

UNA VISIÓN GLOBAL DE LAS ENFERMEDADES RARAS VISUALES: PRESENTE Y FUTURO



Editora:
Dolores María Peñalver García



UNA VISIÓN GLOBAL DE LAS ENFERMEDADES RARAS VISUALES: PRESENTE Y FUTURO

EDITORA: Dolores María Peñalver García.



ISBN: 978-84-125286-6-4

D.L. MU-763-2022

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

Adaptar — remezclar, transformar y construir a partir del material

La licenciente no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada, brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciente.

NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales.

CompartirIgual — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, debe distribuir su contribución bajo la lamisma licencia del original.

Los textos aquí presentados se reproducen tal como fueron enviados por sus respectivos autores.

Impreso en España / Printed in Spain



Índice

CAPÍTULO I.

TERAPIAS AVANZADAS Y ENSAYOS CLÍNICOS EN ESPAÑA	
ENSAYOS CLÍNICOS EN RETINOPATÍAS HEREDITARIAS _____	13
INTRODUCCIÓN A LOS DISTINTOS TIPOS DE TERAPIA GÉNICA PARA LAS DISTROFIAS HEREDITARIAS DE LA RETINA _____	17
TERAPIA CELULAR EN NEUROPATÍAS ÓPTICAS ISQUÉMICAS. LA EXPERIENCIA DE VALLADOLID _____	26
ENSAYOS CLINICOS PARA DISTROFIAS DE RETINA EN LA FUNDACION JIMENEZ DIAZ _____	30

CAPÍTULO II.

INVESTIGACIÓN EN DISTROFIAS DE RETINA	
EL CONSUMO DE DIETAS RICAS EN GRASA ALTERA LA MICROBIOTA INTESTINAL Y ACELERA LA DEGENERACIÓN DE LA RETINA ASOCIADA A LA RETINOSIS PIGMENTARIA _____	39
LA ADMINISTRACIÓN INTRAVÍTREA DE ADALIMUMAB REDUCE LA DEGENERACIÓN RETINIANA EN RATONES <i>rd10</i> _____	50
LA SUPLEMENTACIÓN CON NUTRACÉUTICOS ORALES MEJORA LA FUNCIÓN VISUAL, LA DEGENERACIÓN DE LA RETINA Y EL ESTADO REDOX EN RATONES <i>rd10</i> . _____	71
EL MODELO DE RATÓN CON MUTACIÓN EN PRPH2 GENERADO POR CRISPR REPRODUCE LA DISTROFIA COROIDEA AREOLAR CENTRAL _____	88
EL SUEÑO COMO FACTOR DE RIESGO EN EL AVANCE DE LA MIOPIA _____	96

CAPÍTULO III.

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS	
NUEVOS ENFOQUES PARA EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE LAS DISTROFIAS HEREDITARIAS DE LA RETINA _____	109

CAPÍTULO IV.

LA VIDA DEL PACIENTE CON PATOLOGÍA VISUAL	
VIDEOJUEGOS Y AUDIODESCRIPCIÓN: METODOLOGÍA DE UN CUESTIONARIO _____	139
EL VALOR DEL TRABAJO SOCIAL EN LAS DISTROFIAS DE RETINA _____	148
POSICIONANDO LA ESPECIFICIDAD DE LAS DISTROFIAS HEREDITARIAS DE RETINA EN LOS MEDIOS DE COMUNICACIÓN _____	154
REPERCUSIONES PSICOSOCIALES EN LA PAREJA DE AFECTADOS CON ENFERMEDAD RARA _____	158
PROYECTO “PÍDEME PLACER” _____	166

CAPÍTULO I.

TERAPIAS AVANZADAS Y
ENSAYOS CLÍNICOS EN
ESPAÑA

ENSAYOS CLÍNICOS EN RETINOPATÍAS HEREDITARIAS

Ester Carreño Salas

Departamento de Oftalmología. Hospital Universitario

Fundación Jiménez Díaz

INTRODUCCIÓN:

Según la definición del Instituto Nacional de Salud (NIH, National Institute of Health) de EEUU, un ensayo clínico es un ensayo de investigación que involucra seres humanos, que son prospectivamente asignados a distintas ramas de tratamiento o placebo, para evaluar el efecto de un medicamento o de una intervención biomédica.

FASES DE LOS ENSAYOS CLÍNICOS:

El ensayo clínico de la definición anterior se refiere a los ensayos clínicos de fase III, pero para llegar a esto hay que pasar por distintas fases previas. Así, tras las experimentaciones preclínicas y en animales de experimentación pertinentes, el primer tipo de ensayo es el de fase I, que está especialmente diseñado para evaluar la seguridad, puesto que es la primera vez que se usa ese medicamento en seres humanos. La siguiente fase, la fase II, tiene como objetivo averiguar la dosis efectiva del medicamento, aunque esta fase sigue sin estar focalizada en ver un efecto clínico del medicamento, normalmente en estas fases si se buscan señales de eficacia. A menudo la fase I y II se hacen simultáneamente. Los estudios de fase III, los ensayos clínicos propiamente dichos, tienen como finalidad evaluar la eficacia de un medicamento. Finalmente, los estudios de fase IV son los estudios previos a la comercialización, a menudo llamados *open label* (abierto), donde todos los pacientes incluidos reciben la medicación a la dosis que ha resultado más eficaz en la fase III.

ENSAYOS FASE III:

Los ensayos clínicos fase III se basan en el principio de equidad. Es decir, que a priori no hay una diferencia entre las dos ramas de tratamiento, pues el fin de estos estudios es demostrar la eficacia que actualmente no está demostrada. En nuevo tratamiento de estudio debe compararse frente al tratamiento aprobado para esa enfermedad, en el caso de las retinopatías hereditarias, puesto que no existe un tratamiento actualmente para la mayoría de las enfermedades hereditarias de la retina, lo normal es que se comparen con placebo.

La asignación a uno u otro grupo a de ser aleatoria para evitar sesgos de selección por parte del investigador y en la medida de lo posible se intenta que ni el investigador, ni el paciente sepan en qué rama de tratamiento están, para evitar otros tipos de sesgos y hacer el estudio más robusto.

El proceso de puesta en marcha de un ensayo clínico es un proceso complejo y largo, existen múltiples controles externos por parte de las autoridades competentes (como la agencia española del medicamento) para asegurarse la seguridad y protección de los pacientes que participan en el ensayo clínico.

¿QUÉ SIGNIFICA PARTICIPAR EN UN ENSAYO CLÍNICO?

La participación en un ensayo clínico es siempre voluntaria, y en ningún caso la no participación va a comprometer el seguimiento del paciente en las consultas habituales. Antes de participar se entrega al paciente una hoja de información (que ya ha sido aprobada por el comité de ética) que debe explicar qué implica la participación en el estudio, qué pruebas se van a hacer y cuántas visitas serán necesarias.

Los ensayos suelen ser multi-céntricos, es decir que varios centros participan, para asegurarse un número suficiente de pacientes que puedan participar en el estudio. Esto hace que a veces, el número de pacientes por centro que pueden participar es un número limitado.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN:

Los ensayos clínicos tienen unos criterios de inclusión y exclusión muy estrictos, pues intentan seleccionar el grupo específico de pacientes en los que la medicación puede ser más eficaz o es más fácil medir un efecto de ésta.

A menudo para confirmar los criterios de inclusión las compañías se sirven de centros de lectura de imágenes (*“Reading centres”*) para confirmar de una manera objetiva el cumplimiento de los criterios de inclusión. Para que las imágenes sean aprobadas por el centro de lectura es necesario que la máquina que toma las imágenes y la persona que las toma hayan sido certificadas para tomar la imagen con las características concretas que pide el estudio y así asegurarse que todos los pacientes tienen las imágenes tomadas de la misma forma.

Igualmente, otras pruebas como el campo visual e incluso la agudeza visual se toman en condiciones específicas para que puedan ser replicables. El cuarto donde se evalúa la agudeza visual debe estar certificado anualmente para incluso las condiciones de iluminación se mantengan estables.

OTROS SERVICIOS IMPLICADOS:

A parte del servicio de oftalmología, es de destacar, los ensayos clínicos son el resultado de un complejo trabajo en equipo entre distintos servicios y departamentos. En concreto, en los estudios en retinopatías hereditarias, es fundamental el papel del servicio de genética. Así son los responsables de encontrar a los pacientes afectados de la mutación en concreto que puedan participar en el ensayo. Igualmente, es necesario la colaboración del servicio de farmacia para asegurarse que ni los investigadores, ni los pacientes rompen el enmascaramiento. En el caso de nuestro hospital también contamos con una unidad de ensayos clínicos, que es fundamental para la obtención y el procesado de las distintas muestras biológicas que se van a obtener.

CONCLUSION:

En definitiva, los ensayos clínicos suponen un enorme esfuerzo de equipo para asegurarse que el estudio es realizado en las mejores condiciones para garantizar la seguridad del paciente y que todo se desarrolle cumpliendo el protocolo del estudio para que los datos sean comparables y llegar a concluir la eficacia o no de la medicación a estudio.

INTRODUCCIÓN A LOS DISTINTOS TIPOS DE TERAPIA GÉNICA PARA LAS DISTROFIAS HEREDITARIAS DE LA RETINA

José M. Millán, Ana Pilar Gómez Escribano, Cinta Navarro Moreno, Elena Aller, Teresa Jaijo, Belén García Bohórquez, Gema García García

Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia
CIBER de Enfermedades Raras

Las distrofias hereditarias de la retina (DHR) son un grupo de trastornos caracterizados por la muerte, en la mayoría de los casos, progresiva de los fotorreceptores que da lugar a una pérdida de visión y en muchos casos ceguera legal. Se caracterizan por su elevada heterogeneidad clínica y genética (1, 2)

Si bien el final del siglo XX y el principio del XXI fue la época del descubrimiento de genes responsables de DHR, la última década se ha convertido en la época de las terapias.

Entre los distintos tipos de estrategias terapéuticas que se están ensayando, en este capítulo nos centraremos en las terapias génicas. Cabe destacar que el único tratamiento comercializado que existe actualmente para una distrofia de retina se basa en la terapia génica. Este tratamiento se denomina Voretigene neparvovec, comercializado con el nombre de Luxturna, se administra mediante una inyección subretiniana y es útil únicamente en pacientes con amaurosis congénita de Leber o retinosis pigmentaria debida a mutaciones en el gen *RPE65*.

El ojo es un órgano ideal para este tipo de terapia dado su carácter inmunoprivilegiado. Sin embargo, el problema para aplicar la terapia génica en las DHR es que es necesario conocer exactamente cuál es el gen responsable de la enfermedad en cada caso y, como se ha mencionado arriba, las DHR son extraordinariamente heterogéneas desde el punto de vista genético por lo que no siempre se alcanza el diagnóstico genético.

De hecho, se conocen actualmente 271 genes que pueden causar DHR (<https://sph.uth.edu/retnet/>) y que explican únicamente entre el 60-65% de los casos (3-5).

Para introducir un gen en un determinado órgano se utilizan lo que se conoce como vectores. Estos vectores pueden ser de muchos tipos, pero habitualmente se utilizan vectores víricos. Los vectores víricos utilizados en terapia génica deben ser defectivos y recombinantes, defectivos quiere decir que se le han eliminado regiones de su genoma para impedir que infecte otros órganos y recombinantes porque se ha introducido en su genoma el gen que queremos que se exprese en la retina, es decir, el gen que está mutado en el paciente.

Una vez que el virus se ha introducido en la célula (en el caso del Luxturna es el epitelio pigmentario de la retina) la maquinaria de la propia célula se encarga de producir la proteína que está codificada por ese gen (6).

Existen muchos tipos de virus y cada uno de ellos tiene sus ventajas y sus inconvenientes. Así, por ejemplo, los más utilizados son los virus adenoasociados ya que provocan muy poca respuesta inmunológica, tiene una duración prolongada, es relativamente fácil de fabricar a una escala industrial y no provoca enfermedades en los seres humanos a menos que vaya acompañado de otro virus, el problema es que tiene una capacidad de carga baja, es decir, que solo caben genes pequeños (7).

Los lentivirus y los adenovirus tienen una capacidad de carga mayor. Sin embargo, tienen inconvenientes graves que hacen que sea preferible trabajar con adenoasociados. Los lentivirus se integran al azar en el genoma. Si se integra en mitad de un proto-oncogen puede dar lugar a un cáncer o una leucemia. Los adenovirus tienen una alta inmunogenicidad y además la expresión es corta por lo que las inyecciones tendrían que administrarse repetidamente para mantener los niveles de proteína normal en la retina.

Los herpesvirus tienen una gran capacidad de carga, pero son muy citotóxicos. La tabla 1 refleja las características generales de los distintos tipos de vectores víricos.

Tabla 1: Características de los distintos tipos de virus utilizados en terapia génica

	Retrovirus/ Lentivirus	Adenovirus	Virus adenoasociados	Herpesvirus
Tamaño del inserto	8 Kb	8 Kb	4-5 KB	30-50 Kb
Administración preferente	Ex vivo	Ex vivo/In vivo	Ex vivo/In vivo	Ex vivo/In vivo
Integración en el genoma	Sí	No	Sí/No	No
Duración de la expresión	Prolongada	Corta	Prolongada	Prolongada
Inmunogenicidad	Poca	Elevada	Poca	Moderada
Posibles inconvenientes	Mutagénesis por inserción	Inflamación	Pocos	Citotoxicidad

El Luxturna se compone de un virus adenoasociado serotipo 2 (AAV2) y el gen *RPE65* al que se le ha añadido una región promotora, necesaria para que el gen se exprese y una región denominada *enhancer* que potencia esa expresión. Por último, tiene dos regiones repetidas en sus extremos (ITR) que se unen y circularizan la molécula que queda en la célula sin necesidad de integrarse en el genoma de la misma (ver figura 1) (8).

Las ventajas de la terapia con Luxturna son varias, en primer lugar, el gen *RPE65* es pequeño y cabe en un virus adenoasociado, en segundo lugar, el gen en condiciones normales se expresa en el epitelio pigmentario de la retina y las células del epitelio pigmentario son más fáciles de transfectar (introducir el virus con el gen) que los fotorreceptores y, además, tiene un patrón de herencia autosómico recesivo. Más adelante veremos cuál es la ventaja de este patrón de herencia.

Los genes responsables de las DHR son habitualmente muy grandes, entonces ¿no se puede hacer terapia génica con la mayoría de los genes implicados en DHE?

La respuesta es que, aunque todavía están en fase preclínica, hay estrategias para introducir genes grandes en distintos tejidos.

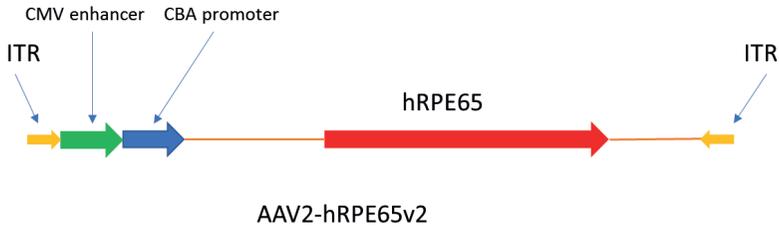


Figura 1: Esquema de la construcción de Luxturna. hRPE65: human RPE65; CMV enhancer: potenciados del citomegalovirus; CBA promoter: promotor del gen de la beta-actina de pollo; ITR: inverted terminal repeat (secuencias terminales repetidas e invertidas)

Una de estas estrategias consiste en “partir” el gen por la mitad, introducir cada una de las dos mitades en un virus adenoasociado, transfectar la célula con los dos virus y mediante un mecanismo de ingeniería genética conseguir que las dos mitades se unan dentro de la célula. Esta estrategia se llama terapia génica dual y es la que se está utilizando en un estudio preclínico para la terapia en pacientes con mutaciones en el gen *MYO7A*, un gen muy grande que es responsable de una forma de síndrome de Usher tipo 1, una enfermedad que asocia retinosis pigmentaria, hipoacusia profunda al nacimiento y problemas de equilibrio (9).

Otra estrategia, si el gen es muy grande y tiene regiones muy repetitivas, es comprobar si acortando esas regiones repetitivas el gen sigue funcionando bien y, si es así, puede caber en un vector más pequeño. Esto se conoce como minigenes o microgenes y estudios recientes en ratón han comprobado que el uso de esta estrategia para el gen *CEP290* retrasa la degeneración de los fotorreceptores (10) (ver figura 2)

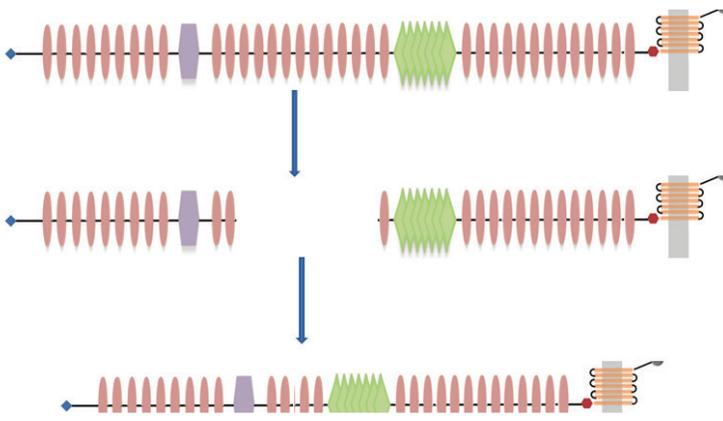


Figura 2: Ejemplo de minigen. Las regiones repetitivas del gen se pueden cortar y si la proteína que se obtiene a partir del minigen sigue funcionando. Tenemos un gen válido para terapia pero más pequeño y que puede caber en un virus adenoasociado.

Otra aproximación distinta es la basada en oligonucleótidos antisentido. Esta estrategia solo sirve para un determinado tipo de mutaciones. Básicamente, es una pequeña cadena de ácido nucleico (ADN o ARN) que es complementaria a una región donde se ha producido una mutación de una determinada naturaleza que hace que la información del gen se procese mal y de lugar a una proteína afuncional. La información se procesa mal porque existe una molécula formada por varias proteínas que se llama spliceosoma, que se coloca donde está la mutación cuando no debería colocarse allí. Estos pequeños oligonucleótidos se colocan encima de la mutación e impiden que el spliceosoma actúe (11) (figura 3).

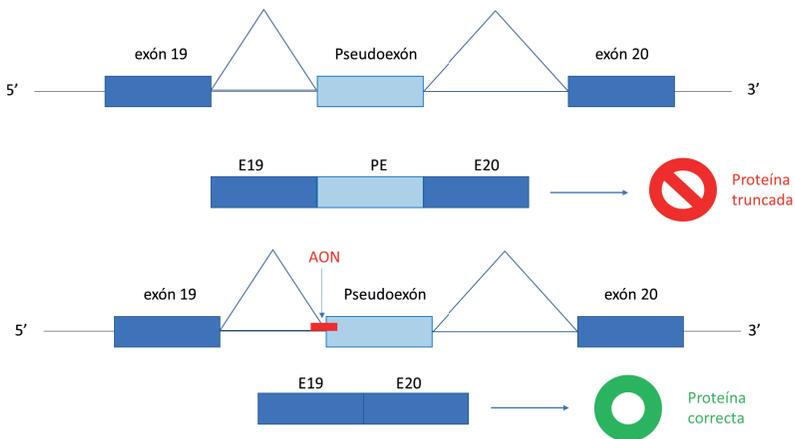


Figura 3: Los genes están divididos en exones e intrones. Los exones son regiones codificantes, es decir, llevan el mensaje que va a dar lugar a la proteína. Los intrones no llevan ningún mensaje y son eliminados por la célula durante el proceso que da lugar a la proteína. La eliminación de los intrones se llama *splicing* y la molécula encargada de llevarlo a cabo spliceosoma. A veces, una mutación en un intrón puede dar lugar a un exón nuevo (pseudoexón), que lleva un mensaje pero que es erróneo y la proteína que se genera no es funcional. Los oligonucleótidos antisentido (AON de sus siglas en inglés) cubren la región donde está la mutación e impiden que se produzca el pseudoexón.

Hemos comentado anteriormente que los genes que producen DHR con herencia autosómica recesiva tienen ventaja frente a los que tienen herencia autosómica dominante. En la herencia recesiva, las dos copias que tenemos de cada gen, una recibida del padre y otra de la madre están mutadas, esto hace que no haya proteína funcional y, por lo tanto, introduciendo un gen sin mutación que exprese la proteína funcional teóricamente sería una solución terapéutica.

Sin embargo, en la herencia autosómica dominante, basta con que una de las dos copias del gen, ya sea del padre o de la madre, esté mutada para que se produzca la enfermedad y, en muchos casos, el problema no es que falte proteína funcional, sino que la mitad de la proteína que produce la célula es tóxica y provoca su muerte, por lo tanto, en estos casos la terapia debe estar basada en eliminar la proteína citotóxica y esto es más difícil que introducir el gen.

De todas maneras, existen estrategias terapéuticas para las DHR autosómicas dominantes basadas en la eliminación de los dos tipos de proteínas que produce la célula de forma natural, tanto la normal como la tóxica para después introducir un gen que exprese solo la normal mediante un vector siguiendo la metodología que se ha explicado anteriormente. Además, existen otras estrategias no basadas en terapia génica que no son el objeto de este capítulo (12).

Una prometedora estrategia terapéutica que sirve tanto para DHR autosómicas dominantes, autosómicas recesivas y ligadas al cromosoma X es la tecnología CRISPR (del inglés Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, que en español significa repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas). Esta tecnología mereció el premio Nobel de Química concedido a las investigadoras Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna.

La tecnología CRISPR está basada en un sistema de inmunidad adquirida de algunas bacterias frente a virus que las pueden infectar y, básicamente, consiste en una proteína que actúa como unas tijeras que cortan la cadena de ADN. Mediante una guía de ADN específica de una región determinada del genoma, estas tijeras se pueden llevar al lugar donde está la mutación. Las

tijeras cortan esta región y utilizando un molde que contiene la secuencia normal (no mutante) la propia maquinaria celular de reparación del ADN “rellena” la región cortada con la secuencia normal. Es decir, se elimina la mutación sustituyéndola por la secuencia normal (ver figura 4)

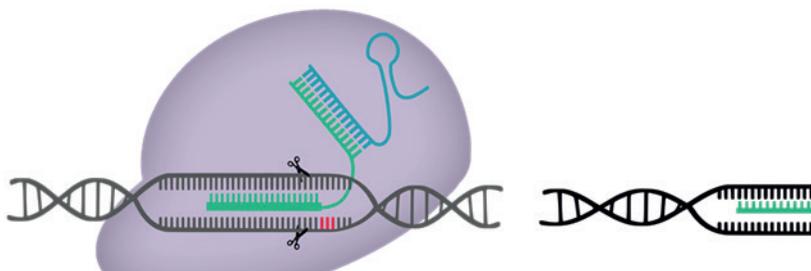


Figura 4: Esquema de la tecnología CRISPR.

Todavía quedan algunos problemas técnicos que resolver para poder utilizar la tecnología CRISPR en ensayos clínicos en humanos. Entre ellos, lo que se conoce como *off-targets*, es decir, la guía que lleva a la proteína al lugar donde está la mutación no es perfecta y puede cortar en regiones de otros genes lo que puede ser perjudicial para la salud de la persona (13).

En los últimos años se han producido enormes avances en el campo de la tecnología CRISPR y es muy probable que en unos años se empiece a utilizar en humanos.

Por último, para aquellas personas a las que no les queda resto de visión se podría utilizar la optogenética. La optogenética consiste en, mediante vectores, introducir en las células de la retina que quedan (las células bipolares o ganglionares, ya que en los últimos estadios de la enfermedad ya no quedan fotorreceptores) genes que codifican para unos canales iónicos que son sensibles a la luz. Esto permitiría distinguir luz de oscuridad y objetos muy grandes. Recientemente, se ha llevado a cabo un ensayo clínico en una persona mediante la optogenética (14).

Enfermedad	Número de ensayos en marcha
Retinosis pigmentaria	22
Amaurosis congénita de Leber	11
Coroideremia	8
Acromatopsia	5
Retinosquisis	2
Síndrome de Usher	1

Tabla 2: Ensayos clínicos en humanos que se están llevando a cabo actualmente para distintas DHR. Se puede consultar en <https://clinicaltrials.gov/>.

En resumen, nos encontramos ante un futuro muy prometedor en cuanto a las terapias para las DHR que era impensable hace solo unos pocos años. Ya se ha autorizado y comercializado el primer tratamiento basado en terapia génica para una de estas DHR, pero se están realizando muchos ensayos clínicos ya en humanos que permiten vislumbrar una esperanza para muchos de los pacientes con DHR. La tabla 2 indica el número de ensayos clínicos basados en terapia génica que actualmente están en marcha en diferentes países del mundo.

REFERENCIAS:

- Sahel JA, Marazova K, Audo I. Clinical characteristics and current therapies for inherited retinal degenerations. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(2):1–25.
- Ayuso C, Millan JM. Retinitis pigmentosa and allied conditions today: a paradigm of translational research. *Genome Med.* 2010;2(5):34.
- Rodríguez-Muñoz A, Aller E, Jaijo T, González-García E, Cabrera-Peset A, Gallego-Pinazo R, Salom D, García-García G, Millán JM. Expanding the clinical and molecular heterogeneity of nonsyndromic inherited retinal dystrophies. *J Molecular Diagnostics.* 2020; pii: S1525-1578(20)30008-8
- García-Bohórquez B, Aller E, Rodríguez-Muñoz A, Jaijo T, García-García G, Millán JM. Updating the Genetic Landscape of Inherited Retinal Dystrophies. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021; 9:645600
- Gordo G, Iancu IF, Perea-Romero I ... Millán JM...Ayuso C. Inherited retinal dystrophies in 6,119 Spanish affected individuals: overview of

disease prevalence, predominant genes and mutations. *Sci Rep.* 2021; 11: 1526.

Nuzbrokh Y, Ragi SD, Tsang SH. Gene therapy for inherited retinal diseases. *Ann Transl Med.* 2021; 9(15):1278

Peters CW, Maguire CA, Hanlon KS. Delivering AAV to the Central Nervous and Sensory Systems. *Trends Pharmacol Sci.* 2021;42(6):461-474

Davuluri S, Yannuzzi NA, Kloosterboer A, Kuriyan AE, Sridhar J. Assessing the Accuracy, Quality, and Readability of Patient Accessible Online Resources Regarding Ocular Gene Therapy and Voretigene Neparvovec. *Clin Ophthalmol.* 2021;15:3849-3857.

Piotter E, McClements ME, MacLaren RE. Therapy Approaches for Stargardt Disease. *Biomolecules.* 2021 Aug 9;11(8):1179.

