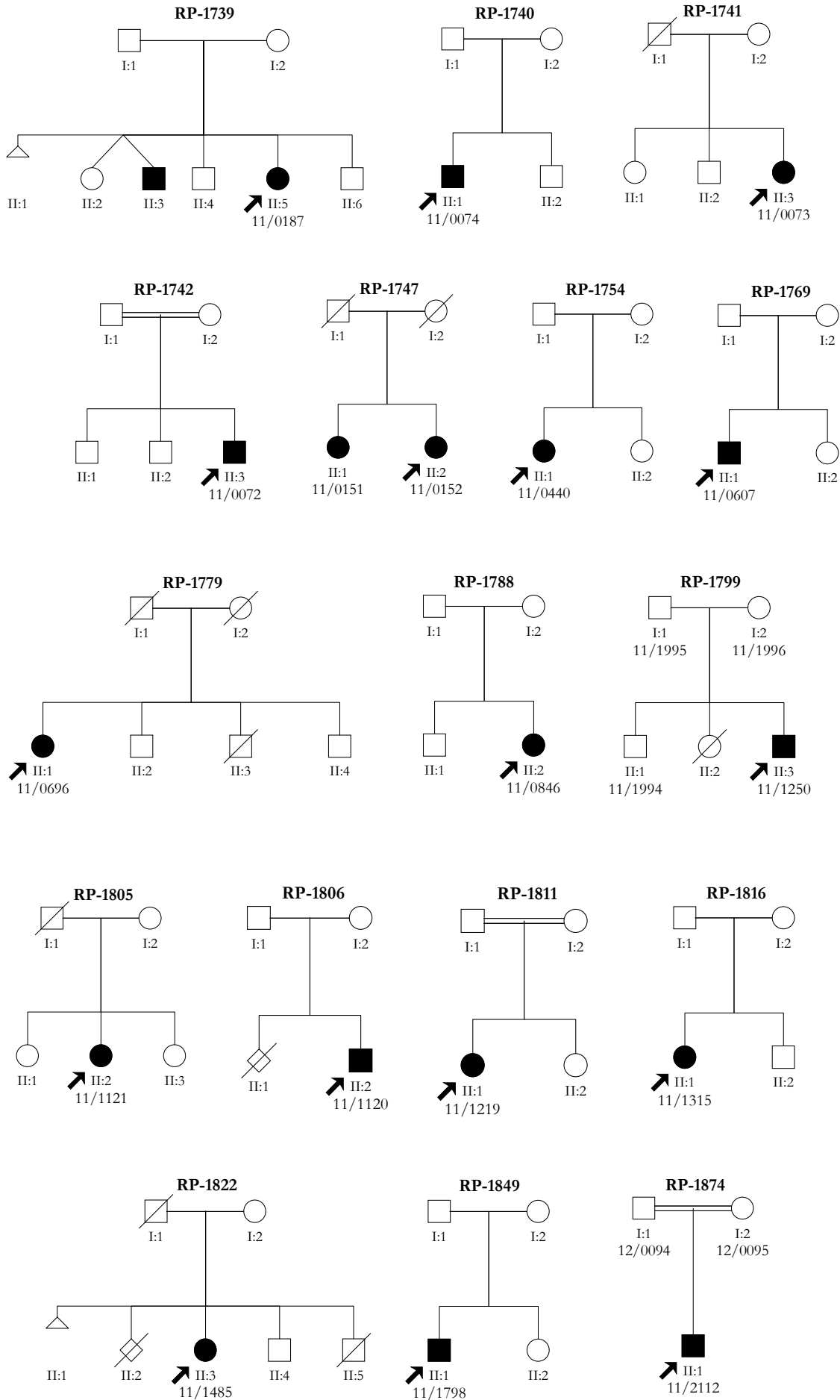


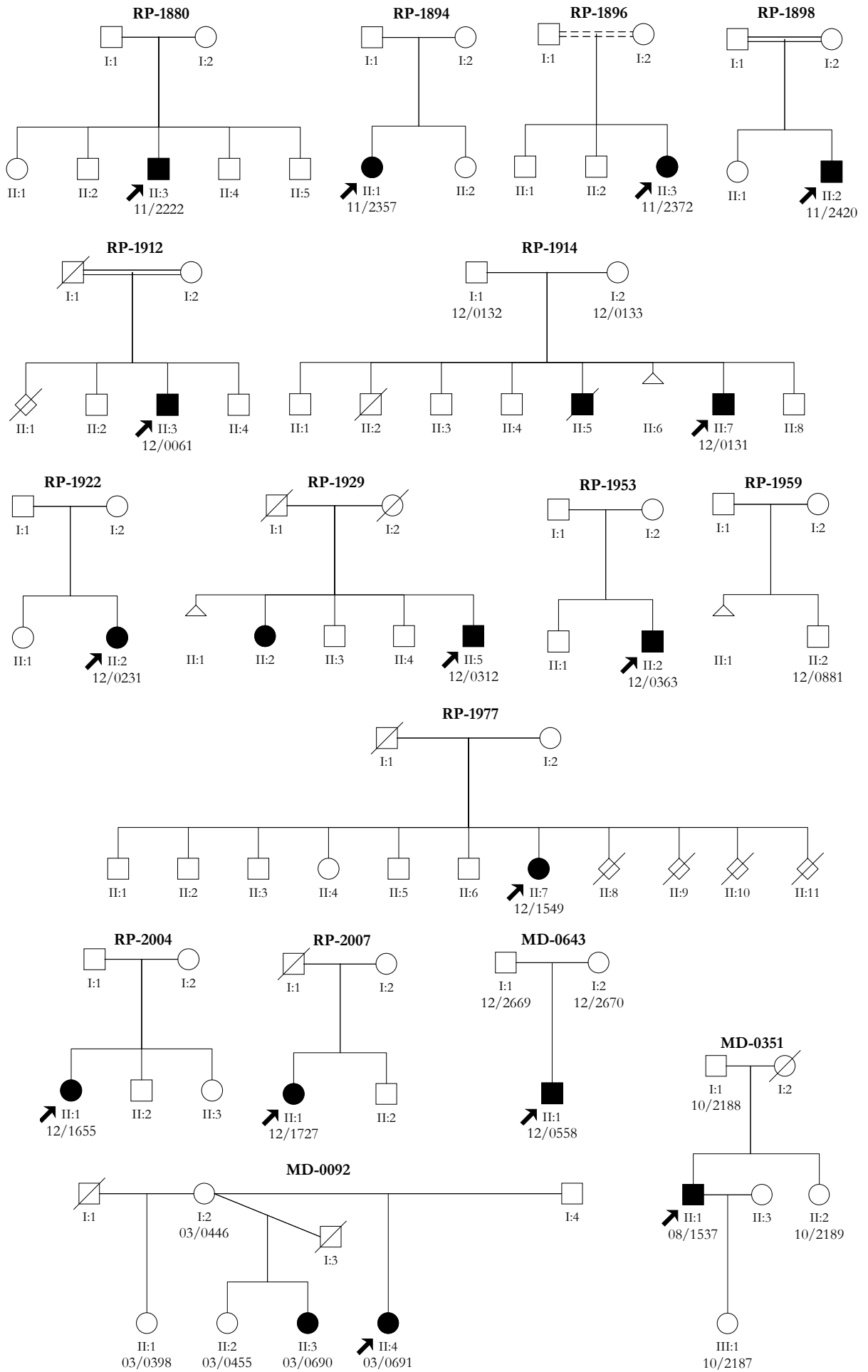












## **ANEXO II: Publicaciones**



## PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO

- Corton, M.\*; **Tatu, S. D.\***; Avila-Fernandez, A.; Vallespín, E.; Tapias, I.; Cantalapiedra, D.; Blanco-Kelly, F.; Riveiro-Alvarez, R.; Bernal, S.; García-Sandoval, B.; Baiget, M.; y Ayuso, C. (2013). High frequency of CRB1 mutations as cause of Early-Onset Retinal Dystrophies in the Spanish population. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8, 20. \* Equal contributors
- Corton, M.; Nishiguchi, K. M.; Avila-Fernandez, A.; Nikopoulos, K.; Riveiro-Alvarez, R.; **Tatu, S. D.**; Ayuso, C.; y Rivolta, C. (2013). Exome sequencing of index patients with retinal dystrophies as a tool for molecular diagnosis. *PLoS One*, 8(6), e65574.
- Corton, M.; Avila-Fernandez, A.; Vallespín, E.; López-Molina, M. I.; Almoquera, B.; Martín-Garrido, E.; **Tatu, S. D.**; Khan, M. I.; Blanco-Kelly, F.; Riveiro-Alvarez, R.; Brión, M.; García-Sandoval, B.; Cremers, F. P. M.; Carracedo, A.; y Ayuso, C. (2014). Involvement of LCA5 in Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa in the Spanish population. *Ophthalmology*, 121(1), 399-407.