Zhang W, Li L, Su Q, Gao G, Khanna H. Gene Therapy Using a miniCEP290 Fragment Delays Photoreceptor Degeneration in a Mouse Model of Leber Congenital Amaurosis. *Hum Gene Ther.* 2018; 2018;29(1):42-50.

Xue K, MacLaren RE. Antisense oligonucleotide therapeutics in clinical trials for the treatment of inherited retinal diseases. *Expert Opin Investig Drugs.* 2020; 29(10):1163-1170.

Massengill MT, Lewin AS. Gene Therapy for Rhodopsin-associated Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Int Ophthalmol Clin.* 2021; 61(4):79-96

Hernández-Juárez J, Rodríguez-Urbe G, Borooah S. Toward the Treatment of Inherited Diseases of the Retina Using CRISPR-Based Gene Editing. *Front Med (Lausanne).* 2021; 8:698521

Sahel JA, Boulanger-Scemama E, Pagot C, Arleo A, Galluppi F, Martel JN, Esposti SD, Delaux A, de Saint Aubert JB, de Montleau C, Gutman E, Audo I, Duebel J, Picaud S, Dalkara D, Blouin L, Tiel M, Roska B. Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy. *Nat Med.* 2021 Jul;27(7):1223-1229.

TERAPIA CELULAR EN NEUROPATÍAS ÓPTICAS ISQUÉMICAS. LA EXPERIENCIA DE VALLADOLID

José-Carlos Pastor Jimeno

Profesor Emérito de la Universidad de Valladolid

Miembro del IOBA. Universidad de Valladolid

Miembro de ERN-EYE (Red Europea de Referencia de
Oftalmología)

Miembro del Centro en Red de Medicina Regenerativa y
Terapia Celular de Castilla y León

INTRODUCCIÓN:

La terapia celular supone una clara esperanza de tratamiento de algunas enfermedades que aún no lo tienen. Sobre todo, si se aprovechan las propiedades neuroprotectoras de las células madre mesenquimales. Una de esas patologías, es la neuropatía óptica isquémica anterior aguda no arterítica, que de forma sintética es un “infarto” de la cabeza del nervio óptico, y que causa ceguera en personas de más de 60 años. El cuadro clínico es muy característico, se han encontrado factores de riesgo asociados, pero hasta ahora los intentos de proponer un tratamiento han fracasado. Además, según los datos de la literatura hasta en un 25% de los pacientes se produce una afectación del ojo contralateral en el periodo de seguimiento de 5 años.

OBJETIVO:

Tras haber realizado las correspondientes pruebas preclínicas, y tras la aprobación de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, se ha realizado un ensayo clínico, prospectivo, fase II con cinco pacientes para comprobar la tolerancia de la inyección intravítrea de células madre mesenquimales derivadas de medula ósea (MSV®). El ensayo

clínico está registrado con el numero Eudra clinical trial 2016-003029-40 y en la base ClinicalTrials.gov número NCT03173638. Nuestra hipótesis de trabajo ha sido que sabiendo que el nervio óptico es parte del Sistema Nervioso Central, debe funcionar como este. En los infartos isquémicos cerebrales, además del foco primario de la lesión, existe un área alrededor de neuronas dañadas, denominado área de penumbra, a las que se podría “rescatar” utilizando una terapia neuroprotectora. Eso contribuiría a minimizar el daño de la lesión y preservar, en este caso, función visual a los pacientes. En los últimos meses, equipos de investigación de neurologos, están intentando una aproximación similar para el ya mencionado ictus isquémico.

METODOLOGÍA:

Se han incluido cinco pacientes, que cumplieran los criterios de inclusión (fundamentalmente disminución brusca de agudeza visual por debajo de 0,4, defecto pupilar aferente relativo, disminución de los Potenciales Evocados Visuales y edema de la cabeza del nervio óptico) y en los que se descartó la existencia de formas no artríticas. Los pacientes fueron tratados en un intervalo de tiempo inferior a los 15 días del evento agudo, en lo que hemos denominado “ventana terapéutica”. A los pacientes se les inyectaron $1,5 \times 10^6$ MSV[®] células en un volumen de 0,05 ml, en el vítreo proporcionadas por la empresa Citospin de Valladolid. Los pacientes han sido seguidos durante al menos 6 meses. La inyección se realizó de forma transescleral y con una simple anestesia tópica y de forma ambulatoria.

RESULTADOS:

Se incluyeron, como estaba previsto cinco pacientes, con edades comprendidas entre los 58 y los 82 años. Ningún de ellos presentó reacción inflamatoria aparente ni en cámara anterior ni en el vítreo, a pesar de tratarse de un trasplante alogénico y no recibir inmunosupresión. En uno de los pacientes se desarrolló al mes una membrana epiretiniana, que ha sido necesario resolver

quirúrgicamente. En los demás pacientes se han producido mejorías muy significativas de la agudeza visual y en algunos casos de los potenciales evocados visuales. Uno de los pacientes ha tenido una ligera progresión de una catarata que se considera fruto del mero paso del tiempo.

DISCUSIÓN:

La finalidad de este ensayo ha sido realizar un estudio piloto, que va a ser completado en breve con un estudio multicéntrico para aumentar el tamaño muestral, para comprobar la tolerancia de esta modalidad de tratamiento. Nuestros estudios preclínicos (Usategui-Martín R et al. Human Mesenchymal Stem Cell Secretome Exhibits a Neuroprotective Effect over In Vitro Retinal Photoreceptor Degeneration. *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development* 17/6: 1155-1166, 2020. IF: 4,533) muestran la liberación de algunos factores de crecimiento con capacidades neurotróficas por parte de las células madre por lo que los efectos sobre la agudeza visual que hemos observado en este estudio piloto y que habrá que comprobar posteriormente con un estudio en fase III, pueden deberse a la acción paracrina de las células madre mesenquimales. En estos estudios experimentales, también se comprobó, en animales de experimentación, que no emigran fuera del ojo a otros órganos vitales y que al menos permanecen viables dentro del ojo durante 3-4 semanas. También se ha comprobado la capacidad de tolerancia inmune que presentan estas mesenquimales ya que se inyectaron en conejos células humanas procedentes de médula ósea. Y por último se analizó la capacidad de estas MSV® de preservar la estructura de la retina, en modelos de cultivos organotípicos de neuroretina. ([Labrador-Velandia S et al](#) Mesenchymal stem cells provide paracrine neuroprotective resources that delay degeneration of co-cultured organotypic neuroretinal cultures. *Exp Eye Res.* 2019 May 17. pii: S0014-4835(19)30025-9. doi: 10.1016/j.exer.2019.05.011) La aparición de una membrana epirretiniana en una paciente, debe ponerse de manifiesto en estudios posteriores, y parece una consecuencia lógica de inyectar células con capacidad proliferativa en una paciente, que

en este caso no tenía un desprendimiento posterior de vitreo previo.

CONCLUSIONES:

Los resultados de este estudio piloto son muy esperanzadores y aunque deben ser corroborados con un tamaño muestral mayor (de ahí la necesidad de realizar un estudio multicéntrico, abren una vía de esperanza al tratamiento de esta enfermedad, considerada rara, pero para la que no se ha encontrado tratamiento. De los mecanismos de acción de las células madre mesenquimales, en este caso los beneficios se derivan sin duda de su acción paracrina (es decir su capacidad de producir y liberar al medio factores de crecimiento) y no a un re-emplazo de las células dañadas. Además, se confirma los hallazgos experimentales de la tolerancia inmune. Con todo eso creemos que se abre una vía a la búsqueda de otras enfermedades oculares que podrían beneficiarse de esta terapia celular. (Coco-Martin RM, et al. Cell Replacement Therapy for Retinal and Optic Nerve Diseases: Cell Sources, Clinical Trials and Challenges. *Pharmaceutics*. 2021 Jun 11;13(6):865. doi: 10.3390/pharmaceutics13060865. PMID: 34208272; PMCID: PMC8230855.)

ENSAYOS CLINICOS PARA DISTROFIAS DE RETINA EN LA FUNDACION JIMENEZ DIAZ

Carmen AYUSO

Fundación Jiménez Díaz

INTRODUCCIÓN:

Tras varias décadas de investigación sobre los mecanismos causantes de las DHR, se han ido reuniendo cohortes de pacientes que están permitiendo tanto estudiar la evolución natural de la enfermedad, como las correlaciones genotipo-fenotipo, (estudios observacionales), así como disponer de cohortes de familias y pacientes bien caracterizados clínica y genéticamente, que sean participantes potenciales en los ensayos clínicos (EECC) o terapias disponibles actualmente. En España, esta investigación multidisciplinar y multicéntrica se ha venido desarrollando a lo largo de tres décadas. La adecuada organización, la colaboración entre profesionales de distintos centros y especialidades, la financiación pública (Comisión Europea, ISCIII y ministerios, y Comunidades autónomas) y privada (Fundaluce, ONCE, etc.), así como la imprescindible cooperación con pacientes y asociaciones (FARPE, resto de asociaciones) han construido el mejor escenario posible para la realización de los EECC y la aplicación de terapias.

En esta ponencia se presenta la situación actual de la cohorte de pacientes de DHR española, que es la mas grande de Europa y una de las mayores del mundo, así como la experiencia del Hospital Universitario FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (FJD) en el desarrollo de los EECC en DHR y en la preparación activa para el acceso de los pacientes a las terapias autorizadas.

**COHORTE DE DISTROFIAS HEREDITARIAS DE LA RETINA
(DHR) EN LA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (FJD):**

La cohorte de familias y casos afectados por DHR, construida durante los últimos 30 años por el equipo de la FJD y sus colaboradores, se publicó, con los datos disponibles hasta 2019, en un artículo reciente (Perea-Romero et al; Sci Rep 2021). Además, se hizo un resumen adaptado para el público general y los pacientes, en la revista Visión (Perea-Romero, Ayuso et al; Visión 2021) En el artículo, hasta 2019, se reportaban más de 6000 casos, y en una revisión reciente (hasta agosto de 2021) el número de casos era superior a 7000, con más de 5100 familias registradas de las que se dispone de estudio genético en 4489, con una tasa de caracterización genética superior al 60%. (Figura 1)

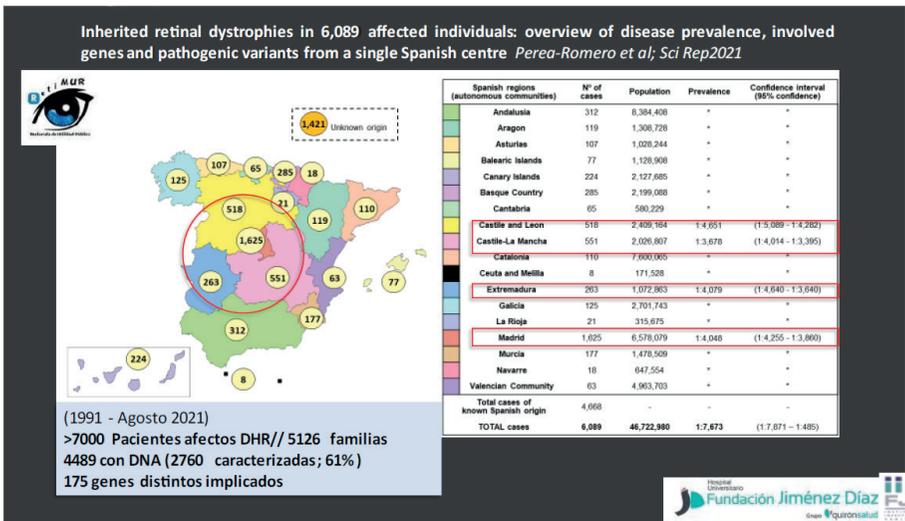


Figura 1.- Distribución de los casos con DHR recogidos en la cohorte de la FJD, por procedencia geográfica

Estos datos permiten indicar que nuestra cohorte probablemente contiene entre el 40 y el 50% de los casos existentes en España, siendo la mayor contribución la de los pacientes procedentes de la zona centro de nuestro país (CCAA: Madrid, Castilla León, Castilla La Mancha, y Extremadura)

Por otra parte, la distribución de familias por subtipos de patologías y el número de genes distintos cuyas variantes fueron causantes de la patología se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1.- Cohorte de la FJD: A) Características de las 4489 familias DHR (con muestra de DNA)y B) los genes causantes

1-A) Clasificación de las familias DHR por subtipo Clínico

Clasificación Clínica	FAMILIAS	%
No RP	1539	34%
RP	2353	52%
DHR Síndrómica	597	13%
TOTAL	4489	

1-B) Genes implicados en la causalidad de DHR

Clasificación Clínica	Nº de genes causales distintos	Consecuencias del estudio	
		Casos Clasificados	% Casos Reclasificados
No RP	69	425 esporádicos, 101 NC	7% modelo hereditario
RP	115	623 esporádicos & NC	11% modelo hereditario
DHR Síndrómica	80		93% herencia recesiva final
TOTAL	175*		

*El nº total de genes es 175 porque algunos de ellos son comunes a varios grupos de clasificación clínica

ESTUDIOS Y ENSAYOS EN DESARROLLO EN LA FJD:

Como es bien conocido, el desarrollo de un medicamento y su aplicación como tratamiento seguro y eficaz en los pacientes es un proceso largo que se inicia con la investigación básico-experimental en el laboratorio que identifica moléculas y aproximaciones candidatas. Se sigue con la demostración de la prueba de concepto, mediante la investigación de la seguridad y eficacia en modelos experimentales celulares o animales, o ambos, (fase preclínica), para, a continuación, pasar a la experimentación en personas, mediante los ensayos clínicos (fase de investigación clínica). Este es un proceso extremadamente regulado, de alto coste científico y económico, que pretende demostrar que la terapia en investigación es segura (no ocasiona

daños significativos en la persona que la recibe) y eficaz (permite mejora o curar el proceso patológico en el que se aplica).

Tras la fase de investigación, tiene lugar un proceso de autorización, por parte de las agencias reguladoras (EMA en Europa, FDA en EEUU y AEMPS en España), y de autorización de precios, comercialización y, en su caso, regulación del reembolso del medicamento, por parte del sistema nacional de salud (ministerio de Sanidad y CCAA). Por tratarse las DHR de enfermedades raras, los medicamentos en desarrollo están regulados dentro de los llamados medicamentos huérfanos. (EMA, <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/orphan-designation-overview>)

Para ilustrar el recorrido temporal de estas investigaciones, se puede mencionar el caso de la terapia dirigida a mutaciones en el gen RPE65. El descubrimiento de este gen tuvo lugar en 1993 por parte del grupo francés de C Hamel, que vino seguido de estudios en modelos celulares y animales, a lo largo de más de una década, y los distintos EECC con pacientes que, tras demostrar eficacia y seguridad, permitieron la aprobación del medicamento para la terapia génica en 2017 (FDA, EEUU) y 2108 (EMA, Europa) respectivamente, y la aprobación para su aplicación a través del SNS en España (2021).

La mayoría de los EECC en DHR vienen acompañados o precedidos de estudios observacionales que tienen como objetivo analizar la historia natural de la enfermedad, así como identificar casos con estudios clínicos y genéticos que pudieran ser participantes en el eventual estudio de intervención (EECC)

El grupo de la FJD ha venido participando en Estudios Observacionales a lo largo de los últimos años, bien como única cohorte, bien en estudios internacionales. En la tabla 2 se enumeran varios de estos estudios publicados en los últimos 5 años.

Tabla 2.- Estudios Observacionales realizados y publicados por el grupo de la FJD

Gen Implicado* en la cohorte	Publicación
CHM	(Sanchez-Alcudia et al; 2016)
USH2A	(Pérez-Carro et al; 2018)
PROM1	(Del Pozo-Valero et al; 2019)
RPE65	(Kumaran et al; 2020) (Rodriguez et al; 2021)
ABCA4	(Del Pozo-Valero et al; 2020)
MYO7A	(Galbis-Martínez et al; 2021)
KCVN2	(Georgiou et al; 2020; Georgiou et al; 2021)

*en negrita aquellos casos en los que también existe o existió un ensayo clínico en la FJD

A partir de estos y otros estudios aun no publicados, se han establecido sub-cohortes bien caracterizadas en las que poder seleccionar participantes para EECC o pacientes a los que poder administrar tratamientos autorizados. Ente los pacientes de estas cohortes, se han seleccionado aquellos que cumplen criterios de inclusión, para que puedan participar en estudios clínicos en desarrollo en otros países, en la propia FJD, o el acceso a tratamientos autorizados (Tabla 3)

Tabla 3.- Cohortes para Ensayos Clínicos y Tratamientos Autorizados: genes y (mutaciones) implicados y tipo de fármaco en estudio

a) Ensayos clínicos en otros centros (colaboración FJD)

PDE6A	(cualquiera)	terapia génica sustitución
CEP290	(p.Cys998X)	QR-110 (Sepofarsen) (OAS)

b) Ensayos clínicos en desarrollo en preparación (en la FJD)

MYO7A	(cualquiera, bialélicas)	terapia génica sustitución
ABCA4 (2) (cualquiera, bialélicas)	Emixustat, Acucela (fármaco oral) (cualquiera, bialélicas)	STG-001, Stargazer (fármaco oral)
RPGR	(cualquiera, hemizigota)	AAV5-hRKp.RPGR terapia génica sustitución
USH2A	(al menos una en exón 13)	QR-421a/USH2a (OAS)

c) Cohorte para tratamiento

RPE65	(cualquiera, bialélicas)	terapia génica sustitución
-------	--------------------------	----------------------------

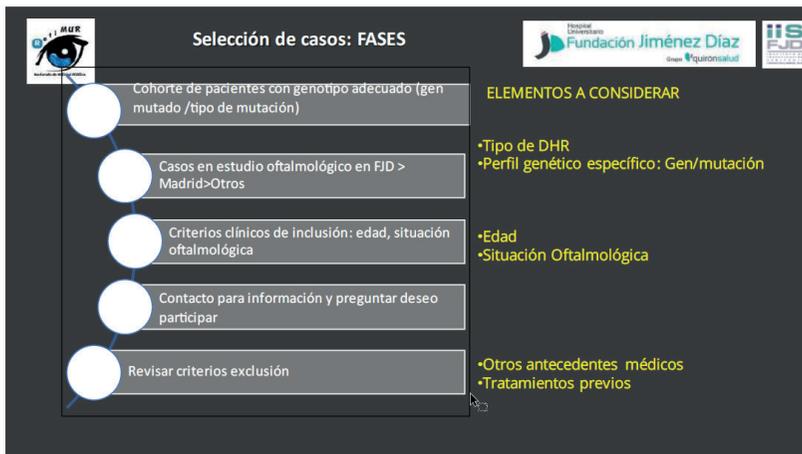
PROCESO DE SELECCIÓN Y RECLUTAMIENTO DE LOS CASOS:

Para poder participar en estos ensayos, nuestro centro , la unidad multidisciplinar de Oftalmogenetica de la FJD, además de contar con la experiencia varias décadas del personal en el manejo de las DHR , la dotación de personal experto, equipamiento y la organización necesarias, cuenta con el apoyo de otras unidades relacionadas con la investigación clínica como son la Unidad de Ensayos Clínicos, el área de gestion del Instituto de Investigacion sanitaria (IIS- FJD), la farmacia hospitalaria, etc

Potra parte, para la adecuada selección y reclutamiento de los casos en los EECC de DHR es necesario tener en cuenta algunas de las características de la enfermedad a tratar, los criterios de inclusión y exclusión que pueden incluir, edades de los pacientes, estadio de la enfermedad, patologías o tratamientos concomitantes o previos, etc.

Una vez establecida la infraestructura y organización idóneas, así como analizado que existe un numero adecuado de potenciales participantes, hemos procedido a realizar las siguientes fases de preparación y selección de los casos, previas a cada EC (figura 2)

Figura 2.- Fases para la selección de los posibles participantes en un EC de DHR y elementos a tener en cuenta



Finalmente, el equipo de la FJD ha recogido y publicado 45 casos pertenecientes a 27 familias distintas con mutaciones bialélicas en el gen RPE65 (Lopez-Rodriguez et al; Exp Eye Res. 2021). Estos casos son los preseleccionados para el tratamiento recientemente aprobado (Luxturna, voretigene neparvovec-rzyl), si bien es preciso revisar caso a caso, si además de presentar la mutación bialélica, se cumplen el resto de criterios de inclusión y están ausentes los criterios de exclusión.

CONCLUSIONES:

Como conclusión, en el momento actual hemos de recordar que si bien existen muchos EECC en marcha, solo hay un tratamiento aprobado para DHR

Los buenos resultados obtenidos con esa terapia, así como con varios de los EECC abren las puertas a nuevas terapias. Dado que los EECC resultan imprescindibles para llegar a tener tratamientos, es importante la participación de los pacientes

Además, aunque no en todos, en muchos de los EECC para DHR es necesario tener el diagnóstico clínico y genético y conocer el estadio de la enfermedad por lo que, además por la necesidad clínica directa, es muy conveniente hacer seguimiento oftalmológico anual

Para conocer la existencia de los EECC y poder optar a participar, es conveniente mantenerse en contacto con Centros Clínicos y de Investigación, tales como los IIS, : IIS-FJD, IIS-La Fe, el CIBER de enfermedades raras, los CSUR, así como con FARPE y las asociaciones. Y consultar los registros de enfermedades raras (Orphanet) y de EECC (registro español de estudios clínicos, clinicaltrial.org)

CAPÍTULO II.

INVESTIGACIÓN EN DISTROFIAS DE RETINA

EL CONSUMO DE DIETAS RICAS EN GRASA ALTERA LA MICROBIOTA INTESTINAL Y ACELERA LA DEGENERACIÓN DE LA RETINA ASOCIADA A LA RETINOSIS PIGMENTARIA

Oksana Kutsyr, Agustina Noailles, Natalia Martínez-Gil, Carla Sánchez-Castillo, Xavier Sánchez-Sáez, Nicolás Cuenca, Pedro Lax

Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología,
Universidad de Alicante

Victoria Maneu

Departamento de Óptica, Farmacología y Anatomía,
Universidad de Alicante

La obesidad y la diabetes han alcanzado proporciones epidémicas en todo el mundo (1). Está ampliamente aceptado que la dieta rica en grasa (HFD) puede inducir disfunción metabólica, que se asocia con un mayor riesgo de obesidad, síndrome metabólico y otras complicaciones para la salud (2). Por tanto, la alimentación rica en grasa es un modelo de resistencia a la insulina y de diabetes mellitus tipo 2 (3). En este contexto, se ha demostrado que la alimentación durante un corto periodo de tiempo con dietas ricas en grasa (3-4 días) en ratones aumenta los niveles de glucosa e insulina en sangre y altera la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina (4). Además, se ha descrito que la dieta rica en grasa a corto plazo induce inflamación del tejido adiposo (4,5), lo que contribuye a la resistencia a la insulina hepática (4). La alta ingesta de grasas también se ha relacionado con la disbiosis de la microbiota intestinal a través de varios mecanismos, como el aumento de la permeabilidad intestinal y la inflamación, que a su vez influyen en el desarrollo de enfermedades como el

cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes y trastornos del sistema nervioso central (6,7). En el sistema nervioso central, una serie de trastornos metabólicos asociados con el consumo de HFD, como la hiperglucemia, la resistencia a la insulina, la dislipidemia y la hipertensión, son factores de riesgo conocidos de disfunción cognitiva (8,9), y se ha demostrado que una ingesta elevada de grasas saturadas exacerba la neurodegeneración en modelos animales de demencia, incluidas las enfermedades de Alzheimer (10) y Parkinson (11).

En la retina, las alteraciones metabólicas inducidas por la ingesta de HFD afectan a la homeostasis celular e influyen en la función y salud de la retina (12,13). Algunos trabajos describen que la prediabetes o diabetes temprana inducida por el consumo de HFD tiene un efecto perjudicial sobre la actividad neuronal retiniana (13) y desencadena la inflamación de la retina y la disfunción microvascular (14,15). Además, el síndrome metabólico es un factor de riesgo comprobado para el desarrollo de la retinopatía diabética (16) y la degeneración macular asociada a la edad (17), y se ha demostrado una correlación positiva entre la ingesta total de grasas y la incidencia de esta enfermedad (18,19). Además, se ha observado que la disbiosis intestinal inducida por la HFD influye en la degeneración de la retina (20).

Todos estos estudios apoyan la hipótesis de que el aumento de la ingesta de grasas podría afectar a las respuestas celulares después de una lesión retiniana o durante enfermedades degenerativas, incluso después de períodos de tiempo cortos. En este contexto, en el presente trabajo buscamos evaluar los efectos de dos o tres semanas de administración de HFD sobre la retina de ratones rd10, modelo animal de retinosis pigmentaria (RP).

Para el presente estudio, ratones C57BL6/J (control) y rd10 (retinosis pigmentaria) de 19 días de edad fueron alimentados con pienso normal (5.5% de kcal de grasa) o con una dieta rica en grasa (61.6% de kcal de grasa) durante dos o tres semanas. Después de los períodos de administración de la dieta, se evaluó la función de la retina mediante electroretinografía (ERG) y el test optomotor. Posteriormente, los animales fueron sacrificados, y la estructura e integridad de la retina fue analizada

mediante inmunohistoquímica. Asimismo, se estudiaron las rutas moleculares por las que la HFD puede afectar la retina analizando el perfil de expresión de genes asociados con la muerte celular y vías inflamatorias utilizando un array de RT-PCR cuantitativo, y cuantificando el nivel de expresión de proteínas asociadas a la inflamación y el estrés oxidativo. Por último, se secuenció el gen 16S rRNA para estudiar el microbioma intestinal de los animales.

A corto plazo, la ingesta de la dieta rica en grasas promovió el aumento de peso y la intolerancia reversible a la glucosa tanto en los ratones C57BL6/J como en los ratones rd10. Las respuestas ERG se vieron disminuidas en los ratones rd10 frente a los controles C57BL6/J. Resulta interesante además que el aumento de la grasa en la dieta afectó significativamente la función retiniana en los ratones rd10. El análisis de las amplitudes de ERG en ratones rd10 reveló una significativa disminución de las ondas a y b en los animales alimentados con HFD frente a los ratones rd10 alimentados con una dieta control. De manera similar, la agudeza visual fue significativamente menor en los ratones rd10 alimentados con HFD que en sus homólogos con dieta control.

Las alteraciones funcionales encontradas en ratones rd10 alimentados con HFD fueron acompañadas por cambios morfológicos en la retina, mientras que la dieta grasa no produjo ningún cambio en la retina de los ratones C57BL/6J. Dado que la RP es una enfermedad progresiva que afecta principalmente a los fotorreceptores, se analizó en primer lugar el número de filas de fotorreceptores, la morfología de los conos y la distribución de rodopsina en los bastones. Tras dos semanas de alimentación con HFD se observó una significativa pérdida del número de filas de fotorreceptores en casi todas las zonas de la retina en los ratones rd10, en comparación con el grupo control. En estos animales, la dieta HFD provocó notables cambios en los fotorreceptores, como la deslocalización de la rodopsina, contenida en el cuerpo celular de los bastones. Además, los conos perdieron su morfología típica, con pérdida de sus segmentos internos y externos. En estos animales, los fotorreceptores además presentaron una reducida conectividad con sus células postsinápticas, como son las células bipolares y las células horizontales.

Por otro lado, el consumo de HFD a corto plazo agravó la inflamación de la retina en los ratones con retinosis pigmentaria. Nuestros resultados mostraron que la retina de los ratones rd10 que consumían una dieta HFD presentó una mayor activación de la microglía, mostrando estas células una morfología fagocítica. Además, aumentó el número de células de microglía en el espacio subretiniano, en comparación con los animales alimentados con pienso normal. Las células de Müller y los astrocitos también mostraron una mayor gliosis reactiva en ratones rd10 alimentados con HFD. Asimismo, se analizaron las posibles vías de actuación de la dieta rica en grasa sobre la degeneración de la retina en los ratones rd10. El análisis de los niveles de expresión de algunos genes y proteínas clave reveló que la dieta HFD a corto plazo modula las vías relacionadas con la inflamación y la muerte celular en los ratones rd10. En estos ratones, también se encontró un aumento significativo de marcadores de estrés oxidativo en comparación con los ratones que consumían la dieta control.

Por último, para explorar el efecto de la alimentación con HFD sobre la microbiota intestinal, se extrajo DNA del tejido intestinal y de las heces de los ratones con las diferentes dietas y se utilizó para la secuenciación del gen 16S rRNA. Los resultados de estos análisis mostraron que la dieta rica en grasa generó una disbiosis significativa en el microbioma intestinal aumentando las bacterias potencialmente proinflamatorias como *Bilophila* sp., *Alistipes* sp. y *Mucispirillum schaedleri*.

Los efectos de la grasa en la dieta sobre la función y estructura de la retina han despertado un interés considerable en los últimos años. En el presente estudio, demostramos que un aumento a corto plazo en la ingesta de grasas en la dieta agrava la degeneración de la retina en un modelo de ratón de RP. Estos hallazgos están en línea con estudios previos que muestran que la ingesta de grasas se asocia positivamente con el riesgo de degeneración macular asociada a la edad (19), y que la disfunción de las células de la retina se ve reforzada por aumentos a corto plazo de la grasa y la sacarosa de la dieta (21). Se han descrito efectos similares en el cerebro, donde se ha demostrado que la dieta HFD exacerba la progresión de la enfermedad de Parkinson

(22), la enfermedad de Alzheimer (23) y otras formas de deterioro cognitivo (24). Nuestros hallazgos confirman que la grasa en la dieta influye en los procesos degenerativos en las enfermedades neurodegenerativas de la retina, pero la contribución relativa y la importancia de los componentes dietéticos individuales siguen sin conocerse. No obstante, el papel de la HFD en la determinación de la susceptibilidad neuronal al daño es relevante para los pacientes con degeneración retiniana, que deben limitar su ingesta diaria de grasas.

De acuerdo con los datos anteriores (6), nuestro estudio revela que la HFD desencadena una marcada disbiosis del microbioma intestinal, que afecta tanto a la diversidad alfa como beta de las bacterias intestinales. En un estudio anterior, encontramos diferencias entre ratones normales rd10 y C57BL6/J alimentados con dietas ricas en grasas, que se han asociado con enfermedades neurodegenerativas (25). Aquí, encontramos que HFD aumentó la abundancia de *Bilophila* sp. (26), *Alistipes* sp. y *Mucispirillum schaedleri* (27), que se ha descrito previamente que se correlacionan positivamente con los procesos de inflamación intestinal en ratones sometidos a HFD (28). Los ratones alimentados con HFD también mostraron una disminución significativa de bacterias comensales como *Muribaculaceae*, que están relacionadas con la homeostasis intestinal (29). Si bien los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la neurodegeneración inducida por HFD siguen siendo poco conocidos, se ha informado anteriormente que HFD induce neuroinflamación aguda y crónica (30), neurodegeneración y deterioro cognitivo (31,32). En consecuencia, una posibilidad es que la alimentación rica en grasas impulse la neuroinflamación de la retina mediante la inducción de gliosis reactiva y el aumento de la densidad microglial (33,34). Por lo tanto, la disbiosis intestinal causada por HFD podría promover procesos inflamatorios de la retina, lo que, a su vez, podría acelerar la degeneración de la retina en ratones rd10, como se describe para otras enfermedades neurodegenerativas (10,11). En apoyo de esta hipótesis, se ha informado que la disbiosis intestinal inducida por HFD desencadena la inflamación intestinal y aumenta los niveles

de citocinas proinflamatorias que influyen en la degeneración de la retina (35).

El análisis molecular indicó que HFD induce la regulación positiva de las vías de señalización GSK3b y NF-k'/IL-6/STAT3 en ratones rd10. GSK3b es una proteína clave en la respuesta inflamatoria (36), y su activación se ha relacionado con la degeneración de la retina y la inflamación que la acompaña en modelos animales de RP (37). STAT3 es un factor de transcripción conocido para GFAP en la glía de Müller directamente relacionado con la gliosis (38). Se ha descrito un papel central para la señalización de STAT en el modelo de ratón rd10 de RP (39). En la misma línea, NF-k' es un regulador clave de la inflamación (40), y se ha propuesto que tiene un papel neurotóxico en ratones rd durante la degeneración de los fotorreceptores al activar la microglía (41). La expresión de NF-k' en la retina aumenta en diferentes modelos de lesión como las inducidas por la luz (42) o la isquemia (43). Por lo tanto, la expresión mejorada de GSK3b en la retina de ratones rd10 alimentados con HFD junto con los niveles aumentados de fosfo-STAT3 y NF- κ B indican que los efectos de la alimentación rica en grasas sobre la degeneración de la retina probablemente se deben a la activación de GSK3b vía de señalización STAT3/NF-k', que conduce a niveles elevados de IL-6 e IL-1 β .

El estrés oxidativo es otro posible contribuyente a los cambios neurodegenerativos inducidos por HFD en ratones rd10. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se pueden generar en grandes cantidades en la retina debido a las altas concentraciones de oxígeno, la abundancia de ácidos grasos poliinsaturados y la exposición directa a la luz (44). Además, las ROS pueden inducir la producción de varias citocinas proinflamatorias (incluida la IL-6), activar NF-kB y desencadenar la activación del inflamasoma (45). En este contexto, un análisis previo ha demostrado que la alimentación con HFD se asocia con un estrés oxidativo neuronal elevado y respuestas antioxidantes atenuadas (46). Encontramos que los ratones rd10 alimentados con un HFD tenían una producción relativamente mayor de superóxido en la capa de fotorreceptores que los ratones equivalentes con comida normal, y esto se acompañó de niveles más altos de nNOS, que está involucrado en la producción de especies reactivas de nitrógeno,

y 4 -HNE, indicador de peroxidación lipídica. Estos hallazgos concuerdan con trabajos anteriores que muestran que la alimentación con HFD en ratones da como resultado niveles más altos de NOS inducible y 4-hidroxinonenal y con degeneración de la retina (47).

En resumen, nuestros hallazgos establecen que el consumo de HFD a corto plazo en ratones con RP induce alteraciones significativas en la función y estructura de la retina a través de mecanismos que pueden involucrar cambios en el microbioma intestinal, el estado inflamatorio de la retina y la homeostasis redox retiniana. En este estudio proponemos que el consumo de HFD y la posterior disbiosis de la microbiota intestinal desencadena la expresión y producción de los moduladores inflamatorios GSK3b, STAT3 y NF- κ en ratones con RP, lo que a su vez potencia la expresión y liberación de las citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-1 β por microglía activada y células de Müller. Paralelamente, la alimentación con HFD promueve la producción y acumulación de ROS y especies de nitrógeno reactivo, y la peroxidación de lípidos, provocando en general un desequilibrio redox e induciendo la cascada inflamatoria. Este escenario de inflamación y estrés oxidativo agrava el proceso degenerativo y el remodelado retiniano. Los resultados pueden extrapolarse a otras enfermedades de la retina asociadas a la inflamación y el estrés oxidativo, como el glaucoma o la degeneración macular. Nuestros hallazgos sugieren que la ingesta de grasas en la dieta afecta la progresión de la enfermedad en pacientes con trastornos degenerativos oculares, y que sería recomendable que estos pacientes aumentaran el conocimiento y la conciencia sobre el consumo adecuado de grasas en la dieta.

Ministerio de Ciencia e Innovación (FEDER- PID2019-106230RB-I00).
Ministerio de Universidades (FPU16/04114).
Instituto Carlos III (RETICS-FEDER RD16/0008/0016). Retina Asturias/
Cantabria. FARPE-FUNDALUCE.
Generalitat Valenciana (IDIFEDER/2017/064, PROMETEO/2021/024).
Es Retina Asturias (2019/00286/001).

REFERENCIAS:

- 1.D. Yach, D. Stuckler, K. D. Brownell, Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes. *Nature Medicine* **12**, 62-66 (2006).
- 2.B. Reynes, M. Palou, A. Palou, Gene expression modulation of lipid and central energetic metabolism related genes by high-fat diet intake in the main homeostatic tissues. *Food Funct* **8**, 629-650 (2017).
- 3.R. S. Surwit, C. M. Kuhn, C. Cochrane, J. A. McCubbin, M. N. Feinglos, Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* **37**, 1163-1167 (1988).
- 4.M. S. Wiedemann, S. Wuest, F. Item, E. J. Schoenle, D. Konrad, Adipose tissue inflammation contributes to short-term high-fat diet-induced hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **305**, E388-395 (2013).
- 5.Y. W. Ji *et al.*, Short Term High Fat Diet Challenge Promotes Alternative Macrophage Polarization in Adipose Tissue via Natural Killer T Cells and Interleukin-4. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 24378-24386 (2012).
- 6.E. A. Murphy, K. T. Velazquez, K. M. Herbert, Influence of high-fat diet on gut microbiota: a driving force for chronic disease risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **18**, 515-520 (2015).
- 7.M. W. Rohr, C. A. Narasimhulu, T. A. Rudeski-Rohr, S. Parthasarathy, Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Adv Nutr* **11**, 77-91 (2020).
- 8.J. M. Duarte, Metabolic Alterations Associated to Brain Dysfunction in Diabetes. *Ageing Dis* **6**, 304-321 (2015).
- 9.V. Frisardi *et al.*, Metabolic-cognitive syndrome: A cross-talk between metabolic syndrome and Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews* **9**, 399-417 (2010).
- 10.S. K. Sah, C. Lee, J. H. Jang, G. H. Park, Effect of high-fat diet on cognitive impairment in triple-transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **493**, 731-736 (2017).
- 11.J. K. Morris, G. L. Bomhoff, J. A. Stanford, P. C. Geiger, Neurodegeneration in an animal model of Parkinson's disease is exacerbated by a high-fat diet. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **299**, R1082-R1090 (2010).
- 12.J. J. Lee *et al.*, High-Fat Diet Induces Toll-Like Receptor 4-Dependent Macrophage/Microglial Cell Activation and Retinal Impairment. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **56**, 3041-3050 (2015).
- 13.R. C. A. Chang *et al.*, High-Fat Diet-Induced Retinal Dysfunction. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **56**, 2367-2380 (2015).

- 14.M. Coucha *et al.*, High fat diet dysregulates microRNA-17-5p and triggers retinal inflammation: Role of endoplasmic-reticulum-stress. *World Journal of Diabetes* **8**, 56-65 (2017).
- 15.I. N. Mohamed *et al.*, Thioredoxin-interacting protein is required for endothelial NLRP3 inflammasome activation and cell death in a rat model of high-fat diet. *Diabetologia* **57**, 413-423 (2014).
- 16.L. Gao *et al.*, High Prevalence of Diabetic Retinopathy in Diabetic Patients Concomitant with Metabolic Syndrome. *Plos One* **11** (2016).
- 17.H. G. Maralani *et al.*, Metabolic Syndrome and Risk of Age-Related Macular Degeneration. *Retina-the Journal of Retinal and Vitreous Diseases* **35**, 459-466 (2015).
- 18.E. Rinninella *et al.*, The Role of Diet, Micronutrients and the Gut Microbiota in Age-Related Macular Degeneration: New Perspectives from the Gut(-)Retina Axis. *Nutrients* **10** (2018).
- 19.E. W. T. Chong *et al.*, Fat Consumption and Its Association With Age-Related Macular Degeneration. *Archives of Ophthalmology* **127**, 674-680 (2009).
- 20.R. C. Ryals *et al.*, A Ketogenic & Low-Protein Diet Slows Retinal Degeneration in rd10 Mice. *Transl Vis Sci Technol* **9**, 18 (2020).
- 21.V. Chrysostomou, P. van Wijngaarden, G. R. Steinberg, J. G. Crowston, A short term high-fat high-sucrose diet in mice impairs optic nerve recovery after injury and this is not reversed by exercise. *Experimental Eye Research* **162**, 104-109 (2017).
- 22.M. Bousquet *et al.*, High-fat diet exacerbates MPTP-induced dopaminergic degeneration in mice. *Neurobiology of Disease* **45**, 529-538 (2012).
- 23.P. Theriault, A. ElAli, S. Rivest, High fat diet exacerbates Alzheimer's disease-related pathology in APPswe/PS1 mice. *Oncotarget* **7**, 67808-67827 (2016).
- 24.Z. A. Cordner, K. L. K. Tamashiro, Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. *Physiology & Behavior* **152**, 363-371 (2015).
- 25.O. Kutsyr *et al.*, Retinitis pigmentosa is associated with shifts in the gut microbiome. *Scientific Reports* **11** (2021).
- 26.J. M. Natividad *et al.*, *Bilophila wadsworthia* aggravates high fat diet induced metabolic dysfunctions in mice. *Nat Commun* **9**, 2802 (2018).
- 27.A. Loy *et al.*, Lifestyle and Horizontal Gene Transfer-Mediated Evolution of *Mucispirillum schaedleri*, a Core Member of the Murine Gut Microbiota. *mSystems* **2** (2017).
- 28.L. Arias *et al.*, Influence of Gut Microbiota on Progression to Tuberculosis Generated by High Fat Diet-Induced Obesity in C3HeB/FeJ Mice. *Front Immunol* **10**, 2464 (2019).
- 29.J. K. Volk *et al.*, The Nlrp6 inflammasome is not required for baseline colonic inner mucus layer formation or function. *Journal of Experimental Medicine* **216**, 2602-2618 (2019).

- 30.P. S. Dalvi *et al.*, High fat induces acute and chronic inflammation in the hypothalamus: effect of high-fat diet, palmitate and TNF-alpha on appetite-regulating NPY neurons. *International Journal of Obesity* **41**, 149-158 (2017).
- 31.C. M. Duffy, J. J. Hofmeister, J. P. Nixon, T. A. Butterick, High fat diet increases cognitive decline and neuroinflammation in a model of orexin loss. *Neurobiol Learn Mem* **157**, 41-47 (2019).
- 32.P. J. Pistell *et al.*, Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *Journal of Neuroimmunology* **219**, 25-32 (2010).
- 33.I. Hammoum *et al.*, Study of retinal alterations in a high fat diet-induced type ii diabetes rodent: Meriones shawi. *Acta Histochemica* **119**, 1-9 (2017).
- 34.D. A. Clarkson-Townsend *et al.*, Impacts of high fat diet on ocular outcomes in rodent models of visual disease. *Exp Eye Res* 10.1016/j.exer.2021.108440, 108440 (2021).
- 35.E. M. Andriessen *et al.*, Gut microbiota influences pathological angiogenesis in obesity-driven choroidal neovascularization. *EMBO Mol Med* **8**, 1366-1379 (2016).
- 36.L. Hoffmeister, M. Diekmann, K. Brand, R. Huber, GSK3: A Kinase Balancing Promotion and Resolution of Inflammation. *Cells* **9** (2020).
- 37.A. Noailles, V. Maneu, L. Campello, P. Lax, N. Cuenca, Systemic inflammation induced by lipopolysaccharide aggravates inherited retinal dystrophy. *Cell Death & Disease* **9** (2018).
- 38.S. L. Roche, A. M. Ruiz-Lopez, J. N. Moloney, A. M. Byrne, T. G. Cotter, Microglial-induced Muller cell gliosis is attenuated by progesterone in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Glia* **66**, 295-310 (2018).
- 39.A. Ly *et al.*, Proteomic Profiling Suggests Central Role Of STAT Signaling during Retinal Degeneration in the rd10 Mouse Model. *Journal of Proteome Research* **15**, 1350-1359 (2016).
- 40.T. Liu, L. Zhang, D. Joo, S. C. Sun, NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* **2** (2017).
- 41.H. Y. Zeng, M. O. Tso, S. Lai, H. Lai, Activation of nuclear factor-kappaB during retinal degeneration in rd mice. *Mol Vis* **14**, 1075-1080 (2008).
- 42.T. Wu, Y. Chen, S. K. Chiang, M. O. Tso, NF-kappaB activation in light-induced retinal degeneration in a mouse model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 2834-2840 (2002).
- 43.Y. G. Chen, C. Zhang, S. K. Chiang, T. Wu, M. O. Tso, Increased nuclear factor-kappa B p65 immunoreactivity following retinal ischemia and reperfusion injury in mice. *J Neurosci Res* **72**, 125-131 (2003).
- 44.M. Tuzcu *et al.*, Lutein and zeaxanthin isomers modulates lipid metabolism and the inflammatory state of retina in obesity-induced high-fat diet rodent model. *Bmc Ophthalmology* **17** (2017).

- 45.Y. Ruan, S. Jiang, A. Musayeva, A. Gericke, Oxidative Stress and Vascular Dysfunction in the Retina: Therapeutic Strategies. *Antioxidants (Basel)* **9** (2020).
- 46.B. L. Tan, M. E. Norhaizan, Effect of High-Fat Diets on Oxidative Stress, Cellular Inflammatory Response and Cognitive Function. *Nutrients* **11** (2019).
- 47.A. C. Marcal *et al.*, Diet-induced obesity impairs AKT signalling in the retina and causes retinal degeneration. *Cell Biochemistry and Function* **31**, 65-74 (2013).

LA ADMINISTRACIÓN INTRAVÍTREA DE ADALIMUMAB REDUCE LA DEGENERACIÓN RETINIANA EN RATONES *rd10*

L. Olivares-González^{1,3}, S. Velasco^{1,3}, J.M. Millán^{2,3,4}, R. Rodrigo^{1,2,3}

¹Patofisiología y Terapias para Enfermedades de la Visión,
Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Eduardo
Primo Yúfera 3, 46012, Valencia, España

²Centro de Investigación Biomédica en Red de
Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, España

³Unidad mixta de enfermedades raras CIPF-La Fe,
Valencia, España

⁴Biomedicina Molecular, Celular y Genómica, Instituto de
Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, España

La Retinosis Pigmentaria (RP) comprende un grupo de distrofias hereditarias de la retina caracterizadas por la pérdida progresiva e irreversible de la visión, debido a la degeneración de conos y bastones [1, 2]. Se trata de una enfermedad rara con una prevalencia de 1:4000, considerada la mayor causa de ceguera genética en el mundo desarrollado [3]. La RP presenta una elevada heterogeneidad tanto clínica como genética. Actualmente se conocen mutaciones en más de 130 genes que causan tanto formas sindrómicas como no sindrómicas de RP [4].

En los últimos años se ha visto que la inflamación puede contribuir de manera significativa en la progresión de la enfermedad. La inflamación conduce a la activación de la microglía que libera citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF α), la interleuquina 6 (IL6) o la IL-1 β , entre otras moléculas de señalización tanto en pacientes como en modelos murinos de RP [5-10]. El mantenimiento prolongado

de altos niveles de estas moléculas puede acelerar el proceso de degeneración. En nuestro caso, hemos observado un aumento de TNF α en humor acuoso de pacientes con RP y retinas de ratones *rd10*, un modelo murino de RP autosómica recesiva [11-13]. En la retina, el TNF α es secretado por macrófagos y células gliales y regula la producción de quimiocinas y citoquinas [14]. Se trata de una citoquina de respuesta proinflamatoria, implicada en varios procesos celulares como la proliferación, la supervivencia, la diferenciación, la inflamación y la muerte celular [15-18] a través de la unión a sus receptores TNFR1 o TNFR2 [19]. Por todo esto el TNF α parece ser una molécula importante en la regulación de los procesos de muerte y supervivencia celular y es considerado una prometedora diana terapéutica para varias enfermedades inflamatorias [20-25].

Los anticuerpos anti-TNF α como el Adalimumab (ADA) o el Infliximab, se utilizan para el tratamiento de algunas enfermedades inflamatorias, como como la artritis reumatoide, la espondilitis anquilosante [26] o la psoriasis [27], y en oftalmología como tratamiento alternativo en pacientes con uveítis [28, 29] debido a su capacidad para para bloquear la unión del TNF α a sus receptores, lo que conduciría a la disminución de los procesos inflamatorios y la muerte celular [15]. En este sentido, hemos observado previamente que varias inyecciones intraperitoneales de ADA, previenen la degeneración retiniana en ratones *rd10* a día postnatal (P) 18, momento que coincide con el pico máximo de muerte de células fotorreceptoras en nuestro modelo [11]. La administración intraperitoneal de ADA reduce la muerte de las células fotorreceptoras, la actividad de la poli-(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), la gliosis reactiva y mejora la respuesta antioxidante, y la función energética y metabólica en los ratones *rd10* a P18. La activación excesiva de la enzima PARP puede inducir la translocación nuclear del factor inductor de la apoptosis (AIF) y conducir a un tipo de muerte celular denominada PARthanatos. Sin embargo, se necesitan otros estudios para comprender mejor los mecanismos moleculares implicados en el efecto neuroprotector de la ADA.

OBJETIVOS:

El objetivo principal de este trabajo es abordar un enfoque farmacológico que actúa sobre el proceso inflamatorio para intentar ralentizar la degeneración retiniana. En concreto, se evalúan los mecanismos de muerte celular inducidos por TNF α y el proceso de neuroinflamación, así como el efecto de una sola dosis intravítrea de ADA sobre la degeneración retiniana en ratones *rd10* en día postnatal (P) 23 (P23).

METODOLOGÍA:

Animales y tratamiento

Utilizamos el ratón *rd10* como modelo de RP autosómica recesiva y como control, la cepa C57Bl6, cuyo fondo genético coincide con el del ratón *rd10*. Para calcular la dosis equivalente de ADA entre humanos utilizamos una fórmula de conversión (DEH) y ratones (DEH = NOAEL*Km ratio (factor de conversión para ratón); NOAEL: *Non-Observed Adverse Effect Level*, o dosis en la que no se observan efectos adversos en los animales) siendo en este caso: 4,61 mg/ml = 0,375 mg/ml*12,3 [30]. Se pincharon diferentes concentraciones de ADA de manera intravítrea (concentraciones finales en el humor vítreo: 0,125; 0,25; 0,375; 4,61 mg/ml) a P12 para seleccionar la mejor dosis efectiva de ADA que previniese la pérdida de células fotorreceptoras. Las inyecciones se realizaron en el ojo izquierdo de los ratones, utilizando el ojo contralateral como control inyectando el mismo volumen de tampón fosfato salino (PBS). También se utilizaron como controles ojos de animales no inyectados. A los P23 se obtuvieron las muestras y se procesaron según la técnica a realizar posteriormente.

Western Blot

Las retinas se homogenizaron en tampón de lisis. La cantidad de proteína en las muestras se determinó mediante el método BCA. Se añadió β -mercaptoetanol (5%) y azul de bromofenol (1% m/v)

a las muestras, y se hirvieron durante 5 minutos. La electroforesis se realizó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 8% a 100 mV y 40 mA durante dos horas, seguido de una transferencia a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Las membranas se bloquearon con leche al 3% en tampón TBS-T y se incubaron con los anticuerpos primarios para NLRP3, o β -actina durante toda la noche. Las membranas se incubaron en 1.5% leche-TBS-T con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina una hora a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se revelaron por ECL. Los inmunoblots fueron cuantificados por densitometría y normalizados con la β -actina utilizando el software Alphamager 2200.

Extracción de ARN total y síntesis de cADN

El ácido ribonucleico (ARN) total de las retinas se extrajo utilizando el kit comercial RNeasyMiniKit y siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir del ARN total y utilizando el kit comercial GeneAmp Gold ARN PCR Reagent, obtuvimos cADN mediante RT-PCR, partiendo de una cantidad inicial de 1 μ g de ARN.

PCR cuantitativa en tiempo real

La expresión relativa de los genes RIPK1 y RIPK3 se midió en retinas de ratón mediante PCR cuantitativa en tiempo real, utilizando la plataforma ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, EEUU), y las sondas TaqMan específicas para esos genes. El gen de la b2-microglobulina (b2m) se utilizó como control endógeno en las muestras. La expresión relativa de cada gen se normalizó con el gen endógeno y los valores de las retinas control se normalizaron a uno para determinar cambios en la expresión génica de las retinas de los ratones *rd10*.

Ensayo actividad caspasa

La actividad de las caspasas 1 y 3 se determinó utilizando un kit comercial y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las retinas se lisaron en el tampón de lisis suministrado con los kits. Los lisados se incubaron con los sustratos de la caspasa 1 y 3,

durante dos horas a 37°C. Seguidamente se midió la absorbancia de las muestras a 405 nm.

Histología de la retina

Para obtener secciones de retina, los ojos se enuclearon y se sumergieron inmediatamente en paraformaldehído al 4%, durante dos horas. A continuación, los ojos se crioprotegieron mediante un gradiente ascendente de sacarosa, se embebieron y congelaron en medio de congelación y se obtuvieron secciones 10 µm utilizando un criostato.

Para medir el grosor y el número de núcleos de la capa nuclear externa (CNE u ONL en inglés), las criosecciones se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI), un colorante que marca los núcleos celulares. En las criosecciones de retina también se realizaron diferentes inmunofluorescencias, para lo que se incubaron con anticuerpos primarios anti-Iba1 como marcador de microglía, anti-GFAP como marcador de glía de Müller, o anti-PAR como marcador indirecto de la actividad de la poli-ADP ribosa polimerasa (PARP), durante toda la noche a 4°C. A continuación, las criosecciones se incubaron con el anticuerpo secundario, conjugado con un fluoróforo. Las criosecciones se contratiñeron con DAPI.

Para analizar la estructura de la retina, los ojos fijados se embebieron en parafina y se obtuvieron secciones de 5 µm. Se realizó una tinción de hematoxilina-eosina.