- Sánchez-Alcudia, R.; Cortón, M.; Ávila-Fernández, A.; Zurita, O.; **Tatu, S. D.**; Pérez-Carro, R.; Fernandez-San Jose, P.; Lopez-Martinez, M. Á.; del Castillo, F. J.; Millan, J. M.; Blanco-Kelly, F.; García-Sandoval, B.; Lopez-Molina, M. I.; Riveiro-Alvarez, R.; y Ayuso, C. (2014). Contribution of mutation load to the intrafamilial genetic heterogeneity in a large cohort of Spanish retinal dystrophies families. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(11), 7562-7571.

## PUBLICACIONES DERIVADAS DE OTROS TRABAJOS

- Ávila-Fernández, A.; Cortón, M.; López-Molina, M. I.; Martín-Garrido, E.; Cantalapiedra, D.; Fernández-Sánchez, R.; Blanco-Kelly, F.; Riveiro-Álvarez, R.; **Tatu, S. D.**; Trujillo-Tiebas, M. J.; García-Sandoval, B.; Ayuso, C.; y Cremers, F. P. M. (2011). Late onset retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*, 118(12), 2523-2524.
- Riveiro-Alvarez, R.; Lopez-Martinez, M.-A.; Zernant, J.; Aguirre-Lamban, J.; Cantalapiedra, D.; Avila-Fernandez, A.; Gimenez, A.; Lopez-Molina, M.-I.; Garcia-Sandoval, B.; Blanco-Kelly, F.; Corton, M.; **Tatu, S.**; Fernandez-San Jose, P.; Trujillo-Tiebas, M.-J.; Ramos, C.; Allikmets, R.; y Ayuso, C. (2013). Outcome of ABCA4 disease-associated alleles in autosomal recessive retinal dystrophies: retrospective analysis in 420 Spanish families. *Ophthalmology*, 120(11), 2332-2337.