Microscopía y cuantificación

Las secciones de retina se examinaron utilizando un microscopio confocal y se analizaron utilizando los software de imagen Leica Microsystems LAS AF lite e Image J. El grosor y el número de filas de la CNE (u ONL), el número de células PAR e Iba-1 positivas y la intensidad de fluorescencia de GFAP, se cuantificaron utilizando el software ImageJ.

La medida del grosor de la CNE se normalizó con el grosor de la capa nuclear interna (CNI o INL), para evitar el sesgo derivado del ángulo de corte.

Para evaluar la activación de la microglía, se determinó el índice de migración (IM), definido como el número de células Iba-1 positivas corregido de acuerdo a la capa de la retina en la que se encuentren ($IM = [\sum (n^\circ \text{ células Iba1+} * \text{factor capa})] / n^\circ \text{ células Iba1+ totales}$). El factor de corrección utilizado fue 1 para la ONL; 0,5 para la OPL y 0,25 para la INL.

La intensidad de fluorescencia corregida (FC) de GFAP se determinó restando la intensidad de fluorescencia del fondo a la intensidad de fluorescencia presente en el área total de la retina ($FC = (\text{área} * \text{intensidad fluorescencia}) \text{ GFAP} - (\text{área} * \text{intensidad fluorescencia}) \text{ fondo}$). El número de células PAR positivas, el IM de la microglía y la intensidad de fluorescencia de GFAP se cuantificaron en cuatro zonas no adyacentes de cada sección de retina.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad 8.0 (Prism; GraphPad Software, Inc., San Diego, EEUU). La normalidad de los datos se analizó utilizando las pruebas de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. Las comparaciones entre los ratones control y los *rd10* se realizaron con la prueba de la t de Student para muestras independientes o la prueba U de Mann-Whitney, dependiendo de la distribución de los datos (paramétrico o no paramétrico). Las comparaciones entre los ojos tratados con ADA y los tratados con PBS se hicieron con la prueba de la t de Student para muestras emparejadas o con la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Un valor p menor de 0,05 fue considerado estadísticamente significativo. Los datos se representan utilizando el software GraphPad 8.0.

RESULTADOS:

Activación de PARP, de componentes del inflammasoma NLRP3, y la gliosis reactiva en la retina de ratones *rd10* a P23.

Antes de realizar el tratamiento con ADA se analizaron algunos marcadores celulares para profundizar en el mecanismo de

muerte por el que se están perdiendo las células fotorreceptoras en los ratones *rd10* a P23.

En las retinas de los ratones *rd10* se observó un aumento en la acumulación de polímeros de poli-ADP ribosa (PAR) producidos por la enzima PARP a P23, comparado con las retinas de los ratones control (Figura 1A), además de un aumento de la actividad de las caspasas 3 y 1 (Figura 1B). También se observó una disminución de la expresión génica de RIPK1 y un aumento significativo de la expresión génica de RIPK3 (Figura 1C). El aumento de la expresión génica de RIPK3 y de la actividad de la caspasa 1, podría estar indicándonos una activación del inflammasoma NLRP3, por lo que se analizó el contenido de esta proteína en las retinas de los ratones *rd10*. Se comprobó que esta proteína también se encuentra aumentada a P23 con respecto a los controles (Figura 1D).

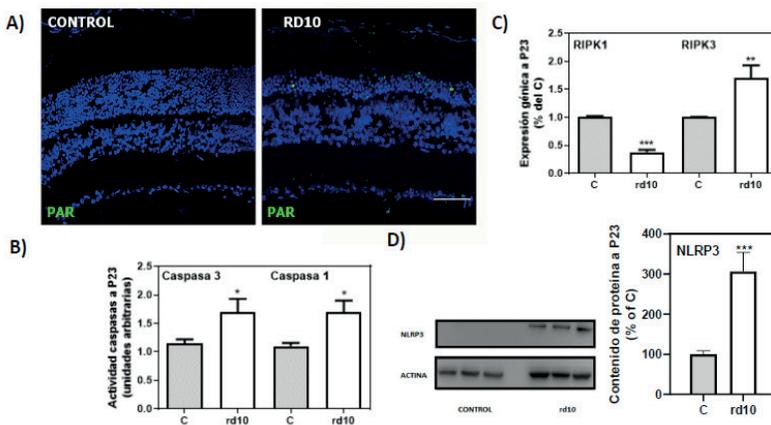


Figura 1. Marcadores de muerte celular e inflamación en retinas de ratón *rd10* a día P23. Imágenes representativas que muestran el marcaje de PAR en secciones de retinas control (C) y *rd10* contrateñidas con DAPI (A) Actividad de las caspasas 3 y 1 utilizando sustratos específicos en retinas control y *rd10* (B) Expresión génica de RIPK1 y RIPK3 (C) Western blot representativo y cuantificación de NLRP3 (D). Los datos se representan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Prueba de la t de Student para muestras independientes, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. [31].

*Una dosis única de ADA intravítreo redujo la degeneración de la retina en ratones *rd10* a P23.*

Varios estudios muestran que en las retinas de ratones *rd10* se produce un aumento de TNF α previo al pico máximo de muerte de las células de las células fotorreceptoras [9, 32]. En nuestro grupo se comprobó que la administración intraperitoneal de ADA era capaz de disminuir la degeneración retiniana en los ratones *rd10*, ya que se observó una disminución de la formación de polímeros de PAR y de la neuroinflamación a P18 [11]. Sin embargo, el efecto neuroprotector del ADA desaparecía a partir de esa edad, por lo que se decidió administrar el fármaco de manera intravítrea para evaluar si se conseguía mantener su efecto durante más tiempo. En primer lugar, se realizó una curva de concentración de ADA para determinar qué concentración era capaz de evitar la muerte de las células fotorreceptoras. Para ello se cuantificaron el número de filas de fotorreceptores y el grosor de la CNE (u ONL) en las retinas de los ratones *rd10* a P23. Las dos concentraciones más altas de ADA ensayadas fueron capaces de evitar tanto la pérdida de filas de fotorreceptores como el grosor de la ONL en los ratones *rd10* (Figura 2B y Figura 2C). Además, la citoarquitectura de la retina no se veía afectada por el tratamiento con ADA (Figura 2A). Por ello, se eligieron las concentraciones de 0,375 y 4,61 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADA para los siguientes estudios.

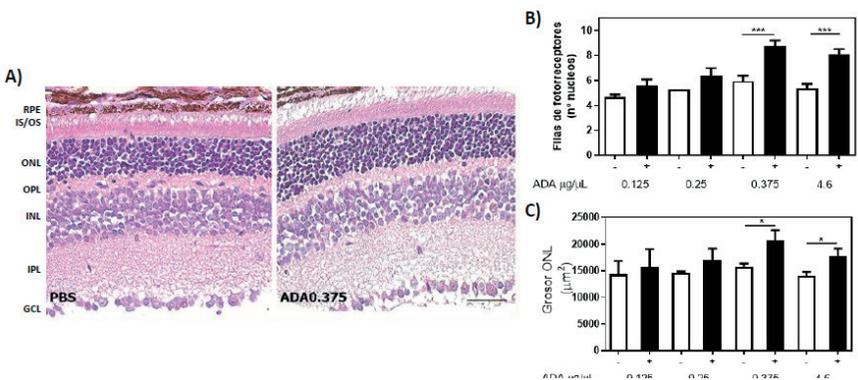


Figura 2. Efecto de la administración de una única dosis de Adalimumab en la degeneración retiniana de ratones *rd10* a día P23. Tinción representativa de hematoxilina/eosina de retinas de ratones *rd10* tratadas con PBS (vehículo) o con 0.375 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADA (A) Efecto de diferentes concentraciones de ADA sobre el número de filas de núcleos en la ONL (B) y grosor normalizado de la ONL (C). 0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADA (ADA0.125), 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADA (ADA0.25), 0,375 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADA (ADA0.375), y 4,61 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADA (ADA4.61). RPE: epitelio

pigmentario, ONL: capa nuclear externa; OPL: capa plexiforme externa; INL: capa nuclear interna; IPL: capa plexiforme interna; GCL: capa de células ganglionares. Barra de escala: 50µm. Test t para muestras emparejadas para la retina derecha (PBS) frente a la retina izquierda (ADA) de los ratones *rd10* *P<0,05; ***P<0,001. Los datos representan la media ± la desviación estándar del error. [31].

Una dosis única de ADA intravítreo redujo los componentes del inflammasoma NLRP3 y la activación microglial en ratones *rd10* a P23

A continuación, se evaluó si el tratamiento con ADA presentaba efecto sobre algunos de los componentes del inflammasoma NLRP3, que se habían visto alterados en los ratones *rd10* a P23. En primer lugar, se comprobó que el ADA administrado a 0,375 ug/ml era capaz de disminuir el aumento de la actividad de la caspasa 1 (Figura 3A) y del contenido de la proteína NLRP3 (Figura 3C).

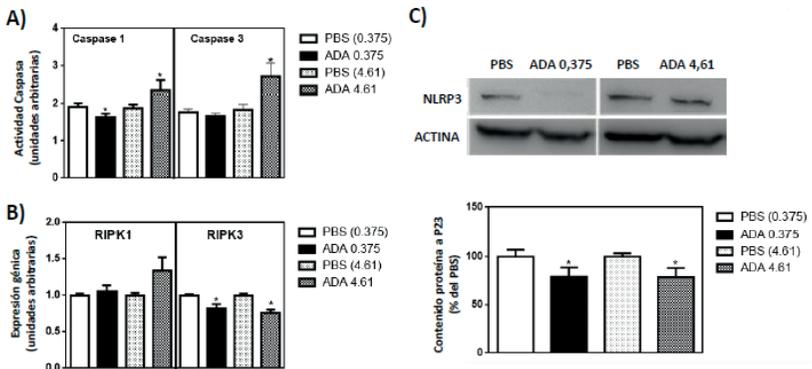


Figura 3. Efecto de única dosis de Adalimumab intravítreo en algunos marcadores de muerte celular implicados en la apoptosis, la necroptosis, el inflammasoma NLRP3 en retinas de ratones *rd10* a día postnatal 23. Actividad de las caspasas 3 y 1 utilizando sustratos específicos (A) Expresión génica de RIPK1 y RIPK3 (B) Western blot representativo y cuantificación de NLRP3 (C) Test t para muestras emparejadas para la retina derecha (PBS) frente a la retina izquierda *P<0,05. Los datos representan la media ± la desviación estándar del error (SEM) [31].

La concentración más alta de ADA (4,6 ug/ml) tuvo un efecto similar sobre el contenido de la proteína NLRP3 (Figura 3C), pero no fue capaz de disminuir el aumento de la actividad de la caspasa 1 (figura 3A). Sin embargo, ambas concentraciones de ADA fueron capaces de reducir significativamente la expresión génica de RIPK3 (Figura 3B).

Por otro lado, se evaluó el efecto del tratamiento sobre la activación de la microglía en la retina de los ratones a P23. Como marcador de microglía se utilizó Iba1, ya que se trata de una proteína de unión al calcio microglía/macrófago específica, que

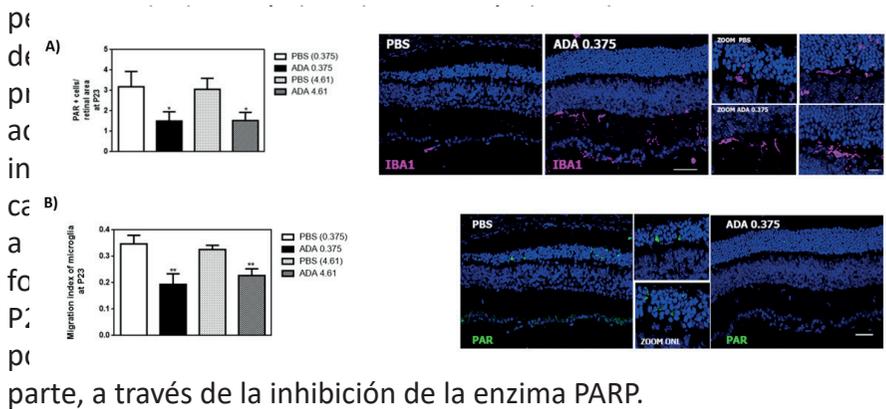


Figura 4. Efecto de única dosis de Adalimumab intravítreo sobre PARtanatos y la activación de la microglía en retinas de ratones *rd10* a día P23. Acumulación de polímeros de poli-ADP ribosa (PAR) (indicador de la activación de PAR), cuantificación e imágenes representativas de retinas *rd10* que muestran el marcaje de PAR en secciones de retina tratadas con PBS o con ADA 0,375 y contrateñidas con DAPI (A) Índice de migración de la microglía e imágenes representativas de retinas *rd10* que muestran el marcaje de Iba1 (células microgliales) (B) en secciones de retina tratadas con PBS o ADA 0,375 y contrateñidas con DAPI. ONL: capa nuclear externa; OPL: capa plexiforme externa; INL: capa nuclear interna; IPL: capa plexiforme interna; GCL: capa de células ganglionares. Barra de escala: 50µm y 10µm para el zoom óptico. Test t para muestras emparejadas para la retina derecha (PBS) frente a la retina izquierda *P<0,05; **P0<0,01. Los datos representan la media ± la desviación estándar del error (SEM) [31].

DISCUSIÓN:

La retinosis pigmentaria comprende un grupo de degeneraciones hereditarias de la retina, que provocan la pérdida de las células

fotorreceptoras, aunque existen otros procesos celulares como la inflamación o el estrés oxidativo que pueden exacerbar la progresión de la enfermedad [34, 35]. En estudios previos hemos demostrado que el TNF α puede ser una buena diana terapéutica para ralentizar la progresión de la enfermedad, ya que el bloqueo de esta molécula mediante repetidas inyecciones intraperitoneales de ADA era capaz de reducir la degeneración retiniana a P18 en el modelo de ratón *rd10* [11]. Sin embargo, el efecto neuroprotector del ADA no se mantenía en el tiempo, y la administración sistémica podría suponer efectos secundarios adversos si se llegase a administrar en humanos. Por ello, se decidió evaluar el efecto del tratamiento mediante inyecciones intravítreas, lo que permite una administración localizada del fármaco.

Por otra parte, los mecanismos de muerte por los que se produce la pérdida de las células fotorreceptoras de la retina, y la forma en la que el ADA es capaz de reducirlos, no estaban claros. Típicamente se ha propuesto que la muerte de los bastones se produce principalmente por mecanismos apoptóticos, mientras que la muerte de los conos por mecanismos necróticos [36]. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que existen otros tipos de muerte implicados en la muerte de las células fotorreceptoras como la necroptosis, la ferroptosis, el parthanatos, o la piroptosis, que pueden actuar como impulsores de la muerte celular necrótica durante las degeneraciones retinianas como la degeneración macular asociada a la edad o la RP [37-39].

La apoptosis comprende una cascada proteolítica mediada por caspasas iniciadoras (8 y 9) y caspasas efectoras (3, 6 y 7). Las caspasas iniciadoras pueden ser activadas por dos vías distintas, conocidas como vía extrínseca o intrínseca de la apoptosis [40]. La vía extrínseca se activa mediante la unión a receptores de muerte de diferentes citocinas, como TNF α . La activación de la vía intrínseca se produce por una disfunción mitocondrial que resulta en la liberación del citocromo C, la activación de la caspasa 9 y la consiguiente activación de la caspasa 3 [7]. La necroptosis es una forma regulada de necrosis mediada por los receptores de muerte. Normalmente se desencadena por estímulos como la

unión a sus receptores de moléculas como el TNF α , que conduce a la activación de RIPK1. Por lo tanto, el TNF α puede inducir tanto apoptosis como necroptosis.

Por otra parte, altos niveles de TNF α o estrés oxidativo también podrían activar la enzima PARP1, dando lugar a otro tipo de muerte celular denominada parthanatos [41]. A parte de su papel en la reparación del daño del ADN, PARP1 modula los procesos neuroinflamatorios en las células gliales [42]. Sin embargo, la hiperactividad de PARP1 puede agotar el almacenamiento celular de ATP y NAD⁺ tratando de reparar el ADN dañado. Esta depleción conduciría a un colapso bioenergético y a una muerte celular necrótica. Además, PARP1 también podría inducir la muerte celular programada, a través de la producción de polímeros de PAR, que estimularían a las mitocondrias para liberar AIF, induciendo así la muerte celular [43-45].

Se observó que las retinas de los ratones *rd10* presentaban activación de la caspasa 3, la caspasa 1, acumulación de PAR, aumento de la expresión génica de RIPK3 y disminución de la expresión génica de RIPK1 a P23. A esta edad postnatal, estos resultados podrían sugerir que las células fotorreceptoras se estaban muriendo por mecanismos dependientes caspasas o de la enzima PARP (parthanatos). Sin embargo, la función de las caspasas es controvertido en la RP. Varios autores han propuesto un desajuste en las actividades de las caspasas 3 y 8 y la liberación del citocromo C mitocondrial en modelos animales de RP [46-49]. Por otra parte, se han encontrado otros mecanismos dependientes de la caspasa 3 implicados en la muerte de los bastones en ratones *rd* o ratas P23H [50, 51].

Una única dosis intravítrea ADA redujo significativamente la acumulación de polímeros de PAR, a las dos concentraciones de ADA ensayadas, pero produjo un aumento de la actividad de las caspasas a la concentración de ADA más alta. Por tanto, se sugiere que a P23 las células fotorreceptoras están muriendo por mecanismos independientes de caspasas. Los mecanismos dependientes caspasas podrían contribuir a la muerte celular en etapas más avanzadas de la enfermedad. Además, el TNF α no parece estar implicado en la activación de la caspasa 3 a esta edad.

A P23 se observó una sobre-activación de la enzima PARP mediante la detección de polímeros de PAR en la ONL de las retinas de ratones *rd10* lo que corroboraba resultados obtenidos por otros autores [52-54]. El tratamiento con ADA previno la acumulación de polímeros de PAR in en las retinas de los ratones *rd10*, así como la activación de la microglía. Estos resultados coincidían con los observados por otros autores, en los que se muestra que la activación de PARP es importante para la activación de la microglía en modelos experimentales de degeneración retiniana y daño neural [55-58]. PARP1 regula la activación microglía a través de NF- κ B [59, 60]. El ADA podría prevenir la activación de la microglía a través de la inhibición de la enzima PARP. Este tipo de muerte, parthanatos, parecía contribuir de manera significativa a la pérdida celular en las retinas de los ratones *rd10*.

Se ha observado un aumento de la expresión génica de RIPK3 en las retinas de ratones *rd10* a P23. RIPK3 es una serina/treonina quinasa esencial para la necroptosis, pero que también puede producir inflamación sin que se produzca la muerte de células necroptóticas. Cuando RIPK3 se fosforila, puede activar MLKL, un ejecutor de necroptosis pero también regula otras funciones la apoptosis independiente de quinazas o la inflamación [61]. Existen diferentes posturas en cuanto a la participación de los procesos de necroptosis en la RP. Como se ha comentado, algunos autores proponen que la muerte temprana de los bastones se produce por mecanismos apoptóticos dependientes de caspasas, mientras que los conos mueren por mecanismos necroptóticos que dependen de RIPK3 [36, 49]. En este estudio se ha observado un desajuste en la expresión génica de estos dos componentes de la vía de necroptosis en las retinas de los ratones *rd10* a P23. En parte coincidimos con estos autores en que la muerte de las células fotorreceptoras podría ser mediada por mecanismos apoptóticos, pero hemos comprobado que la activación de PARP1 a P23 también está implicada en el proceso de degeneración. Creemos que RIPK3 presenta un papel importante en la activación del inflammasoma NLRP3 que, por otra parte, podría estar dando lugar a otro tipo de muerte de celular denominado piroptosis en las primeras etapas de la enfermedad.

El bloqueo de la señalización por TNF α no presentaba ningún efecto sobre la expresión génica de RIPK1, sin embargo, sí reducía la expresión génica de RIPK3 en la retina de los ratones *rd10*.

Se ha mostrado un aumento de la actividad de la caspasa 1, y del contenido de la proteína NLRP3 en la retina de los ratones *rd10*, lo que estaría indicando que la degeneración de la retina va acompañada de un aumento de los componentes del inflamasoma NLRP3 que quizás estaría activado a P23. Elevados niveles de TNF α y el estrés oxidativo y nitrosativo pueden activar PARP y el inflamasoma NLRP3, dando lugar a necroptosis, ferroptosis o piroptosis [62-64]. RIPK3 también puede activar el inflamasoma NLRP3 e inducir un aumento de la expresión de ASC y de la caspasa 1 activada conduciendo a la muerte celular por piroptosis [61, 65]. La activación del inflamasoma NLRP3 se ha descrito también otros modelos animales de RP [66, 67] y se sabe que está implicado en otras degeneraciones retinianas como la retinopatía diabética o la degeneración macular asociada a la edad [68-70].

En este estudio, una única dosis intravítrea de ADA fue capaz de disminuir la hiperactivación de PARP1, el aumento de la expresión génica de RIPK3 y del contenido de la proteína NLRP3, lo que podría estar indicando que la inhibición de la señalización medida por TNF α inhibiría la activación inflamatoria NLRP3. Son necesarios más estudios para confirmar esta idea.

En resumen, se proponen diferentes mecanismos implicados en la muerte celular en ratones *rd10* en etapas intermedias de la enfermedad. La activación de la enzima PARP1 parece contribuir de manera importante a la muerte de las células fotorreceptoras en los ratones. RIPK3 podría promover la activación del inflamasoma NLRP3 y, a su vez, la muerte celular a través de mecanismos no necroptóticos. Los procesos de muerte celular y la relación entre sí durante la degeneración retiniana en PR son muy complejos, pero parece que la activación de PARP tiene un papel importante durante la degeneración retiniana como sugieren otros autores [71, 72]. Por ello, se cree que existe una interacción compleja de todos estos mecanismos a lo largo del proceso de degeneración retiniana y que es importante profundizar en ellos y determinar en qué momento de la patología predomina cada uno.

CONCLUSIONES:

Los resultados de este estudio sugieren que es posible reducir la degeneración retiniana, reduciendo al menos en parte, algunos procesos inflamatorios.

El Adalimumab previene de la degeneración retiniana a través de mecanismos independientes de caspasas pero disminuyendo la activación de PARP, de la microglía y del inflammasoma NLRP3.

Este tipo de aproximaciones terapéuticas suponen una gran ventaja ya que son independientes del defecto genético causante de la retinosis pigmentaria.

BIBLIOGRAFÍA:

- [1] C. Portera-Cailliau, C.H. Sung, J. Nathans, R. Adler, Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(3) (1994) 974-8.
- [2] M.A. Rivas, E. Vecino, Animal models and different therapies for treatment of retinitis pigmentosa, *Histology and histopathology* 24(10) (2009) 1295-322.
- [3] M. Corton, M.J. Blanco, M. Torres, M. Sanchez-Salorio, A. Carracedo, M. Brion, Identification of a novel mutation in the human PDE6A gene in autosomal recessive retinitis pigmentosa: homology with the nmf28/nmf28 mice model, *Clin Genet* 78(5) (2010) 495-8.
- [4] S. Daiger, Sullivan, L. & Bowne, S, Retinal Information Network, 1996-2014. <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet>.
- [5] S. Ebert, K. Weigelt, Y. Walczak, W. Drobniak, R. Mauerer, D.A. Hume, B.H. Weber, T. Langmann, Docosahexaenoic acid attenuates microglial activation and delays early retinal degeneration, *Journal of neurochemistry* 110(6) (2009) 1863-75.
- [6] N. Gupta, K.E. Brown, A.H. Milam, Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration, *Experimental eye research* 76(4) (2003) 463-71.
- [7] M. Sasahara, A. Otani, A. Oishi, H. Kojima, Y. Yodoi, T. Kameda, H. Nakamura, N. Yoshimura, Activation of bone marrow-derived microglia promotes photoreceptor survival in inherited retinal degeneration, *The American journal of pathology* 172(6) (2008) 1693-703.
- [8] K.G. Sheets, B. Jun, Y. Zhou, M. Zhu, N.A. Petasis, W.C. Gordon, N.G. Bazan, Microglial ramification and redistribution concomitant with

the attenuation of choroidal neovascularization by neuroprotectin D1, *Molecular vision* 19 (2013) 1747-59.

[9] N. Yoshida, Y. Ikeda, S. Notomi, K. Ishikawa, Y. Murakami, T. Hisatomi, H. Enaida, T. Ishibashi, Laboratory evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa, *Ophthalmology* 120(1) (2013) e5-12.

[10] H.Y. Zeng, X.A. Zhu, C. Zhang, L.P. Yang, L.M. Wu, M.O. Tso, Identification of sequential events and factors associated with microglial activation, migration, and cytotoxicity in retinal degeneration in rd mice, *Investigative ophthalmology & visual science* 46(8) (2005) 2992-9.

[11] C. Martínez-Fernández de la Cámara, A.M. Hernández-Pinto, L. Olivares-González, C. Cuevas-Martín, M. Sánchez-Aragó, D. Hervás, D. Salom, J.M. Cuezva, E.J. de la Rosa, J.M. Millán, R. Rodrigo, Adalimumab Reduces Photoreceptor Cell Death in A Mouse Model of Retinal Degeneration, *Scientific reports* 5 (2015) 11764.

[12] C. Martínez-Fernández de la Cámara, L. Olivares-González, D. Hervás, D. Salom, J.M. Millán, R. Rodrigo, Infliximab reduces Zaprinas-induced retinal degeneration in cultures of porcine retina, *Journal of neuroinflammation* 11 (2014) 172.

[13] L. Olivares-Gonzalez, C. Martinez-Fernandez de la Camara, D. Hervas, J.M. Millan, R. Rodrigo, HIF-1alpha stabilization reduces retinal degeneration in a mouse model of retinitis pigmentosa, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 32(5) (2018) 2438-2451.

[14] S.P. Cullen, C.M. Henry, C.J. Kearney, S.E. Logue, M. Feoktistova, G.A. Tynan, E.C. Lavelle, M. Leverkus, S.J. Martin, Fas/CD95-induced chemokines can serve as "find-me" signals for apoptotic cells, *Mol Cell* 49(6) (2013) 1034-48.

[15] M. Pasparakis, P. Vandenabeele, Necroptosis and its role in inflammation, *Nature* 517(7534) (2015) 311-20.

[16] A.T. Ting, M.J.M. Bertrand, More to Life than NF-kappaB in TNFR1 Signaling, *Trends Immunol* 37(8) (2016) 535-545.

[17] F. Van Herreweghe, N. Festjens, W. Declercq, P. Vandenabeele, Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question, *Cell Mol Life Sci* 67(10) (2010) 1567-79.

[18] N. Vanlangenakker, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview, *Cell Death Differ* 19(1) (2012) 75-86.

[19] W.M. Chu, Tumor necrosis factor, *Cancer Lett* 328(2) (2013) 222-5.

[20] B. Cvenkel, A.N. Kopitar, A. Ihan, Inflammatory molecules in aqueous humour and on ocular surface and glaucoma surgery outcome, *Mediators of inflammation* 2010 (2010) 939602.

[21] K. Durrani, M. Ahmed, C.S. Foster, Adamantiades-Behcet disease: diagnosis and current concepts in management of ocular manifestations, *Comprehensive ophthalmology update* 8(4) (2007) 225-33.

- [22] R.M. Japiassu, O.F. Brasil, A.L. Cunha, E.C. de Souza, Regression of vasoproliferative tumor with systemic infliximab, *Ophthalmic surgery, lasers & imaging : the official journal of the International Society for Imaging in the Eye* 39(4) (2008) 348-9.
- [23] P.I. Murray, R. Hoekzema, M.A. van Haren, F.D. de Hon, A. Kijlstra, Aqueous humor interleukin-6 levels in uveitis, *Investigative ophthalmology & visual science* 31(5) (1990) 917-20.
- [24] S. Saxena, V.K. Khanna, A.B. Pant, C.H. Meyer, V.K. Singh, Elevated tumor necrosis factor in serum is associated with increased retinal ischemia in proliferative eales' disease, *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 78(5) (2011) 261-5.
- [25] J.M. Seddon, S. George, B. Rosner, N. Rifai, Progression of age-related macular degeneration: prospective assessment of C-reactive protein, interleukin 6, and other cardiovascular biomarkers, *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 123(6) (2005) 774-82.
- [26] M. Schulz, H. Dotzlaw, Ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis: serum levels of TNF- α and its soluble receptors during the course of therapy with etanercept and infliximab, 2014 (2014) 675108.
- [27] S. Aboobacker, A.M. Al Aboud, *Infliximab-abda*, StatPearls, StatPearls Publishing Treasure Island (FL), 2020.
- [28] M. Diaz-Llopis, D. Salom, C. Garcia-de-Vicuna, M. Cordero-Coma, G. Ortega, N. Ortega, M. Suarez-de-Figueroa, M.J. Rio-Pardo, C. Fernandez-Cid, A. Fonollosa, R. Blanco, A.M. Garcia-Aparicio, J.M. Benitez-Del-Castillo, J.L. Olea, J.F. Arevalo, Treatment of refractory uveitis with adalimumab: a prospective multicenter study of 131 patients, *Ophthalmology* 119(8) (2012) 1575-81.
- [29] K.C. LaMattina, D.A. Goldstein, Adalimumab for the treatment of uveitis, *Expert review of clinical immunology* 13(3) (2017) 181-188.
- [30] A.B. Nair, S. Jacob, A simple practice guide for dose conversion between animals and human, *Journal of basic and clinical pharmacy* 7(2) (2016) 27-31.
- [31] L. Olivares-González, S. Velasco, J.M. Millán, R. Rodrigo, Intravitreal administration of adalimumab delays retinal degeneration in rd10 mice, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 34(10) (2020) 13839-13861.
- [32] S. Genini, W.A. Beltran, G.D. Aguirre, Up-regulation of tumor necrosis factor superfamily genes in early phases of photoreceptor degeneration, *PloS one* 8(12) (2013) e85408.
- [33] L. Olivares-González, C. Martínez-Fernández de la Cámara, D. Hervás, J.M. Millán, R. Rodrigo, HIF-1 α stabilization reduces retinal degeneration in a mouse model of retinitis pigmentosa, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 32(5) (2018) 2438-2451.

- [34] I.A. Viringipurampeer, A.E. Bashar, C.Y. Gregory-Evans, O.L. Moritz, K. Gregory-Evans, Targeting inflammation in emerging therapies for genetic retinal disease, *Int J Inflam* 2013 (2013) 581751.
- [35] J. Kruk, K. Kubasik-Kladna, H.Y. Aboul-Enein, The Role Oxidative Stress in the Pathogenesis of Eye Diseases: Current Status and a Dual Role of Physical Activity, *Mini Rev Med Chem* 16(3) (2015) 241-57.
- [36] Y. Murakami, H. Matsumoto, M. Roh, J. Suzuki, T. Hisatomi, Y. Ikeda, J.W. Miller, D.G. Vavvas, Receptor interacting protein kinase mediates necrotic cone but not rod cell death in a mouse model of inherited degeneration, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(36) (2012) 14598-603.
- [37] J. Gao, J.Z. Cui, E. To, S. Cao, J.A. Matsubara, Evidence for the activation of pyroptotic and apoptotic pathways in RPE cells associated with NLRP3 inflammasome in the rodent eye, *Journal of neuroinflammation* 15(1) (2018) 15.
- [38] K. Totsuka, T. Ueta, T. Uchida, M.F. Roggia, S. Nakagawa, D.G. Vavvas, M. Honjo, M. Aihara, Oxidative stress induces ferroptotic cell death in retinal pigment epithelial cells, *Experimental eye research* 181 (2019) 316-324.
- [39] N. Yoshida, Y. Ikeda, S. Notomi, K. Ishikawa, Y. Murakami, T. Hisatomi, H. Enaida, T. Ishibashi, Clinical evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa, *Ophthalmology* 120(1) (2013) 100-5.
- [40] M.L. Circu, T.Y. Aw, Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis, *Free Radic Biol Med* 48(6) (2010) 749-62.
- [41] T. Lindahl, M.S. Satoh, G.G. Poirier, A. Klungland, Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks, *Trends in biochemical sciences* 20(10) (1995) 405-11.
- [42] A. Chiarugi, M.A. Moskowitz, Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity promotes NF-kappaB-driven transcription and microglial activation: implication for neurodegenerative disorders, *Journal of neurochemistry* 85(2) (2003) 306-17.
- [43] S.P. Cregan, A. Fortin, J.G. MacLaurin, S.M. Callaghan, F. Cecconi, S.W. Yu, T.M. Dawson, V.L. Dawson, D.S. Park, G. Kroemer, R.S. Slack, Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death, *The Journal of cell biology* 158(3) (2002) 507-17.
- [44] S.J. Hong, T.M. Dawson, V.L. Dawson, Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling, *Trends in pharmacological sciences* 25(5) (2004) 259-64.
- [45] S.W. Yu, S.A. Andrabi, H. Wang, N.S. Kim, G.G. Poirier, T.M. Dawson, V.L. Dawson, Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(48) (2006) 18314-9.

- [46] C. Bode, U. Wolfrum, Caspase-3 inhibitor reduces apoptotic photoreceptor cell death during inherited retinal degeneration in tubby mice, *Molecular vision* 9 (2003) 144-50.
- [47] H. Kaur, S. Chauhan, R. Sandhir, Protective effect of lycopene on oxidative stress and cognitive decline in rotenone induced model of Parkinson's disease, *Neurochemical research* 36(8) (2011) 1435-43.
- [48] H.R. Lohr, K. Kuntchithapautham, A.K. Sharma, B. Rohrer, Multiple, parallel cellular suicide mechanisms participate in photoreceptor cell death, *Experimental eye research* 83(2) (2006) 380-9.
- [49] I.A. Viringipurampeer, C.Y. Gregory-Evans, A.L. Metcalfe, E. Bashar, O.L. Moritz, K. Gregory-Evans, Cell Death Pathways in Mutant Rhodopsin Rat Models Identifies Genotype-Specific Targets Controlling Retinal Degeneration, 56(3) (2019) 1637-1652.
- [50] S. Cottet, D.F. Schorderet, Mechanisms of apoptosis in retinitis pigmentosa, *Current molecular medicine* 9(3) (2009) 375-83.
- [51] J. Kaur, S. Mencl, A. Sahaboglu, P. Farinelli, T. van Veen, E. Zrenner, P. Ekstrom, F. Paquet-Durand, B. Arango-Gonzalez, Calpain and PARP activation during photoreceptor cell death in P23H and S334ter rhodopsin mutant rats, *PLoS one* 6(7) (2011) e22181.
- [52] K. Jiao, A. Sahaboglu, E. Zrenner, M. Ueffing, P.A. Ekstrom, F. Paquet-Durand, Efficacy of PARP inhibition in Pde6a mutant mouse models for retinitis pigmentosa depends on the quality and composition of individual human mutations, *Cell Death Discov* 2 (2016) 16040.
- [53] F. Paquet-Durand, J. Silva, T. Talukdar, L.E. Johnson, S. Azadi, T. van Veen, M. Ueffing, S.M. Hauck, P.A. Ekstrom, Excessive activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to inherited photoreceptor degeneration in the retinal degeneration 1 mouse, *J Neurosci* 27(38) (2007) 10311-9.
- [54] A. Sahaboglu, A. Sharif, L. Feng, E. Secer, E. Zrenner, F. Paquet-Durand, Temporal progression of PARP activity in the Prph2 mutant rd2 mouse: Neuroprotective effects of the PARP inhibitor PJ34, *PLoS One* 12(7) (2017) e0181374.
- [55] J.C. d'Avila, T.I. Lam, D. Bingham, J. Shi, S.J. Won, T.M. Kauppinen, S. Massa, J. Liu, R.A. Swanson, Microglial activation induced by brain trauma is suppressed by post-injury treatment with a PARP inhibitor, *J Neuroinflammation* 9 (2012) 31.
- [56] T.M. Kauppinen, R.A. Swanson, Poly(ADP-ribose) polymerase-1 promotes microglial activation, proliferation, and matrix metalloproteinase-9-mediated neuron death, *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 174(4) (2005) 2288-96.
- [57] S. Nakatake, Y. Murakami, Y. Ikeda, N. Morioka, T. Tachibana, K. Fujiwara, N. Yoshida, S. Notomi, T. Hisatomi, S. Yoshida, T. Ishibashi, Y. Nakabeppu, K.H. Sonoda, MUTYH promotes oxidative microglial activation and inherited retinal degeneration, *JCI insight* 1(15) (2016) e87781.

- [58] O. Ullrich, A. Diestel, I.Y. Eyüpoglu, R. Nitsch, Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose) polymerase-1, *Nature cell biology* 3(12) (2001) 1035-42.
- [59] B.A. Stoica, D.J. Loane, Z. Zhao, S.V. Kabadi, M. Hanscom, K.R. Byrnes, A.I. Faden, PARP-1 inhibition attenuates neuronal loss, microglia activation and neurological deficits after traumatic brain injury, *J Neurotrauma* 31(8) (2014) 758-72.
- [60] J. Xu, H. Wang, S.J. Won, J. Basu, D. Kapfhamer, R.A. Swanson, Microglial activation induced by the alarmin S100B is regulated by poly(ADP-ribose) polymerase-1, *Glia* 64(11) (2016) 1869-78.
- [61] K. Moriwaki, F.K. Chan, The Inflammatory Signal Adaptor RIPK3: Functions Beyond Necroptosis, *International review of cell and molecular biology* 328 (2017) 253-275.
- [62] J.M. Abais, M. Xia, Y. Zhang, K.M. Boini, P.L. Li, Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector?, *Antioxidants & redox signaling* 22(13) (2015) 1111-29.
- [63] J.Y. Cao, S.J. Dixon, Mechanisms of ferroptosis, *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73(11-12) (2016) 2195-209.
- [64] J.M. Rodriguez-Vargas, M.J. Ruiz-Magana, C. Ruiz-Ruiz, J. Majuelos-Melguizo, A. Peralta-Leal, M.I. Rodriguez, J.A. Munoz-Gamez, M.R. de Almodovar, E. Siles, A.L. Rivas, M. Jaattela, F.J. Oliver, ROS-induced DNA damage and PARP-1 are required for optimal induction of starvation-induced autophagy, *Cell research* 22(7) (2012) 1181-98.
- [65] A. Malik, T.D. Kanneganti, Inflammasome activation and assembly at a glance, *130(23)* (2017) 3955-3963.
- [66] T. Appelbaum, E. Santana, G.D. Aguirre, Strong upregulation of inflammatory genes accompanies photoreceptor demise in canine models of retinal degeneration, *PloS one* 12(5) (2017) e0177224.
- [67] S. Syeda, A.K. Patel, T. Lee, A.S. Hackam, Reduced photoreceptor death and improved retinal function during retinal degeneration in mice lacking innate immunity adaptor protein MyD88, *Experimental neurology* 267 (2015) 1-12.
- [68] I. Akhtar-Schafer, L. Wang, T.U. Krohne, Modulation of three key innate immune pathways for the most common retinal degenerative diseases, *10(10)* (2018).
- [69] A. Kauppinen, J.J. Paterno, J. Blasiak, A. Salminen, K. Kaarniranta, Inflammation and its role in age-related macular degeneration, *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73(9) (2016) 1765-86.
- [70] P. Yerramothu, A.K. Vijay, M.D.P. Willcox, Inflammasomes, the eye and anti-inflammasome therapy, *Eye (London, England)* 32(3) (2018) 491-505.
- [71] F. Paquet-Durand, D. Sanges, J. McCall, J. Silva, T. van Veen, V. Marigo, P. Ekstrom, Photoreceptor rescue and toxicity induced by different calpain inhibitors, *Journal of neurochemistry* 115(4) (2010) 930-40.

[72] F. Paquet-Durand, J. Silva, T. Talukdar, L.E. Johnson, S. Azadi, T. van Veen, M. Ueffing, S.M. Hauck, P.A. Ekstrom, Excessive activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to inherited photoreceptor degeneration in the retinal degeneration 1 mouse, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27(38) (2007) 10311-9.

LA SUPLEMENTACIÓN CON NUTRACÉUTICOS ORALES MEJORA LA FUNCIÓN VISUAL, LA DEGENERACIÓN DE LA RETINA Y EL ESTADO REDOX EN RATONES *rd10*.

Sheyla Velasco Gomariz^{1,2}, L. Olivares-González^{1,2},
I. Campillo^{1,2}, D. Salom^{3,4}, E. González-García³, J.M.
Soriano^{5,6} y R. Rodrigo^{1,2,4,6,7}

1 Fisiopatología y terapias para los trastornos de la visión, Centro de investigación Príncipe Felipe (CIPF), Eduardo Primo Yúfera 3, 46012 Valencia, España;

2 Unidad Mixta de Investigación en Enfermedades Raras CIPF-Instituto de Investigación Sanitaria Hospital La Fe (IIS-La Fe), 46012 Valencia, España;

3 Departamento de Oftalmología, Hospital de Manises, Av. de la Generalitat Valenciana, 50, 46940 Manises, España;

4 CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), 28006 Madrid, España;

5 Laboratorio de Alimentación y Salud, Instituto de Ciencia de los Materiales, Universidad de Valencia (UV), Catedrático José Beltrán Martínez, 2, 46980 Valencia, España;

6 Unidad Mixta de Investigación en Endocrinología, Nutrición y Dietética Clínica UV-IIS La Fe, 46012 Valencia, España;

7 Departamento de fisiología, Universidad de Valencia (UV), Avda. Vicente Andrés Estellés, 50, Burjassot, 46100 Valencia, España.

La Retinosis pigmentaria (RP) es un grupo de trastornos hereditarios de la retina que se caracterizan por la pérdida progresiva, principalmente, de los fotorreceptores (primerio los bastones y después los conos) y que conlleva a la ceguera [1]. En las primeras fases de la enfermedad, los pacientes con RP suelen perder la visión nocturna y periférica debido a la muerte inicial

de los bastones y finalmente en etapas más avanzadas pierden la visión central, debida a la muerte de los conos [2]. La retina es uno de los tejidos que más oxígeno (O_2) consume y por ello, es muy susceptible al daño oxidativo por especies reactivas del oxígeno (ROS). Por otro lado, la retina también está predispuesta a la foto-oxidación por su exposición constante a la luz. Durante la degeneración de los bastones, la retina está expuesta a mayores niveles de O_2 , lo que provoca la generación de ROS que contribuye a la muerte celular de los fotorreceptores restantes [2] [3]. Hay evidencias clínicas del daño oxidativo en los fluidos biológicos de pacientes con RP [4-9]. Por otro lado, el estrés oxidativo, está estrechamente relacionado con el proceso inflamatorio que se encuentra del mismo modo presente en pacientes y modelos animales de RP [10]. Los alimentos funcionales o nutraceuticos (NUT) son sustancias naturales que presentan propiedades antioxidantes o antiinflamatorias y que se usan como estrategias terapéuticas en diferentes enfermedades retinianas [11-15].

OBJETIVOS:

El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de una combinación de nutraceuticos (NUT) en la función retiniana, el estado redox y la inflamación en la retina de ratones *rd10*, modelo murino de RP autosómica recesiva.

METODOLOGÍA:

Animales y tratamiento

Se utilizaron ratones *rd10* como modelo de RP autosómica recesiva. Los ratones C57Bl/6J con la misma base genética que los ratones *rd10* se utilizaron como grupo control. Los ratones se mantuvieron bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, con humedad y temperatura controladas. Todas las jaulas se colocaron en la misma posición dentro del estabulario para mantener una iluminación constante de 116 lux (IC del 95%: 98-131). Los ratones se alojaron en el Animalario del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF). Se utilizaron al menos ocho

animales por cada grupo para las diferentes técnicas utilizadas (electrorretinografía, evaluación histológica estado redox y expresión génica).

Sobre la base de varias formulaciones comerciales para humanos, se diseñó una mezcla de nutracéuticos que contenía ácido fólico (vitamina B9), vitamina B6, vitamina A, zinc (Zn), cobre (Cu), selenio (Se), luteína y zeaxantina (Dr. José Miguel Soriano (Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, España)). Esta formulación, abreviada como NUT, se diseñó de acuerdo con las Ingestas Dietéticas de Referencia (DRI) para la población española para estos compuestos en humanos [16]. Para seleccionar la dosis equivalente para ratones, se aplicó la fórmula para la conversión de dosis entre humanos y ratones cada componente[17]. Una vez a la semana, la formulación NUT se preparó en fresco disolviendo el polvo del componente en aceite de oliva para obtener la dosis final deseada (en mg/kg): 0,052 de ácido fólico, 0,523 de vitamina B6, 0,244 de vitamina A (acetato de retinol), 2,787 de Zn 0,697 Cu, 0,012 Se, 2,787 luteína y 6,62 zeaxantina. Las crías rd10 recibieron la mezcla NUT cada dos días desde el día postnatal (P) 9 hasta el P18.

Había cuatro grupos experimentales: ratones control (C), ratones control tratados con NUT (excluidos de los resultados por no mostrar diferencias con los ratones control), ratones rd10 sin tratar (rd10) y ratones rd10 tratados con NUT (rd10+NUT).

Electrorretinografía Ganzfeld.

La función global de la retina se examinó mediante electroretinografía (ERG) de campo completo en condiciones escotópicas en los diferentes grupos. Los animales se adaptaron previamente a la oscuridad (al menos 12 horas). La respuesta eléctrica se registró a través de electrodos colocados en el interior de los párpados inferiores. Las respuestas a las diferentes intensidades lumínicas o candelas (rango 0,0003 - 25 cd-s/m²) se promediaron, amplificaron y almacenaron en una unidad de electrofisiología RetiScan-RetiPort (Roland Consult, Brandenburg an der Havel, Alemania).

La respuesta obtenida consistía en un componente negativo inicial (onda a) y un pico positivo posterior (onda b) evocados

por la estimulación de la luz. La distancia entre la línea de base y el primer pico negativo determinaba la amplitud de la onda a. La amplitud de la onda b se determinó midiendo la distancia entre el pico de la onda a y el siguiente pico positivo más grande. La latencia (tiempo implícito) de las ondas a y b se determinó midiendo el tiempo transcurrido desde el inicio del estímulo hasta el pico de cada onda, respectivamente. La actividad eléctrica de las células de la retina se representó como la media \pm el error estándar de la media (SEM) de la amplitud de las ondas b para cada intensidad lumínica en condiciones escotópicas.

Histología de la retina

Los ojos se procesaron para el posterior estudio histológico de la retina en criosecciones. Se empleó la técnica TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) para visualizar principalmente las células apoptóticas (Promega, Madison, WI, EE.UU). Se emplearon anticuerpos específicos para la visualización de la proteína adaptadora de unión a calcio ionizado-1 (Iba1) (WakoPure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japón), proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) o los polímeros de Poli-ADP ribosa (PAR) (Enzo Life Science, Madrid, España) en un microscopio confocal TCS-SP5 (Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Alemania).

Microscopía y cuantificación

Se cuantificó el número de núcleos de fotorreceptores en la capa nuclear externa (CNE), el número de células positivas para el marcaje de TUNEL, PAR e Iba1 y la intensidad de la fluorescencia del marcaje de GFAP con el software ImageJ.

Determinación de marcadores del estado redox

El estado redox ocular se evaluó midiendo la capacidad antioxidante total (TAC), las actividades de la superóxido dismutasa citosólica (SOD1), la SOD mitocondrial (SOD2), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx), el contenido de aductos de carbonilo (CAR) y la formación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS, indicador de peroxidación lipídica) en la retina de los grupos de estudio.

Análisis de expresión génica

Se determinó la expresión relativa de los marcadores inflamatorios: TNF α , TNFR1, IL-6, IL-1 β , IL-18 y GFAP mediante

PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) (LightCycler® 480 System; Roche, Basel, Suiza) a partir de ácido ribonucleico (ARN) obtenido de las retinas de los grupos de estudio. Se emplearon sondas TaqMan específicas: Mm00443260_g1 (TNF- α), Mm00441883_g1 (TNFR1), Mm01253033_m1 (GFAP), Mm00434228_m1 (IL-1 β), Mm00434226_m1 (IL-18), Mm00446190_m1 (IL-6). El gen de la β 2-microglobulina (β 2m) (Mm00437762_m1) se utilizó como gen de control interno. La expresión génica relativa se normalizó respecto a su control interno. A continuación, los valores de expresión de retina control se normalizaron a uno para determinar los cambios en la expresión génica de los ratones rd10.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software Graph Pad 9.0 (Prism; Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, EE.UU.). La distribución normal de los datos se analizó mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. Las comparaciones entre los grupos de control, rd10 y rd10+NUT se realizaron mediante ANOVA unidireccional y prueba de comparaciones múltiples post hoc de Tukey o Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples post hoc de Dunn, dependiendo de la distribución de los datos (análisis paramétrico o no paramétrico). En algunos casos, las comparaciones entre los grupos rd10 y rd10+NUT se realizaron mediante la prueba de Mann-Whitney. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los datos se representaron con el programa Graph Pad 9.0. Los datos se presentaron como media \pm SEM.

RESULTADOS:

La administración oral de NUT antioxidantes enlenteció la degeneración retiniana en ratones rd10 a día postnatal 18.

Se estudió la función y la morfología de las retinas de ratones control y rd10 con y sin NUT. En primer lugar, se evaluó la función visual mediante ERG-Ganzfeld en condiciones escotópicas. Esta prueba determinaba la respuesta eléctrica global de la retina a diferentes estímulos luminosos. Como estaba descrito, la respuesta global fue mucho menor en ratones rd10 que en ratones control. Los registros ERG escotópicos mostraron una

disminución significativa de las amplitudes de las ondas b en múltiples intensidades lumínicas, en comparación con los ratones control (Figura 1a). El tiempo implícito o latencia de la onda a de los ratones control (unos 15-28 ms) fue más rápido que en los ratones rd10 (unos 30-45 ms) para la mayoría de las intensidades utilizadas (Figura 1b). El tiempo implícito o latencia de la onda b de los ratones control (unos 40-48 ms) también fue más rápido que en los ratones rd10 (unos 55-70 ms) para las intensidades más altas utilizadas ($0,3-25 \text{ cds/m}^2$) (Figura 1c).

Se estudió si la suplementación con NUT mejoraban la función visual de los ratones rd10. Basándonos en las respuestas de ERG, las amplitudes de la onda b fueron ligeramente mayores en los ratones rd10 tratados con NUT que en los ratones rd10 no tratados para varias intensidades de luz. Por lo tanto, la suplementación con NUT recuperó en parte la respuesta retiniana a la luz en los ratones rd10.

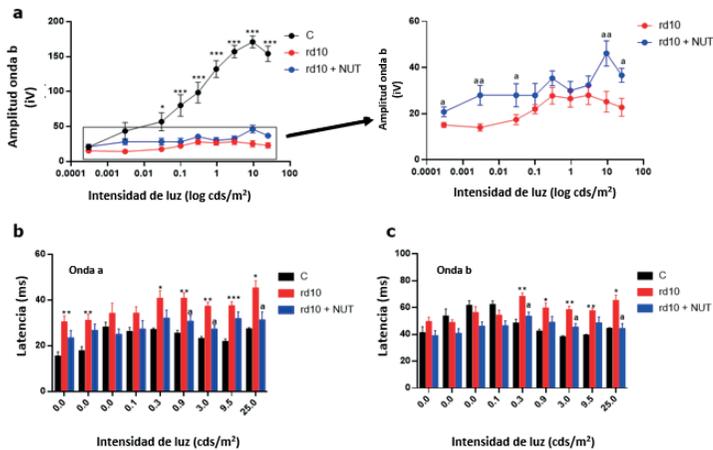


Figura 1. Efecto de la administración oral de nutraceuticos sobre la degeneración de la retina en ratones rd10 a P18: **(a)** amplitudes de la onda b del ERG; **(b)** tiempo implícito de la onda a o latencia de la onda a; **(c)** tiempo implícito de la onda b o latencia de la onda b; registrada en ratones control adaptados a la oscuridad a P18 (C), ratones rd10 no tratados y ratones rd10 tratados con NUT a diferentes intensidades de estímulos luminosos. Los ratones rd10 fueron tratados con NUT desde P9 hasta P18. Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples post hoc de Dunn para comparar tres grupos o la prueba de Mann-Whitney para comparar rd10 frente a rd10 +

NUT. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$ para diferencias entre los ratones control y rd10; ^a $p < 0,05$; ^{aa} $p < 0,01$ para las diferencias entre los ratones control y rd10 + NUT; ^b $p < 0,05$; ^{bb} $p < 0,01$ para las diferencias entre los ratones rd10 y rd10 + NUT. Los datos se presentan como la media \pm SEM.

En la Figura 2 se muestra el estudio histológico en el que se muestra el número de filas de núcleos de fotorreceptores en la CNE (ONL en inglés) y de células TUNEL positivas (fragmentación del ADN de células, principalmente, las apoptóticas). A P18, los ratones rd10+NUT tuvieron más filas de núcleos en la CNE (u ONL) que los ratones rd10 no tratados (Figura 2a,b). El ensayo TUNEL muestra que el número de células TUNEL positivas en la CNE fue en los ratones rd10+NUT que en los ratones rd10 no tratados (Figura 2c,d).

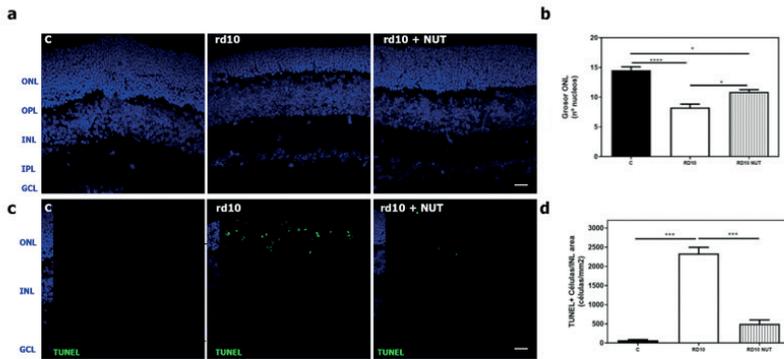


Figura 2. Efecto de la administración oral de nutracéuticos sobre la degeneración de la retina en ratones rd10 a P18: **(a,b)** fotomicrografías representativas de secciones de retina que muestran la tinción con DAPI y **(b)** cuantificación del número de filas de núcleos en la ONL en ratones control (C), ratones rd10 no tratados y ratones rd10 tratados con NUT; **(c)** Fotomicrografías representativas de secciones de la retina que muestran secciones teñidas con TUNEL y contrateñidas con DAPI y **(d)** cuantificación del número de células con núcleos TUNEL positivos en ratones control (C), ratones rd10 no tratados y ratones rd10 tratados con NUT. Barra de escala: 20 μ m. ONL: capa nuclear externa; OPL: capa plexiforme externa; INL: capa nuclear interna; IPL: capa plexiforme interna; GCL: capa de células ganglionares. Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples post hoc de Dunn, * $p < 0,005$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Los datos se presentan como media \pm SEM.

La administración oral de NUT antioxidantes restauró parcialmente el estado redox de la retina en ratones rd10 a P18.

En el presente estudio, se confirmó una alteración del estado redox de la retina en los ratones rd10 con una disminución significativa de los marcadores antioxidantes TAC, y la actividad de SOD1 (Figura 3a), y un aumento significativo de los marcadores e estrés oxidativo TBARS y CAR, en comparación con los ratones control (Figura 3b).

Las actividades las enzimas antioxidantes SOD2, CAT y GPx no presentaron cambios significativos entre ambos grupos (Figura 3a).

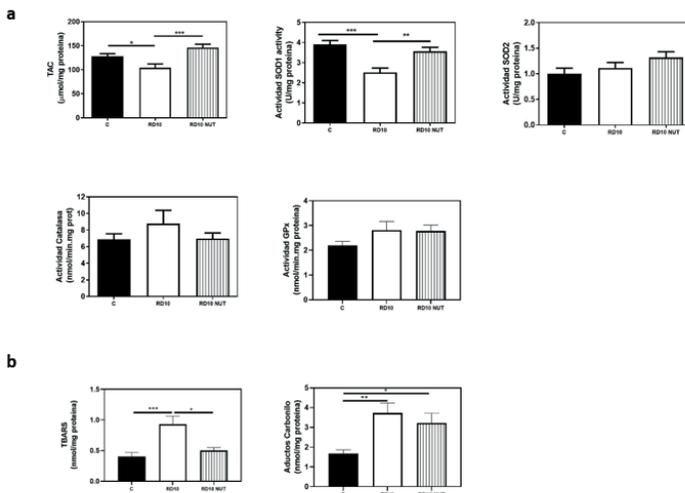


Figura 3. Efecto de la administración oral de nutraceuticos sobre el estado redox de la retina en ratones rd10 a P18. **(a)** Valores de los marcadores antioxidantes TAC, y actividades de la superóxido dismutasa (SOD) 1 o citosólica (SOD1), 2 o mitocondrial (SOD2), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), y **(b)** los valores de los marcadores de oxidación de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, indicador de la peroxidación de lípidos) y los grupos carbonilo de las proteínas (CAR, indicador de la oxidación de las proteínas) de los ratones control (C), ratones rd10 no tratados y ratones rd10 tratados con NUT. Los datos se presentan como la media \pm SEM. Se muestran las diferencias estadísticas entre grupos ($p < 0,05$) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ utilizando ANOVA unidireccional o la prueba de Kruskal-Wallis y las pruebas de comparaciones múltiples post hoc de Tukey o Dunn.

La suplementación oral con NUT mejoró parcialmente el estado redox de la retina. Los ratones rd10 + NUT mostraron valores más

altos de actividad TAC y SOD1 que los ratones rd10 no tratados (Figura 3a). El tratamiento con NUT también redujo la formación de TBARS (un marcador de la peroxidación lipídica), pero no tuvo efecto sobre el contenido de CAR (Figura 3b).

La administración oral de NUT antioxidantes redujo la inflamación en la retina de ratones rd10 a P18.

La administración oral de NUT redujo la inflamación de la retina en los ratones rd10, en comparación con los ratones rd10 no tratados. Como se muestra en la Figura 4a-c, las retinas de los ratones de control presentaban células Iba-1 positivas (marcador de microglía) con una forma ramificada, que se localizaban cerca de la retina interna (células quiescentes). Sin embargo, en las retinas de ratones rd10 no tratados las células Iba-1 positivas presentaban forma ameboide y migración a la retina externa donde se localizan los fotorreceptores. Las retinas de los ratones rd10 + NUT mostraban células positivas Iba-1 con una forma más ramificada que las retinas de los ratones rd10 no tratados, y se localizaban más cerca de la retina interna. Se observó una reducción significativa del índice de migración de estas células (IM) en ratones rd10 + NUT, en comparación con los ratones rd10 no tratados (Figura 4c). Se confirmó la existencia de gliosis reactiva con el marcaje elevado de GFAP en las retinas de ratones rd10, en comparación con las de los ratones control. NUT redujo significativamente el aumento de GFAP en los ratones rd10 + NUT (Figura 4d,e). Los estudios de expresión génica también confirmaron los hallazgos en el contenido de GFAP (Tabla 1).

El número de células PAR positivas aumentó en los ratones rd10 no tratados, en comparación con los ratones control. Los acúmulos de PAR eran el resultado de la actividad excesiva de la enzima poli-ADP ribosa polimerasa. NUT redujo significativamente el número de células que acumulaban PAR en los ratones rd10 (Figura 4f,g).

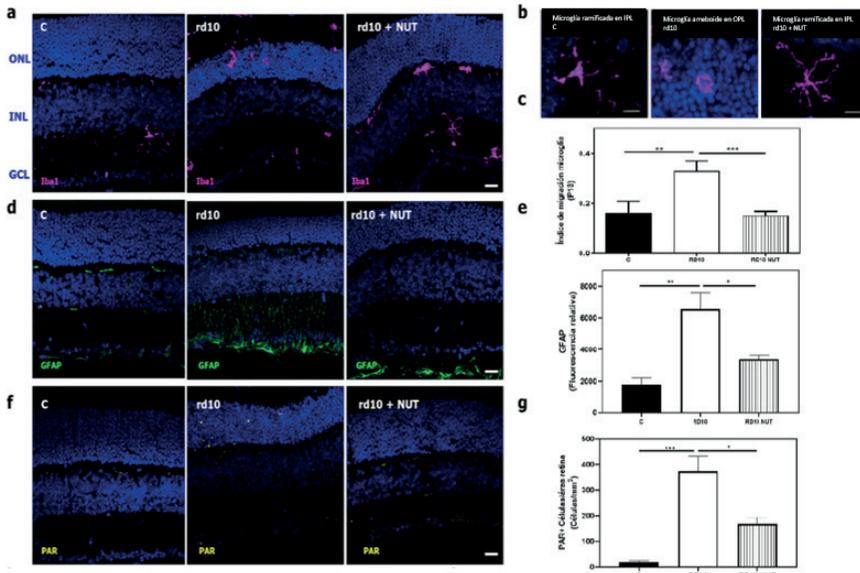


Figura 4. Efecto de la administración oral de nutrácuticos sobre la inflamación de la retina en ratones rd10 a P18: **(a)** fotomicrografías representativas de secciones de la retina que muestran el etiquetado Iba1 (células microgliales) en secciones teñidas con DAPI de ratones control (C), ratones rd10 no tratados y ratones rd10 tratados con NUT. Escala: 20 μ m; **(b)** zoom óptico mostrando forma amebode y ramificada de las células de microglía en las retinas de ratones rd10 no tratados y tratados con NUT escala: 10 μ m; **(c)** índice de migración microglial en estas retinas; **(d,e)** fotomicrografías representativas de secciones de la retina que muestran el etiquetado GFAP (células de Müller) en secciones teñidas con DAPI de ratones control (C), de ratones rd10 no tratados y de ratones rd10 tratados con NUT, escala: 20 μ m; **(f,g)** fotomicrografías representativas de secciones de retina que muestran la acumulación de polímeros de poli ADP-ribosa (PAR), cuantificación de las células PAR positivas de los ratones control (C), rd10 y ratones rd10 tratados con NUT escala: 20 μ m; ONL: capa nuclear externa; INL: capa nuclear interna; GCL: capa de células ganglionares. Los datos se presentan como media \pm SEM. Las diferencias estadísticas entre los grupos ($p < 0,05$) se mostraron * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ mediante ANOVA unidireccional o la prueba de Kruskal-Wallis y las pruebas de comparaciones múltiples post hoc de Tukey o Dunn.

Tabla 1. Expresión génica relativa de moléculas inflamatorias en retina de ratones rd10 con o sin administración oral de nutraceuticos (NUT)

Gen	Expresión relativa C (Media ± SEM)	Expresión relativa rd10 (Media ± SEM)	Expresión relativa rd10+NUT (Media ± SEM)
TNF α	1.0 ± 0.0	40.8 ± 8.0 ***	5.8 ± 1.4 *
TNFR1	1.0 ± 0.1	2.3 ± 0.4 *	0.9 ± 0.2 ^{bbb}
IL-6	1.0 ± 0.0	7.8 ± 2.0 **	2.5 ± 0.6 ^{bb}
IL-1 β	1.0 ± 0.0	17.0 ± 3.0 ***	3.6 ± 0.8 ^{bb}
IL-18	1.0 ± 0.1	0.4 ± 0.1 *	0.1 ± 0.0 ***
GFAP	1.0 ± 0.0	8.3 ± 1.0 ***	2.6 ± 0.5 ^{**b}

Nota: Expresión génica (expresión relativa) en cada grupo. Diferencias entre los ratones rd10 no tratados (rd10) y el control (C) o ratones rd10 tratados con NUT (rd10+NUT) fueron analizados usando la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de las comparaciones múltiples de Dunn. C, control. * p<0.05; ** p <0.01; *** p<0.001 para diferencias entre los ratones control y los rd10; y ^b p<0.05; ^{bb} p<0.01; ^{bbb} p< 0.001 para diferencias entre los ratones rd10 y los rd10+NUT.

Como se muestra en la Tabla 1, las retinas de ratones rd10 presentaron una mayor expresión génica de los marcadores inflamatorios TNF α , IL-6 e IL-1 β que las de los ratones control, corroborando estudios previos. Además, se observó una menor expresión génica de la IL-18 en estos animales. La expresión del receptor de TNF α , TNFR1 también estaba aumentada en los ratones rd10 a esta edad. En este estudio, se mostró que la suplementación con NUT era capaz de modular el perfil inflamatorio reduciendo la IL-6, la IL-1 β y el TNFR1 y, en menor medida, la expresión del TNF α en las retinas de los ratones rd10 (Tabla 2).

DISCUSIÓN:

Actualmente, no existen muchos tratamientos efectivos para abordar la progresión de las distrofias hereditarias de la retina, como la RP. La RP presenta alta heterogeneidad clínica y genética, lo que hace más complicado encontrar un tratamiento

apropiado. Sin embargo, hay diferentes aproximaciones terapéuticas dependiendo del estadio en el que se encuentre la enfermedad. Entre ellas, las terapias farmacológicas se basan en parte en reducir o retrasar la pérdida de los fotorreceptores (o de las células de epitelio pigmentario, RPE) y consecuentemente la pérdida de visión, independientemente del defecto genético. Muchos estudios confirman el papel del estrés oxidativo y la inflamación en la muerte de los fotorreceptores. [6, 18, 19]. Por tanto, el uso de compuestos antioxidantes o antiinflamatorios podrían ser estrategias terapéuticas. Estudios anteriores sugieren que las estrategias dirigidas a reducir el estrés oxidativo mediante antioxidantes son eficaces para frenar la degeneración de los conos y, en menor medida, la de los bastones.

En el presente estudio, se evaluó un enfoque terapéutico basado en nutracéuticos con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que podrían ralentizar la degeneración de la retina en ratones rd10. La formulación NUT contenía ácido fólico, vitamina B6, vitamina A, Zn, Cu y Se, luteína y zeaxantina. Algunos componentes de la formulación NUT mostraron previamente efectos beneficiosos cuando se administraron por separado. En el mercado existen dos formulaciones comerciales con dosis relativamente altas de vitamina C, E, Cu y Zn más beta-caroteno (AREDS) o luteína/zeaxantina (AREDS2) [12, 20-22], que han mostrado beneficios en pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) intermedia o tardía [23, 24]. Sin embargo, el efecto de la formulación propuesta (NUT) no se había probado aún en modelos animales o en pacientes.

A parte de la función antioxidante, la vitamina A, B6, al ácido fólico, Cu, Zn y Se tienen funciones sinérgicas con la respuesta inmunitaria. Ayudan a modular la liberación de citoquinas incluyendo TNF α , IL-6, IL-2 [25]. La vitamina A inhibe la liberación de moléculas inflamatorias por los macrófagos, induciendo la polarización de macrófagos M1 a M2. [26] El ácido fólico (vitamina B9) puede reducir la inflamación (IL-1 β y NLRP3) en un modelo de ratón de retinopatía diabética [27]. El Zn participa en el funcionamiento del sistema inmunitario innato y del adaptativo [28]. Por ejemplo, la suplementación con Zn inhibe la activación del complemento en la DMAE [29].

Varios estudios sugieren que la co-administración de dos o más suplementos dietéticos debería ser más eficaz que cada uno por separado para varias enfermedades [30-33]. En este estudio se sugiere un efecto sinérgico de los NUT que podría ofrecer ventajas, como una mayor biodisponibilidad, la protección de su función de eliminación de radicales o sus efectos biológicos [81].

En el presente estudio, los datos de la función visual (registros de ERG) mostraron que la respuesta global de la retina de los ratones rd10 estaba reducida con respecto a los ratones de control, como otros autores informaron previamente [34]. Se observó que la administración oral de la formulación NUT redujo la degeneración, el daño oxidativo y la inflamación a P18, cuando se detectaba el primer pico de degeneración de fotorreceptores [9]. Se mostró una recuperación funcional y morfológica en las retinas de los ratones rd10 + NUT.

Como se mencionó anteriormente, la formulación NUT contiene compuestos antioxidantes que mejoraron el estado redox encontrado en las retinas de los ratones rd10. El mecanismo celular mediante el cual los antioxidantes protegerían la retina de la degeneración podría ser través de la inhibición de la producción anormal de ROS, la neutralización de los radicales libres y el aumento del sistema de defensa antioxidante [35]. Se analizaron las principales enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) responsables de la defensa antioxidante, y TAC en ratones rd10 con o sin suplemento de NUT. A P18, la defensa antioxidante parecía estar reducida (SOD1 y TAC) en los ratones rd10 sin suplementación, lo que corrobora los hallazgos anteriores [9]. El estrés oxidativo es el resultado de un desequilibrio en la producción de ROS y la actividad de la maquinaria antioxidante endógena. En situaciones patológicas, las ROS se acumulan y comprometen la función celular porque inducen la alteración de macromoléculas como la fragmentación de ADN, peroxidación de lípidos, CAR, etc. En ratones rd10 la menor respuesta antioxidante se acompañó de un aumento de la peroxidación lipídica (TBARS) y de la carbonilación de proteínas. La suplementación con NUT mejoró el desequilibrio restaurando los niveles de TAC y la actividad de SOD1 reduciendo TBARS.

El estrés oxidativo y la inflamación son procesos celulares muy interconectados. En este caso, se corrobora al observar que la suplementación con NUT reducía la activación microglial (migración y morfología), la expresión de IL-6, e IL-1 β y, en menor medida, la de TNF α .

La retina es muy susceptible al estrés oxidativo. La acumulación de ROS causaría daño en el ADN que promovería la sobre-activación de PARP [36]. La suplementación con NUT disminuyó la activación de PARP, reduciendo la acumulación de polímeros de PAR en la CNE.

Es importante tener en cuenta biodisponibilidad de los compuestos nutraceuticos o de sus metabolitos activos a la hora de diseñar estudios en humanos de suplementación nutricional. En este caso, la formulación NUT fue diseñada para uso humano, y posteriormente se adaptó para su uso en ratones. El uso de nutraceuticos presenta algunas ventajas como su administración oral o su nulo efecto perjudicial cuando se toman a la dosis adecuada y bajo supervisión médica. Por último, se desconoce el efecto parcial de esta formulación sobre la función y la degeneración de la retina. Se necesitarían más estudios para abordarlo.

CONCLUSIONES:

La RP es una enfermedad genética, pero la inflamación y el estrés oxidativo parecen desempeñar una función importante en su progresión. Las estrategias terapéuticas dirigidas a reducir la inflamación y/o el estrés oxidativo podrían ayudar a preservar la visión durante más tiempo. Los nutraceuticos son compuestos naturales con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. En este estudio, se observó que la suplementación con nutraceuticos mejoraba la función y la morfología de la retina en un modelo de ratón de RP. El efecto neuroprotector iba acompañado de una mejora del estado redox y una reducción del proceso inflamatorio. Por lo tanto, el uso de esta combinación de nutraceuticos podría ser útil para futuros estudios en humanos.

REFERENCIAS:

- 1.Rivas, M.A. and E. Vecino, *Animal models and different therapies for treatment of retinitis pigmentosa*. *Histol Histopathol*, 2009. **24**(10): p. 1295-322.
- 2.Campochiaro, P.A. and T.A. Mir, *The mechanism of cone cell death in Retinitis Pigmentosa*. *Prog Retin Eye Res*, 2018. **62**: p. 24-37.
- 3.Sickel, W., *Electrical and metabolic manifestations of receptor and higher-order neuron activity in vertebrate retina*. *Adv Exp Med Biol*, 1972. **24**(0): p. 101-18.
- 4.Usui, S., et al., *NADPH oxidase plays a central role in cone cell death in retinitis pigmentosa*. *J Neurochem*, 2009. **110**(3): p. 1028-37.
- 5.Nishiguchi, K.M., et al., *Gene therapy restores vision in rd1 mice after removal of a confounding mutation in Gpr179*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 6006.
- 6.Shen, J., et al., *Oxidative damage is a potential cause of cone cell death in retinitis pigmentosa*. *J Cell Physiol*, 2005. **203**(3): p. 457-64.
- 7.Murakami, Y., et al., *MutT homolog-1 attenuates oxidative DNA damage and delays photoreceptor cell death in inherited retinal degeneration*. *Am J Pathol*, 2012. **181**(4): p. 1378-86.
- 8.Martínez-Fernández de la Cámara, C., et al., *Adalimumab Reduces Photoreceptor Cell Death in A Mouse Model of Retinal Degeneration*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 11764.
- 9.Olivares-González, L., et al., *HIF-1 α stabilization reduces retinal degeneration in a mouse model of retinitis pigmentosa*. *Faseb j*, 2018. **32**(5): p. 2438-2451.
- 10.Olivares-González, L. and S. Velasco, *Retinal Inflammation, Cell Death and Inherited Retinal Dystrophies*. 2021. **22**(4).
- 11.Valero-Vello, M. and C. Peris-Martínez, *Searching for the Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Neuroprotective Potential of Natural Food and Nutritional Supplements for Ocular Health in the Mediterranean Population*. 2021. **10**(6).
- 12.*A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8*. *Arch Ophthalmol*, 2001. **119**(10): p. 1417-36.
- 13.Alfonso-Muñoz, E.A. and R. Burggraaf-Sánchez de Las Matas, *Role of Oral Antioxidant Supplementation in the Current Management of Diabetic Retinopathy*. 2021. **22**(8).
- 14.Piano, I., et al., *A Nutraceutical Strategy to Slowing Down the Progression of Cone Death in an Animal Model of Retinitis Pigmentosa*. *Front Neurosci*, 2019. **13**: p. 461.
- 15.Tsang, J.K.W., et al., *Potential Effects of Nutraceuticals in Retinopathy of Prematurity*. 2021. **11**(2).

16. Cuervo, M., I. Abete, and E. Baladia, *Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) Para la Población Española*. 2010, Barañain, Spain.
17. Nair, A.B. and S. Jacob, *A simple practice guide for dose conversion between animals and human*. J Basic Clin Pharm, 2016. **7**(2): p. 27-31.
18. Trouillet, A., et al., *Cone degeneration is triggered by the absence of USH1 proteins but prevented by antioxidant treatments*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 1968.
19. Fernández-Sánchez, L., et al., *Safranal, a saffron constituent, attenuates retinal degeneration in P23H rats*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43074.
20. Chew, E.Y., et al., *Long-term effects of vitamins C and E, β -carotene, and zinc on age-related macular degeneration: AREDS report no. 35*. Ophthalmology, 2013. **120**(8): p. 1604-11.e4.
21. Chew, E.Y., et al., *Secondary analyses of the effects of lutein/zeaxanthin on age-related macular degeneration progression: AREDS2 report No. 3*. JAMA Ophthalmol, 2014. **132**(2): p. 142-9.
22. Evans, J., *Antioxidant supplements to prevent or slow down the progression of AMD: a systematic review and meta-analysis*. Eye (Lond), 2008. **22**(6): p. 751-60.
23. Camelo, S. and M. Latil, *Beyond AREDS Formulations, What Is Next for Intermediate Age-Related Macular Degeneration (iAMD) Treatment? Potential Benefits of Antioxidant and Anti-inflammatory Apocarotenoids as Neuroprotectors*. 2020. **2020**: p. 4984927.
24. Wong, P., et al., *Enhancing the efficacy of AREDS antioxidants in light-induced retinal degeneration*. Mol Vis, 2017. **23**: p. 718-739.
25. Gombart, A.F., A. Pierre, and S. Maggini, *A Review of Micronutrients and the Immune System-Working in Harmony to Reduce the Risk of Infection*. Nutrients, 2020. **12**(1).
26. Vellozo, N.S., et al., *All-Trans Retinoic Acid Promotes an M1- to M2-Phenotype Shift and Inhibits Macrophage-Mediated Immunity to Leishmania major*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1560.
27. Lei, X.W., et al., *The Protective Roles of Folic Acid in Preventing Diabetic Retinopathy Are Potentially Associated with Suppressions on Angiogenesis, Inflammation, and Oxidative Stress*. Ophthalmic Res, 2019. **62**(2): p. 80-92.
28. Gilbert, R., et al., *Zinc Nutrition and Inflammation in the Aging Retina*. Mol Nutr Food Res, 2019. **63**(15): p. e1801049.
29. Smalhodzic, D., et al., *Zinc supplementation inhibits complement activation in age-related macular degeneration*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e112682.
30. Santana-Gálvez, J. and J. Villela-Castrejón, *Synergistic Combinations of Curcumin, Sulforaphane, and Dihydrocaffeic Acid against Human Colon Cancer Cells*. 2020. **21**(9).

- 31.Veurink, G., G. Perry, and S.K. Singh, *Role of antioxidants and a nutrient rich diet in Alzheimer's disease*. Open Biol, 2020. **10**(6): p. 200084.
- 32.Zhang, L., et al., *Delivery of synergistic polyphenol combinations using biopolymer-based systems: Advances in physicochemical properties, stability and bioavailability*. 2020. **60**(12): p. 2083-2097.
- 33.Shi, C., et al., *Nutritional and medical food therapies for diabetic retinopathy*. 2020. **7**: p. 33.
- 34.Gargini, C., et al., *Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: a morphological and ERG study*. J Comp Neurol, 2007. **500**(2): p. 222-38.
- 35.Robles-Rivera, R.R., et al., *Adjuvant Therapies in Diabetic Retinopathy as an Early Approach to Delay Its Progression: The Importance of Oxidative Stress and Inflammation*. 2020. **2020**: p. 3096470.
- 36.Olivares-González, L., et al., *Intravitreal administration of adalimumab delays retinal degeneration in rd10 mice*. Faseb j, 2020. **34**(10): p. 13839-13861.

EL MODELO DE RATÓN CON MUTACIÓN EN PRPH2 GENERADO POR CRISPR REPRODUCE LA DISTROFIA COROIDEA AREOLAR CENTRAL

Xavier Sánchez-Sáez¹, Henar Albertos-Arranz¹, María José Ruiz-Pastor¹, Oksana Kutsyr¹, Natalia Martínez-Gil¹, Laura Fernández-Sánchez², Carla Sánchez-Castillo¹, Victoria Maneu², Pedro Lax¹, Nicolás Cuenca¹

¹ Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología,
Universidad de Alicante, España.

² Departamento de Óptica, Farmacología y Anatomía.
Universidad de Alicante, España.

Las distrofias coroideas son enfermedades oculares que conllevan un proceso degenerativo en los vasos de la coroides. Sin embargo, son mutaciones en el epitelio pigmentario de la retina (RPE del inglés: *retinal pigment epithelium*) (1) o en los fotorreceptores lo que finalmente produce los desórdenes en la coroides. Entre las distrofias coroideas se han descrito: la distrofia coroidea areolar central (CACD, del inglés: *central areolar choroidal dystrophy*), la distrofia coroidea peripapilar y la distrofia coroidea difusa (2). CACD es una distrofia retiniana hereditaria que produce una degeneración progresiva de la mácula (3). Esta patología se caracteriza por una atrofia del RPE y la coriocapilar seguido por una disminución del número de fotorreceptores maculares (4). Como consecuencia de ello, esta degeneración causa una pérdida gradual de la agudeza visual y una deficiencia en la percepción del color entre la segunda y la cuarta década de la vida (5,6). Se han descrito cuatro estadios clínicos para esta patología, el último de los cuales termina en una severa pérdida de la visión (5). La causa más frecuente de

la CACD autosómica dominante son las mutaciones en el gen PRPH2 (7). Este gen codifica para la periferina, una glicoproteína estructural que se expresa en conos y bastones y que está involucrada en la formación y mantenimiento de los discos de sus segmentos externos (8). Mutaciones en este gen presentan una gran heterogeneidad genética y fenotípica (9, 10) pero siempre cursan primero con una degeneración de los fotorreceptores (11). Se han descrito al menos cinco mutaciones diferentes en PRPH2 que producen CACD: p.Arg142Trp (12-14), p.Arg172Gln (14-17), p.Arg172Trp (11, 18-22), p.Leu307fsX83 (23) y p.Arg195Leu (24-27). Específicamente, la mutación c.584G>T, p.Arg195Leu se ha descrito solamente en tres familias en Japón (24). Alemania (25) y España (26, 27). En el caso de España, la familia proviene de Cantabria y cuenta con 58 pacientes afectados con la patología.

Para el estudio de la CACD producida por la mutación c.584G>T, p.Arg195Leu que padecen los miembros de dicha familia, se generó un modelo de ratón con la misma mutación utilizando el sistema CRISPR y se estudió el proceso degenerativo tanto del ratón con la mutación en homocigosis (Prph2^{KI/KI}) como en heterocigosis (Prph2^{KI/WT}).

Para comprobar que el modelo emula el proceso patológico de la CACD, se estudió en primer lugar la función visual de la retina en nuestro modelo de ratón utilizando el test optomotor y la electroretinografía. El test optomotor se utilizó para determinar la agudeza visual del modelo. Desde los tres meses de edad, el modelo homocigoto presentó una marcada reducción de la respuesta al test optomotor indicando una disminución de la agudeza visual. En el caso del heterocigoto, la respuesta se vio disminuida desde los seis meses de edad. La respuesta eléctrica de la retina se estudió mediante electroretinograma (ERG) en condiciones escotópicas y fotópicas. A los tres meses de edad el ratón homocigoto presentó unas respuestas ERG escotópicas y fotópicas significativamente reducidas con una menor amplitud en las ondas a y b, siendo más marcada la disminución de la onda a. A partir de los seis meses de edad, también el modelo heterocigoto presentó dicha disminución. En las respuestas ERG, la amplitud de la onda a es indicativa de la respuesta de las células fotorreceptoras de la retina, mientras que la onda b

es representativa de la respuesta de las células bipolares y de la retina interna. Por tanto, la pérdida de la respuesta funcional de la retina encontrada en este modelo de ratón con CACD parece indicar hacia una primera degeneración de los fotorreceptores, como muestra la mayor caída de la onda a en comparación con la onda b, resultados que concuerdan con la fisiopatología de esta enfermedad (11).

El estado morfológico general de la retina, así como concretamente de los fotorreceptores se evaluó en secciones de criostato usando inmunohistoquímica. A los nueve meses de edad, tanto en el modelo en homocigosis como en heterocigosis, el número de capas de fotorreceptores disminuyó y los conos presentaron una morfología alterada siendo estos de menor tamaño y presentando una pérdida progresiva de sus segmentos internos y externos y de sus axones. Además, el patrón de expresión de la rodopsina en los bastones cambió pasando de expresarse únicamente en los segmentos externos de estos a aparecer deslocalizada en el soma. Además, también se evaluó el estado estructural de las capas de la retina *in vivo* utilizando la Tomografía de Coherencia Óptica (OCT). De esta manera, a partir de los nueve meses de edad, tanto el ratón Prph2^{KI/KI} como el Prph2^{KI/WT} presentaron un grosor total de la retina reducido respecto a los controles.

Por otro lado, también se estudió la conectividad en la capa plexiforme externa de la retina mediante inmunohistoquímica utilizando combinaciones de anticuerpos contra calbindina (marcador de células horizontales) y bassoon (marcador de cintillas sinápticas) y contra PKC (marcador de células bipolares) y sinaptofisina (marcador de vesículas presinápticas) respectivamente. De este modo, se encontró una disminución del número de conexiones sinápticas entre fotorreceptores, células bipolares y células horizontales tanto en el ratón Prph2^{KI/KI} como en el Prph2^{KI/WT} a partir de los nueve meses de edad.

Por último, puesto que numerosas enfermedades de la retina que cursan con una degeneración progresiva de los fotorreceptores se acompañan con una inflamación del tejido (28), se estudió el estado inflamatorio de la retina de estos ratones mediante inmunohistoquímica con anticuerpos anti Iba1 (para

marcar la microglía y los macrófagos) y anti GFAP (para marcar los astrocitos y las células de Müller cuando se produce gliosis). En este modelo a partir de los 9 meses de edad aparece un aumento del número de células Iba1+ en comparación con los controles, así como un cambio en su localización migrando hacia la capa nuclear externa para empezar a fagocitar los fotorreceptores en degeneración. Estas células adquieren una morfología más ameboide y muy engrosada, sobre todo en el caso de las células que se encuentran en la capa de los fotorreceptores. Estos cambios morfológicos de la microglía, así como el incremento en el número y su migración hacia los fotorreceptores coincide con lo que ocurre en otros modelos de neurodegeneración retiniana (28-30). En el caso de la expresión del marcador GFAP, se observa que en los controles la expresión de esta proteína se limita a los astrocitos que se encuentran en la capa de las células ganglionares de la retina. Sin embargo, en correlación con el incremento en el estado inflamatorio de la retina marcado por el aumento de microglía, en el caso de los ratones Prph2^{KI/KI} y Prph2^{KI/WT}, se pueden apreciar las células de Müller atravesando todo el grosor de la retina, indicando que estas células se encuentran en un estado gliótico y están expresando GFAP tal y como ocurre en otros modelos de patologías de retina (28, 31). Todo esto nos indica que en Prph2^{KI/KI} y Prph2^{KI/WT} existe una neuroinflamación de la retina como respuesta a la degeneración que se produce en los fotorreceptores.

El estudio de este modelo de ratón ayudará a conocer mejor la fisiopatología de la CACD causada por esta mutación, así como de la CACD causada por cualquier otra mutación en PRPH2. A diferencia de la mutación más común en PRPH2 que produce distrofia retiniana la mutación p.Arg172Trp, actualmente no existen estudios previos que describan cómo esta mutación afecta a nivel celular en la retina (32, 33). Por lo que mediante los ratones Prph2^{KI/KI} y Prph2^{KI/WT} se podrá entender la relación entre los cambios estructurales y funcionales que se producen en la retina de estos pacientes con la presencia de esta mutación puntual en el gen PRPH2.

Como conclusión, se puede decir que el nuevo ratón Prph2 facilitará el estudio del proceso fisiopatológico de la distrofia

coroidea areolar central y permitirá desarrollar posibles estrategias terapéuticas (por ejemplo, la terapia génica o la neuroprotección) que se puedan aplicar en esta patología.

Ministerio de Ciencia e Innovación (FEDER-PID2019-106230RB-I00). Ministerio de Universidades (FPU16/04114, FPU18/02964). Instituto Carlos III (RETICS-FEDER RD16/0008/0016). Retina Asturias/Cantabria. FARPE-FUNDALUCE. Generalitat Valenciana (IDIFEDER/2017/064, ACIF/2020/203). Es Retina Asturias (2019/00286/001).

REFERENCIAS:

1. Genead, M. A.; Fishman, G.A.; Grover, S. Hereditary Choroidal Diseases. Fifth Edit. Vol. 2, Retina Fifth Edition. Elsevier Inc.; 2012. 891–898 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4557-0737-9.00043-6>
2. Sorsby, A. Choroidal angio-sclerosis with special reference to its hereditary character. *Br J Ophthalmol.* 1939; 23(7):433–44.
3. Ashton, N. Central areolar choroidal sclerosis a histo-pathological study. *Br J Ophthalmol.* 1953; 37(3):140–7.
4. Ferry, A.P.; Llovera, I; Shafer, D.M.; York, N. Central Areolar Choroidal Dystrophy. *Arch Ophthalmol.* 1972; 88:39–43.
5. Hoyng, C.B.; Deutman, A.F. The development of central areolar choroidal dystrophy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1996; 234(2):87–93.
6. Boon, C.J.F.; Klevering, B.J.; Cremers, F.P.M.; Zonneveld-Vrieling, M.N.; Theelen, T.; Den Hollander, A.I.; et al. Central Areolar Choroidal Dystrophy. *Ophthalmology.* 2009; 116(4):771-782.e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ophtha.2008.12.019>
7. Smailhodzic, D.; Fleckenstein, M.; Theelen, T.; Boon, C.J.F.; van Huet, R. A. C.; van de Ven, J. P. H.; et al. Central areolar choroidal dystrophy (CACD) and age-related macular degeneration (AMD): Differentiating characteristics in multimodal imaging. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52(12):8908–18.
8. Cheng, T.; Peachey, N. S.; Li, S.; Goto, Y.; Cao, Y.; Naash, M. I. The effect of peripherin/rds haploinsufficiency on rod and cone photoreceptors. *J Neurosci.* 1997; 17(21):8118–28.

9. Daftarian, N.; Mirrahimi, M.; Sabbaghi, H.; Moghadasi, A.; Zal, N.; Dehghan Banadaki, H.; et al. PRPH2 mutation as the cause of various clinical manifestations in a family affected with inherited retinal dystrophy. *Ophthalmic Genet* [Internet]. 2019; 40(5):436–42. Available from: <https://doi.org/10.1080/13816810.2019.1678178>
10. Matioli da Palma, M.; Martin, D.; Vallin Salles, M.; Teixeira Motta, F. L.; Abujamra, S.; Ferraz Sallum, J. M. Retinal dystrophies and variants in PRPH2. *Arq Bras Oftalmol*. 2019; 82(2):158–60.
11. Wells, J.; Wroblewski, J.; Keen, J.; Inglehearn, C.; Jubb, C.; Eckstein, A.; et al. Mutations in the human retinal degeneration slow (RDS) gene can cause either retinitis pigmentosa or macular dystrophy. *Nat Genet*. 1993; 3:213–8.
12. Hoyng, C. B.; Heutink, P.; Testers, L.; Pinckers, A.; Deutman, A.F.; Oostra, B. A. Autosomal dominant central areolar choroidal dystrophy caused by a mutation in codon 142 in the peripherin/RDS gene. *American journal of ophthalmology*. 1996; 121(6), 623-629.
13. Klevering, B. J.; Van Driel, M.; Van Hogerwou, A. J.; Van de Pol, D. J.; Deutman, A. F.; Pinckers, A. J.; et al. Central areolar choroidal dystrophy associated with dominantly inherited drusen. *British journal of ophthalmology*. 2002; 86(1), 91-96.
14. Boon, C. J.; Klevering, B. J.; Cremers, F. P.; Zonneveld-Vrieling, M. N.; Theelen, T.; Den Hollander, A. I.; Hoyng, C. B. Central areolar choroidal dystrophy. *Ophthalmology*. 2009; 116(4), 771-782.
15. Kajiwara, K.; Hahn, L. B.; Mukai, S.; Travis, G. H.; Berson, E. L.; Dryja, T. P. Mutations in the human retinal degeneration slow gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature*. 1991; 354(6353), 480-483.
16. Wroblewski, J. J.; Wells III, J. A.; Eckstein, A.; Fitzke, F.; Jubb, C.; Keen, T. J.; Bird, A. C. Macular dystrophy associated with mutations at codon 172 in the human retinal degeneration slow gene. *Ophthalmology*. 1994; 101(1), 12-22.
17. Downes, S. M.; Fitzke, F. W.; Holder, G. E.; Payne, A. M.; Bessant, D. A.; Bhattacharya, S. S.; Bird, A. C. Clinical Features of Codon 172 RDS Macular Dystrophy: Similar Phenotype in 12 Families. *Archives of Ophthalmology*. 1999; 117(10), 1373-1383.
18. Downes, S. M.; Fitzke, F. W.; Holder, G. E.; Payne, A. M.; Bessant, D. A.; Bhattacharya, S. S.; Bird, A. C. Clinical Features of Codon 172 RDS Macular Dystrophy: Similar Phenotype in 12 Families. *Archives of Ophthalmology*. 1999; 117(10), 1373-1383.
19. Wroblewski, J. J.; Wells III, J. A.; Eckstein, A.; Fitzke, F.; Jubb, C.; Keen, T. J., et al. Macular dystrophy associated with mutations at codon 172 in the human retinal degeneration slow gene. *Ophthalmology*. 1994; 101(1), 12-22.
20. Nakazawa, M.; Wada, Y.; Tamai, M. Macular dystrophy associated with monogenic Arg172Trp mutation of the peripherin/RDS gene in a Japanese family. *Retina (Philadelphia, Pa.)*. 1995; 15(6), 518-523.

21. Piguet, B.; Héon, E.; Munier, F. L.; Grounauer, P. A.; Niemyer, G.; Butler, N., et al. Full characterization of the maculopathy associated with an Arg-172-Trp mutation in the RDS/peripherin gene. *Ophthalmic genetics*. 1996; 17(4), 175-186.
22. Payne, A. M.; Downes, S. M.; Bessant, D. A.; Bird, A. C.; Bhattacharya, S. S. Founder effect, seen in the British population, of the 172 peripherin/RDS mutation-and further refinement of genetic positioning of the peripherin/RDS gene. *American journal of human genetics*. 1998, 62(1), 192.
23. Keilhauer, C. N.; Meigen, T.; Stöhr, H.; Weber, B. H. Late-onset central areolar choroidal dystrophy caused by a heterozygous frame-shift mutation affecting codon 307 of the peripherin/RDS gene. *Ophthalmic genetics*. 2006; 27(4), 139-144.
24. Yanagihashi, S.; Nakazawa, M.; Kurotaki, J.; Sato, M.; Miyagawa, Y.; Ohguro, H. Autosomal dominant central areolar choroidal dystrophy and a novel Arg195Leu mutation in the peripherin/RDS gene. *Arch Ophthalmol*. 2003; 121(10):1458-61.
25. Keilhauer, C.N.; Meigen, T.; Weber, B.H.F.F. Clinical findings in a multigeneration family with autosomal dominant central areolar choroidal dystrophy associated with an Arg195Leu mutation in the peripherin/RDS gene. *Arch Ophthalmol*. 2006; 124(7):1020-7.
26. Coco, R.M.; Tellería, J.J.; Sanabria, M.R.; Rodríguez-Rúa, E.; García, M.T. PRPH2 (Peripherin/RDS) mutations associated with different macular dystrophies in a Spanish population: A new mutation. *Eur J Ophthalmol*. 2010; 20(4):724-32.
27. Coco-Martin, R.M.; Sanchez-Tocino, H.T.; Desco, C.; Usategui-Martín, R.; Tellería, J.J. PRPH2-related retinal diseases: Broadening the clinical spectrum and describing a new mutation. *Genes (Basel)*. 2020; 11(773):1-24.
28. Cuenca, N.; Fernández-Sánchez, L.; Campello, L.; Maneu, V.; De la Villa, P.; Lax, P.; Pinilla, I. Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *Progress in retinal and eye research*. 2014; 43, 17-75.
29. Noailles, A.; Maneu, V.; Campello, L.; Gómez-Vicente, V.; Lax, P.; Cuenca, N. Persistent inflammatory state after photoreceptor loss in an animal model of retinal degeneration. *Scientific reports*. 2016; 6(1), 1-16.
30. Noailles, A.; Fernández-Sánchez, L., Lax, P., & Cuenca, N. (2014). Microglia activation in a model of retinal degeneration and TUDCA neuroprotective effects. *Journal of neuroinflammation*, 11(1), 1-15.
31. Fernández-Sánchez, L.; Lax, P.; Campello, L.; Pinilla, I.; Cuenca, N. Astrocytes and Müller cell alterations during retinal degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015; 9, 484.

32. Conley, S.; Nour, M.; Fliesler, S. J.; Naash, M. I. Late-onset cone photoreceptor degeneration induced by R172W mutation in Rds and partial rescue by gene supplementation. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007; 48(12), 5397-5407.
33. Ding, X. Q.; Nour, M.; Ritter, L. M.; Goldberg, A. F.; Fliesler, S. J.; Naash, M. I. The R172W mutation in peripherin/rds causes a cone-rod dystrophy in transgenic mice. *Human Molecular Genetics*. 2004; 13(18), 2075-2087.

EL SUEÑO COMO FACTOR DE RIESGO EN EL AVANCE DE LA MIOPIA

Isabel Fambuena Muedra, MSc^{1,2}, M^a Amparo Díez Ajenjo, PhD^{1,2}, Enrique Ordiñaga Monreal, MSc^{3,4}, Cristina Peris Martínez, MD, PhD^{1,5,6}, Fco. Javier Puertas Cuesta, MD, PhD^{7,8}

1. FISABIO Oftalmología Médica (FOM). Valencia.
2. Departamento de Óptica, Optometría y Ciencias de la Visión. Universitat de València.
3. Institut Clínic d'Oftalmologia (ICO). Hospital Clínic. Barcelona.
4. Departament d'Òptica i Optometria, Universitat Politècnica de Catalunya – BarcelonaTech, Terrasa.
5. Departamento de Cirugía (Oftalmología). Facultad de Medicina. Universitat de València.
6. Aviñó-Peris. Clínica Ocular. Valencia.
7. Unidad del Sueño. Hospital Universitario de la Ribera. Alzira, Valencia.
8. Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad Católica de Valencia.

La miopía se ha convertido en un problema de salud mundial y ha sido declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las pandemias del siglo XXI. Se estima que en la actualidad el 30% de la población mundial es miope y que para el año 2050 la miopía pueda afectar a más de 5.000 millones de personas representando cerca del 50% de la población. De estos, 1.000 millones serán miopes altos¹ (Figura 1). Pero a pesar de que la tasa más alta de miopes se da en los países asiáticos, la prevalencia va aumentando en todo el mundo, aunque no a todos los países les afectará de la misma forma.^{2,3}

La miopía se asocia con un mayor riesgo de sufrir enfermedades oculares tales como, maculopatías, desprendimiento de retina, glaucoma e incluso cataratas.⁴ Y estas patologías a su vez, pueden derivar en una discapacidad visual irreversible e incluso

ceguera.⁵ Según datos de la ONCE, la principal causa de afiliación (21%) es la miopía patológica.⁶

El incremento de sujetos miopes en la población mundial conllevará cambios en las políticas de salud pública de los países, tanto en servicios médicos como de costes económicos.⁷

Para poder desarrollar intervenciones preventivas en la población, se está investigando en conocer mejor cuáles son los principales factores de riesgo para el avance de la miopía en la población infantil y juvenil.

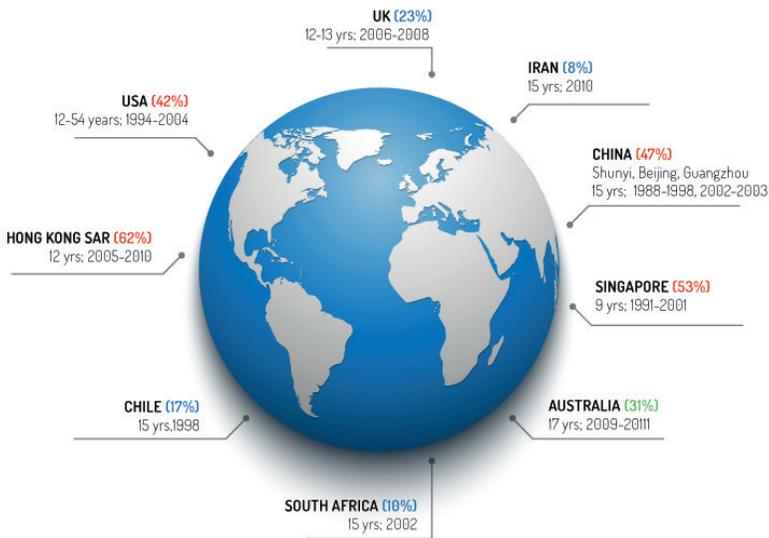


Figura 1. Prevalencia de la miopía en el mundo. Imagen extraída del International Myopia Institute <https://myopiainstitute.org/myopia/>

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la relación del patrón de sincronización de los ritmos circadianos (cronotipo), así como la calidad y duración del sueño, con el aumento del error refractivo y de la longitud axial ocular en niños y adolescentes.

Para ello, hicimos una revisión de la bibliografía científica en Pubmed y Scopus, mediante la ecuación ‘myopia AND sleep’. Se obtuvieron 143 resultados. Eliminamos duplicados y nos quedamos con 64 artículos elegibles. Tras las revisiones de los resúmenes y siguiendo los criterios de inclusión, que eran todos

aquellos estudios que evaluaran la relación entre los patrones de sueño y la miopía, finalmente se consideran 12 artículos.

Factores de riesgo

Factores genéticos

Hace más de 50 años se creía que el origen de la miopía era principalmente genético.⁸ Sin embargo, los estudios epidemiológicos a largo plazo han demostrado que la herencia genética tiene una contribución 40 veces mayor en el riesgo de sufrir miopía.⁹ Además, que existe una relación con el nivel de educación y el trabajo de cerca lo que indica que la miopía puede desarrollarse como efecto de una adaptación a las condiciones visuales ambientales a través del mismo mecanismo que produce la emetropización.^{10,11}

Etnia

La raza asiática es la que presenta una mayor incidencia de miopía en todo el mundo.¹ La menor prevalencia (por debajo del 10%) se ha encontrado en la población africana y sudamericana,¹² aunque parece ser que estos resultados son principalmente debidos a la influencia medioambiental, como es la localización geográfica.¹³

Circunstancias al nacimiento

Un bajo peso al nacer es una circunstancia que influye en el estado refractivo de los niños a la edad de 10-12 años. La prematuridad en el nacimiento se asocia con la retinopatía del prematuro que también es una causa de miopía.¹⁴ Se sugiere que también existe una relación con el mes de nacimiento: hay una mayor prevalencia de miopía en niños nacidos en verano y otoño, frente a los nacidos en invierno que puede ser debido al nivel de exposición a la luz natural durante el período perinatal.¹⁵

Género

Las mujeres muestran una progresión más rápida que los hombres, pero estos resultados se observan en el grupo de edad de 9 años.¹⁶

Rango de edad

La aparición de la miopía en edad temprana parece ser un predictor importante de miopía alta. En niños menores de 6 años

la prevalencia es baja y el mayor aumento se produce de los 7 a los 10 años.¹³

Nivel de educación y trabajo en cerca

El incremento de los niveles de educación superior a lo largo del siglo XX implica un mayor tiempo de trabajo en distancia próxima. Este hecho, puede ser una causa en el aumento de la prevalencia de la miopía.¹⁷ Estudios recientes han demostrado que, a mayor tiempo realizando actividades en distancias de trabajo menores de 20 cm, mayor es el riesgo de desarrollar miopía.¹⁸ Además, estas actividades de cerca están asociadas a su vez, a pasar más tiempo en interiores y, por tanto, a estar menos expuestos a la luz solar pudiendo desencadenar en una progresión más rápida de la miopía.¹⁹

Factores ambientales

Aspectos tan diversos como vivir en zonas rurales o urbanas, la luz o el tiempo que se pasa en actividades en el interior, son factores que se asocian a un mayor riesgo de miopía.

Tanto el país como el lugar de residencia están relacionados una mayor probabilidad de ser miope. El hecho de vivir en zonas urbanas aumenta esta probabilidad frente a aquellos que viven en zonas rurales.¹⁶

Pero hasta la fecha, el factor ambiental que más influye en la aparición de la miopía es el tiempo pasado en espacios interiores. Pasar más tiempo en lugares exteriores, expuestos a la luz natural, es efectivo para prevenir el inicio de la miopía en niños no miopes y frena el avance del crecimiento del ojo en aquellos niños que ya lo son.²⁰

Evidencia más reciente sugiere que la modulación circadiana puede ser una causa subyacente en el crecimiento ocular.^{21,22}

Sistema circadiano

En la retina poseemos un tipo de células ganglionares que son las únicas que se activan directamente con la luz, mediante el pigmento melanopsina. Se denominan células ganglionares melanopsínicas (mRGC, del inglés *melanopsinic Retinal Ganglion Cell*). Estas células reciben también señales de los conos y

bastones, a través de las células bipolares de la retina y han sido descritas como detectores de la luz ambiental, que envían la información a través de la vía retinohipotalámica al núcleo supraquiasmático (NSQ) y a la glándula pineal, para la producción de melatonina.

La dopamina y la melatonina son neuromoduladores con una función antagónica durante el ciclo luz/oscuridad. Cuando la luz está presente en la fase de oscuridad, se produce una rápida supresión de la secreción de melatonina y un incremento de la dopamina a niveles normales de la fase de luz y viceversa.^{23,24} Además, la dopamina y la melatonina son responsables de otras funciones visuales relacionadas con la variación de la intensidad lumínica. Diversos estudios han encontrado que las condiciones de luz fuera de la normalidad, pueden alterar las funciones circadianas oculares, influyendo en el desarrollo refractivo del ojo y en su crecimiento debido a los cambios en la producción de dopamina.²⁵⁻²⁷ También se han encontrado problemas de sueño en sujetos miopes, que puede ser causado por las variaciones en los niveles de melatonina.^{28,29}

Sueño

Diversos estudios han reportado relaciones entre el sueño y la miopía, tanto en relación con la higiene y el tiempo de sueño, como con el patrón circadiano.

Se han estudiado la relación entre los hábitos y calidad del sueño con la miopía, comparando sujetos miopes y no miopes mediante cuestionarios psicométricos tales como el Children's Sleep Habits Questionnaire (CSHQ), Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI), o el Morningness-Eveningness Questionnaire (MEQ) para evaluar el cronotipo, entre otros. También se han empleado distintos métodos objetivos, como la actigrafía y valores de melatonina en saliva y orina.

Las principales variables evaluadas son la hora de acostarse por la noche, la hora de levantarse por la mañana, y las horas totales de sueño. Se tienen en cuenta los factores sociales tales como si

es entre semana o no, o si son vacaciones escolares, ya que este factor influye en los valores de las variables.

Los resultados que se obtuvieron indican que en niños de 6-10 años acostarse tarde, más allá de las 21.30h, aumenta significativamente el riesgo de miopía³⁰ (Figura 2). Sin embargo, estos resultados no son significativos ni se asocian con cambios refractivos o de crecimiento del ojo en niños de hasta 3 años de edad.³¹

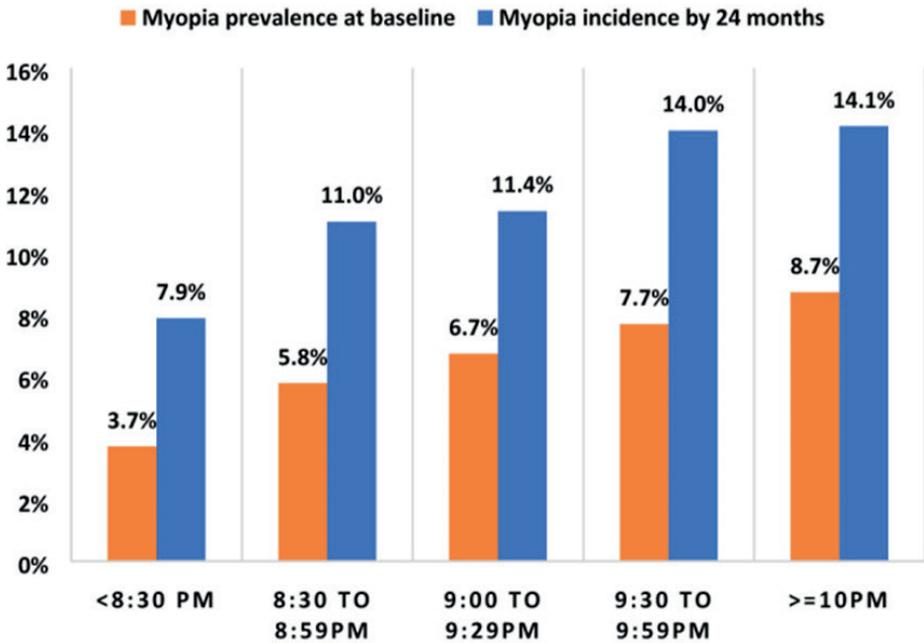


Figura 2. Prevalencia de la miopía e incidencia en 24 meses en relación con la hora de acostarse. Imagen extraída de Liu, X.N., et al (2020)³⁰

Respecto a los patrones de sueño, Chakraborty, R., et al.²⁹ analizando el nivel de melatonina en saliva, obtuvieron que los sujetos miopes presentaban un retraso en la fase del sueño de 1 hora, que tardaban más en dormirse y que dormían menos horas respecto a aquellos emétopes (Figura 3). Se obtuvo también que los miopes tenían un cronotipo más vespertino. En general, los miopes presentaban una mala calidad de sueño respecto a los sujetos emétopes.

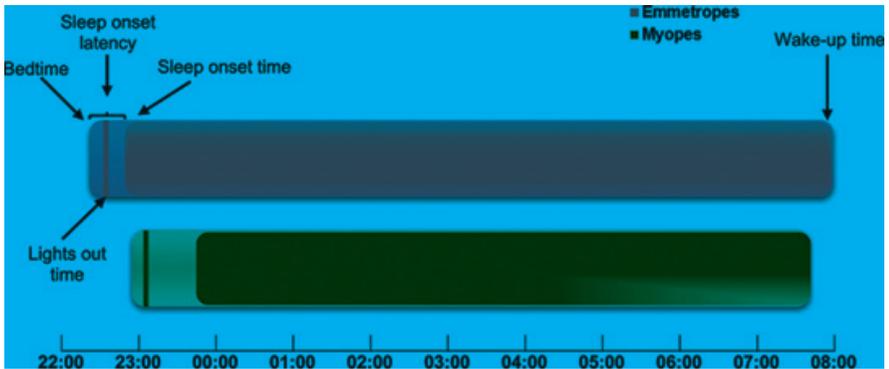


Figura 3. Patrones de sueño de sujetos miopes y emétopes. Imagen extraída de Chakraborty, R., et al. (2021)²⁹

En adolescentes asiáticos se observó que, cuanto menor era la duración del sueño, mayor era el error refractivo y esto está relacionado con la edad, ya que a mayor edad menos son las horas de sueño. El riesgo de miopía decrecía un 10% por cada hora más de sueño por encima de las 5h. Dormir más de 9h reducía la probabilidad de ser miope en un 41%, respecto a aquellos que dormían 5h o menos.³²

En general, los estudios revisados coinciden en señalar que se necesitan más estudios, sobre todo en población occidental, y a más largo plazo, para poder establecer una relación más estrecha entre alteración del sueño y riesgo de miopía.

Conclusiones

- 1. Los estudios más recientes sugieren que en la regulación del crecimiento del ojo y el desarrollo del error refractivo, la luz y otros sincronizadores externos, como pueden ser la dieta y el ejercicio físico, influyen en el reloj interno que regula los ritmos circadianos. Además, se han observado que los miopes presentan unos valores de melatonina alterados respecto a sujetos no miopes.

- 2. Los miopes presentan unos patrones de sueño alterados respecto a los emétopes.
- 3. En general, se observa que el riesgo incidencia de miopía y su progresión aumenta en sujetos miopes, debido a factores sociales, si se vive en zonas urbanas y a mayor edad de los niños.

REFERENCIAS

1. Holden BA, Fricke TR, Wilson DA, et al. (2016). Global prevalence of myopia and high myopia and temporal trends from 2000 through 2050. *Ophthalmology*, 123, 1036–1042.
2. Williams, K. M., Bertelsen, G., Cumberland, P., Wolfram, C., Verhoeven, V. J., Anastasopoulos, E., Buitendijk, G. H., Cougnard-Grégoire, A., Creuzot-Garcher, C., Erke, M. G., Hogg, R., Höhn, R., Hysi, P., Khawaja, A. P., Korobelnik, J. F., Ried, J., Vingerling, J. R., Bron, A., Dartigues, J. F., Fletcher, A. European Eye Epidemiology (E(3)) Consortium (2015). Increasing Prevalence of Myopia in Europe and the Impact of Education. *Ophthalmology*, 122(7), 1489–1497.
3. Vitale, S., Sperduto, R. D., & Ferris, F. L. (2009). Increased prevalence of myopia in the United States between 1971-1972 and 1999-2004. *Archives of ophthalmology*, 127(12), 1632-1639.
4. Flitcroft DI. (2012). The complex interactions of retinal, optical and environmental factors in myopia aetiology. *Prog Retin Eye Res.*, 31, 622–60.
5. Buch H, Vinding T, la Cour M, et al. (2004). Prevalence and causes of visual impairment and blindness among 9980 Scandinavian adults. *Ophthalmology*, 111:53–61.
6. Organización Nacional de Ciegos de España. (18 de octubre de 2021). Datos de afiliados a la ONCE. <https://www.once.es/dejanos-ayudarte/afiliacion/datos-de-afiliados-a-la-once>
7. Németh, J., Tapasztó, B., Aclimandos, W. A., Kestelyn, P., Jonas, J. B., De Faber, J.-T. H. N., Januleviciene, I., Grzybowski, A., Nagy, Z. Z., Pärssinen, O., Guggenheim, J. A., Allen, P. M., Baraas, R. C., Saunders, K. J., Flitcroft, D. I., Gray, L. S., Polling, J. R., Haarman, A. E., Tideman, J. W. L., ... Resnikoff, S. (2021). Update and guidance on management of myopia. European Society of Ophthalmology in cooperation with International Myopia Institute. *European Journal of Ophthalmology*, 31(3), 853–883.
8. Sorsby, A., Leary, G. A., & Fraser, G. R. (1966). Family studies on ocular refraction and its components. *Journal of Medical Genetics*, 3(4), 269.
9. Tedja, M. S., Haarman, A. E., Meester-Smoor, M. A., Kaprio, J., Mackey, D. A., Guggenheim, J. A., Hammond, C.J., Verhoeven, V. J.M., Claver, C.C.W., & CREAM Consortium. (2019). IMI–myopia genetics report. *Investigative ophthalmology & visual science*, 60(3), M89-M105.
10. Troilo, D., Smith, E. L., Nickla, D. L., Ashby, R., Tkatchenko, A. V., Ostrin, L. A., & Jones, L. (2019). IMI–Report on experimental models

- of emmetropization and myopia. *Investigative ophthalmology & visual science*, 60(3), M31-M88.
11. Chakraborty, R., Read, S. A., & Vincent, S. J. (2020). Understanding myopia: pathogenesis and mechanisms. In *Updates on Myopia* (pp. 65-95). Springer, Singapore.
 12. Grzybowski, A., Kanclerz, P., Tsubota, K., Lanca, C., & Saw, S. M. (2020). A review on the epidemiology of myopia in school children worldwide. *BMC ophthalmology*, 20(1), 1-11.
 13. Pärssinen, O., Soh, Z. D., Tan, C. S., Lanca, C., Kauppinen, M., & Saw, S. M. (2021). Comparison of myopic progression in Finnish and Singaporean children. *Acta Ophthalmologica*, 99(2), 171-180.
 14. O'Connor, A. R., Stephenson, T. J., Johnson, A., Tobin, M. J., Ratib, S., & Fielder, A. R. (2006). Change of refractive state and eye size in children of birth weight less than 1701 g. *British journal of ophthalmology*, 90(4), 456-460.
 15. McMahon, G., Zayats, T., Chen, Y. P., Prashar, A., Williams, C., & Guggenheim, J. A. (2009). Season of birth, daylight hours at birth, and high myopia. *Ophthalmology*, 116(3), 468-473.
 16. Rudnicka, A. R., Kapetanakis, V. V., Wathern, A. K., Logan, N. S., Gilmartin, B., Whincup, P. H., Cook, D.G., & Owen, C. G. (2016). Global variations and time trends in the prevalence of childhood myopia, a systematic review and quantitative meta-analysis: implications for aetiology and early prevention. *British Journal of Ophthalmology*, 100(7), 882-890.
 17. Huang, H. M., Chang, D. S. T., & Wu, P. C. (2015). The association between near work activities and myopia in children—a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 10(10), e0140419.
 18. Wen, L., Cao, Y., Cheng, Q., Li, X., Pan, L., Li, L., Zhu, H., Lan, W., & Yang, Z. (2020). Objectively measured near work, outdoor exposure and myopia in children. *British Journal of Ophthalmology*, 104(11), 1542-1547.
 19. French, A. N., Ashby, R. S., Morgan, I. G., & Rose, K. A. (2013). Time outdoors and the prevention of myopia. *Experimental eye research*, 114, 58-68.
 20. Williams, K. M., Bertelsen, G., Cumberland, P., Wolfram, C., Verhoeven, V. J., Anastasopoulos, E., ... & Consortium, E. E. E. E. (2015). Increasing prevalence of myopia in Europe and the impact of education. *Ophthalmology*, 122(7), 1489-1497.
 21. Besharse, J.C., McMahon, D.G. (2016). The retina and other light-sensitive ocular clocks. *J. Biol. Rhythm.*, 31 (3), 223–243.
 22. Chakraborty, R., Ostrin, L.A., Nickla, D.L., Iuvone, P.M., Pardue, M.T., Stone, R.A. (2018). Circadian rhythms, refractive development, and myopia. *Ophthalmic Physiol. Opt.*, 38 (3), 217–245.

23. Adachi, A., Nogi, T., Ebihara, S. (1998). Phase-relationship and mutual effects between circadian rhythms of ocular melatonin and dopamine in the pigeon 1, pp. 361–369.
24. Hussain, A., Gopalakrishnan, A., Muthuvel, B., Hussaindeen, J. R., Narayanasamy, A., & Sivaraman, V. (2021). Young adults with myopia have lower concentrations of neuromodulators-dopamine and melatonin in serum and tear. *Experimental Eye Research*, 209, 108684.
25. Chakraborty, R., Ostrin, L.A., Nickla, D.L., Iuvone, P.M., Pardue, M.T., Stone, R.A. (2018). Circadian rhythms, refractive development, and myopia. *Ophthalmic Physiol. Opt.*, 38 (3), 217–245.
26. Stone, R.A., McGlinn, A.M., Chakraborty, R., Lee, D.C., Yang, V., Elmasri, A., Landis, E., Shaffer, J., Iuvone, P.M., Zheng, X., Sehgal, A., Pardue, M.T. (2019). Altered ocular parameters from circadian clock gene disruptions. *PloS One*, 14 (6).
27. Stone, R. A., Pardue, M. T., Iuvone, P. M., & Khurana, T. S. (2013). Pharmacology of myopia and potential role for intrinsic retinal circadian rhythms. *Experimental eye research*, 114, 35-47.
28. Flanagan, S. C., Cobice, D., Richardson, P., Sittlington, J. J., & Saunders, K. J. (2020). Elevated melatonin levels found in young myopic adults are not attributable to a shift in circadian phase. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 61(8), 45-45.
29. Chakraborty, R., Micic, G., Thorley, L., Nissen, T. R., Lovato, N., Collins, M. J., & Lack, L. C. (2021). Myopia, or near-sightedness, is associated with delayed melatonin circadian timing and lower melatonin output in young adult humans. *Sleep*, 44(3), zsa208.
30. Liu, X. N., Naduvilath, T. J., Wang, J., Xiong, S., He, X., Xu, X., & Sankaridurg, P. R. (2020). Sleeping late is a risk factor for myopia development amongst school-aged children in China. *Scientific reports*, 10(1), 1-11.
31. Sensaki, S., Sabanayagam, C., Chua, S., Htoon, H. M., Broekman, B. F., Thiam, D. G. Y., MMed, FRCPCH., Ngo, C., MMed, FRCSEd., & Saw, S. M. (2018). Sleep duration in infants was not associated with myopia at 3 years. *The Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*, 7(2), 102-108.
32. Jee, D., Morgan, I. G., & Kim, E. C. (2016). Inverse relationship between sleep duration and myopia. *Acta ophthalmologica*, 94(3), e204-e210.

CAPÍTULO III.

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

NUEVOS ENFOQUES PARA EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE LAS DISTROFIAS HEREDITARIAS DE LA RETINA

Belén García-Bohórquez

INTRODUCCIÓN:

Las distrofias de retina (DHR) son un grupo de trastornos hereditarios caracterizados por la muerte progresiva de fotorreceptores, que se traduce en una pérdida parcial o total de la función visual. Las DHR son consideradas enfermedades raras dado que su prevalencia conjunta es de 1 cada 3000 individuos (1).

Las distintas formas de DHR se pueden clasificar en base al tipo de fotorreceptor que se ve afectado en primer lugar. Así, tenemos las distrofias de conos (DC) en las que los conos son los que se ven afectados inicialmente extendiéndose posteriormente a los bastones, las distrofias de bastones (DB) en las que ocurre lo contrario que en las anteriores y las distrofias de conos y bastones (DCB), estas últimas caracterizadas por la muerte simultánea de ambos fotorreceptores. Además, aunque en un 70-80% de los casos las DHR se manifiestan de forma aislada, existen alrededor de 30 formas sindrómicas en las que las DHR asocian afectación de otros órganos (2).

Tanto las manifestaciones clínicas como las causas genéticas de las DHR presentan una alta heterogeneidad. Hasta la fecha se han descrito 280 genes asociados tanto a formas sindrómicas como no sindrómicas de DHR (Retnet, <https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm#A-genes>, octubre 2021), pudiendo un mismo gen ser la causa de varias entidades clínicas. Asimismo, la complejidad del diagnóstico se ve incrementada por una gran variabilidad clínica inter e intrafamiliar, penetrancia incompleta, e incluso casos de isodisomía uniparental (3). Por otra parte, las

DHR pueden seguir modos de herencia autosómico recesivo, autosómico dominante, ligado al X, mitocondrial, e incluso otros menos comunes (2,4–7). Además, en un 50% de casos las variantes aparecen *de novo*, dificultando así la determinación del patrón de herencia y el diagnóstico genético.

Sin embargo, a pesar de la complejidad de las DHR, el porcentaje actual de diagnóstico alcanza valores del 50-70%, principalmente gracias al uso de la secuenciación de nueva generación (8–10)we present findings from a cohort of 722 individuals with inherited retinal disease, who have had whole-genome sequencing (n = 605.

Para el estudio genético de las DHR actualmente se emplean diferentes técnicas como la secuenciación de paneles de genes de diseño propio, la secuenciación de exomas completos (WES) e incluso la secuenciación de genomas completos (WGS). Todas estas aproximaciones permiten obtener un diagnóstico genético temprano, imprescindible para proporcionar consejo genético a las familias, y continuar investigando en la caracterización genética de las DHR con el fin de comprender la etiología de estos trastornos y desarrollar futuras terapias.

En el presente estudio se analizaron 267 pacientes diagnosticados clínicamente de algún tipo de DHR. Se persiguieron dos objetivos principales, por un lado, hallar el diagnóstico genético de cada paciente para que pueda acceder a un adecuado consejo genético y, por otro lado, contribuir al conocimiento global de las DHR con la caracterización de nuevas variantes identificadas y la evaluación de su patogenicidad.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Selección de la cohorte

Se seleccionaron 267 pacientes diagnosticados clínicamente de DHR. La extracción de DNA genómico se realizó a partir de sangre periférica mediante el extractor automático QIASymphony (QIAGEN). Todos los pacientes se sometieron a un examen oftalmológico, rellenaron un cuestionario clínico relativo a las características de su DHR y firmaron el correspondiente

consentimiento informado. El comité ético del Hospital de La Fe aprobó el presente estudio, que se guía por los principios de la Declaración de Helsinki.

Paneles de genes y secuenciación de la librería

Para el presente estudio se siguieron 2 estrategias de estudio diferentes. La mayoría de pacientes (224) fueron analizados mediante la secuenciación de un panel que incluía 117 genes relacionados con DHR tanto sindrómicas como no sindrómicas, y sus regiones flanqueantes (+/-25 pares de bases) (10). Además, este primer panel incluía 5 regiones intrónicas de los genes *ABCA4*, *OFD1*, *USH2A*, *CEP290* y *PRPF31*, en las que se localizan variantes patogénicas descritas previamente (11–15) mutations in eight genes have been described, which together account for 45% of LCA cases. We localized the genetic defect in a consanguineous LCA-affected family from Quebec and identified a splice defect in a gene encoding a centrosomal protein (CEP290. Los 43 pacientes restantes fueron analizados con un panel actualizado de 114 genes y sus regiones flanqueantes y, además de todas las regiones intrónicas profundas ya incluidas en el primer diseño, se añadieron aquellas en los genes *ABCA4* y *USH2A* que se habían descrito posteriormente .

Las librerías de pacientes se prepararon de acuerdo con el protocolo SureSelect QXT (Agilent Technologies) y se secuenciaron en la plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, CA) mediante 300 ciclos con lecturas 2x150 pares de bases.

Análisis de datos

Se empleó el programa *Alissa* (Agilent Technologies) para el alineamiento frente al genoma de referencia, el *variant calling* y la anotación de todas las variantes identificadas. Estas variantes se filtraron en base a una MAF (*minor allele frequency*) menor o igual a 0,01 en función de bases de datos poblacionales como ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>) y gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>). Tras el filtrado, la patogenicidad de las variantes detectadas se analizó con las bases de datos

ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), *Locus Specific Data Base* (https://grenada.lumc.nl/LSDb_list/lstdbs) y *HGMD professional* (<https://portal.biobase-international.com/cgi-bin/portal/login.cgi>). En el caso de las variantes novedades, que se describieron por primera vez en este estudio, se determinó su patogenicidad mediante el uso de predictores *in silico* incluidos en Varsome (<https://varsome.com/>). Finalmente se evaluó el posible impacto de las variantes en los mecanismos de splicing mediante predictores como HSF (*Human SplicingFinder*; <http://www.umd.be/HSF>), NNSplice (https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) y SpliceAI (<https://mobidetails.iurc.montp.inserm.fr/MD/>). Por otro lado, el visualizador IGV (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>) permitió revisar las secuencias, así como la profundidad y homogeneidad en la cobertura.

Estudio de CNVs

La herramienta bioinformática DECoN 1.0.2 nos permitió analizar los grandes reordenamientos (16) throughput and affordability of gene testing. Identifying whole exon deletions or duplications (termed exon copy number variants, 'exon CNVs'. Los cambios en el número de copias detectados (CVNs) se validaron mediante MLPA en los genes *USH2A* (SALSA P361 y P362), *ABCA4* (SALSA P151 y P152) y *CRB1* (SALSA P221) (<https://www.mrcholland.com/>).

Validación de resultados y estudios de segregación

Las variantes candidatas identificadas en cada paciente se validaron mediante secuenciación Sanger (BigDye Terminator v1.1 o v3.1, Applied Biosystems by Life Technologies). En aquellos pacientes estudiados con el primer panel en los que se encontró solo una variante causante en los genes *ABCA4* y/o *USH2A*, con patrón de herencia autosómica recesiva, se completó el estudio mediante la secuenciación Sanger de las mutaciones en todas las regiones intrónicas profundas previamente descritas (14,15,17–23). Este paso adicional no fue necesario en los pacientes analizados mediante el segundo panel dado que todas estas regiones intrónicas se incluían en el mismo.

Además, en aquellos casos en los que se disponía de ADN de familiares del paciente se realizaron estudios de segregación familiar de las variantes identificadas.

RESULTADOS:

En este estudio se secuenciaron 267 pacientes, pertenecientes a 222 familias independientes, previamente diagnosticados clínicamente de algún tipo de DHR. Del total de pacientes se resolvieron 173 casos de 133 familias diferentes (64,8%) al encontrarse la causa genética de la enfermedad. En 31 de los pacientes (11,6%) se encontró solo una de las mutaciones causantes en genes con una herencia autosómica recesiva, y por lo tanto su resolución es parcial dado que estas variantes no explican por sí solas la enfermedad. En los 63 pacientes restantes (23,6%) no se encontró ninguna variante patogénica o probablemente patogénica, considerándose casos no resueltos.

En total se identificaron 317 variantes de las cuales 96 son variantes novedales, al ser descritas por primera vez en este estudio (ver tablas 1 y 2). La naturaleza de las 317 variantes es bastante heterogénea: el 51,1% daban lugar a un cambio de aminoácido (*missense*), el 19,9% generaban cambio en la pauta de lectura que posteriormente crearía un codón de *stop* en la secuencia proteica (*frameshift*), el 13,3% producía un codón de *stop* prematuro (*nonsense*), el 10,1% eran mutaciones que afectan al *splicing*, el 4,7% CNV, el 0,6% sinónimas y el 0,3% deleciones que no alteran la pauta de lectura (ver figura 2). Las variantes novedales también presentan una alta heterogeneidad: el 28,1% son *missense*, el 22,9% *frameshift*, un 18,8% de *splicing*, el 14,6% *nonsense*, el 13,5% de CNV, un 1% son sinónimas, y el restante 1% son deleciones que no alteran la pauta de lectura. Se identificaron variantes en un total de 56 genes diferentes (ver figura 3). Tanto en los casos resueltos como en los no concluyentes, se observó una mayor prevalencia de los genes *ABCA4* y *USH2A* (ver figura 3). En los 167 pacientes resueltos, se identificaron 50 mutaciones diferentes en *ABCA4* y 24 en el gen *USH2A*.

Respecto al estudio de las variantes intrónicas profundas, se detectaron 3 variantes patogénicas causantes de enfermedad, dos en *ABCA4* y otra en homocigosis en *CEP290* (ver tabla 1).

El análisis de grandes reordenamientos mediante MLPA no permitió identificar ningún cambio. Sin embargo, el análisis de CNVs reveló una delección del exón 10 del gen *PROM1* en homocigosis en el paciente RPN-709, que fue posteriormente validada. El paciente había sido diagnosticado clínicamente de retinosis pigmentaria (RP) y, considerando que el gen *PROM1* sigue una herencia autosómica recesiva en estos casos, el caso quedó resuelto.

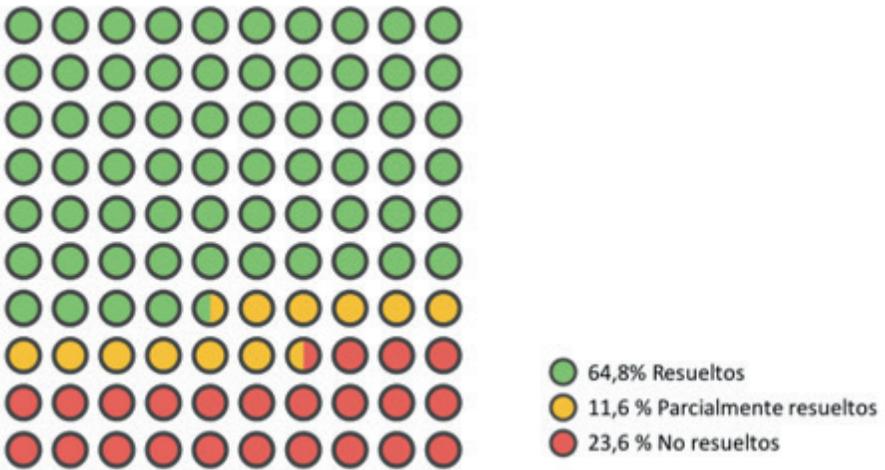


Figura 1. Porcentaje de pacientes en base al resultado del estudio. En verde porcentaje de casos resueltos, en amarillo porcentaje de casos no concluyentes o parcialmente resueltos y en rojo casos no resueltos.

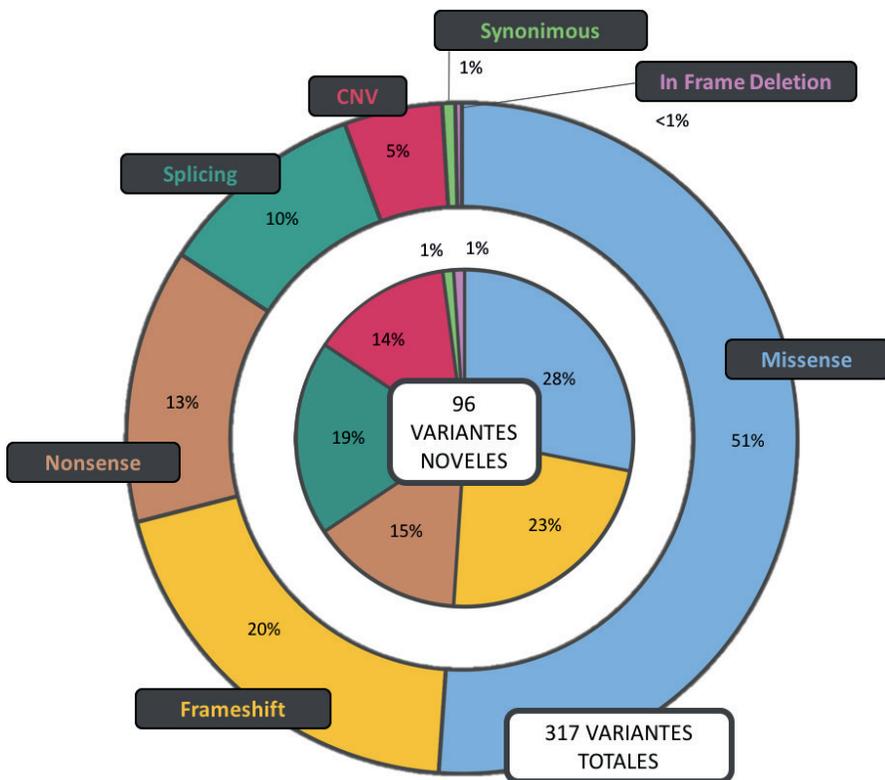


Figura 2. Porcentaje de los tipos de variantes identificadas El gráfico muestra los porcentajes tanto de variantes que habían sido previamente identificadas como de variantes noveles.

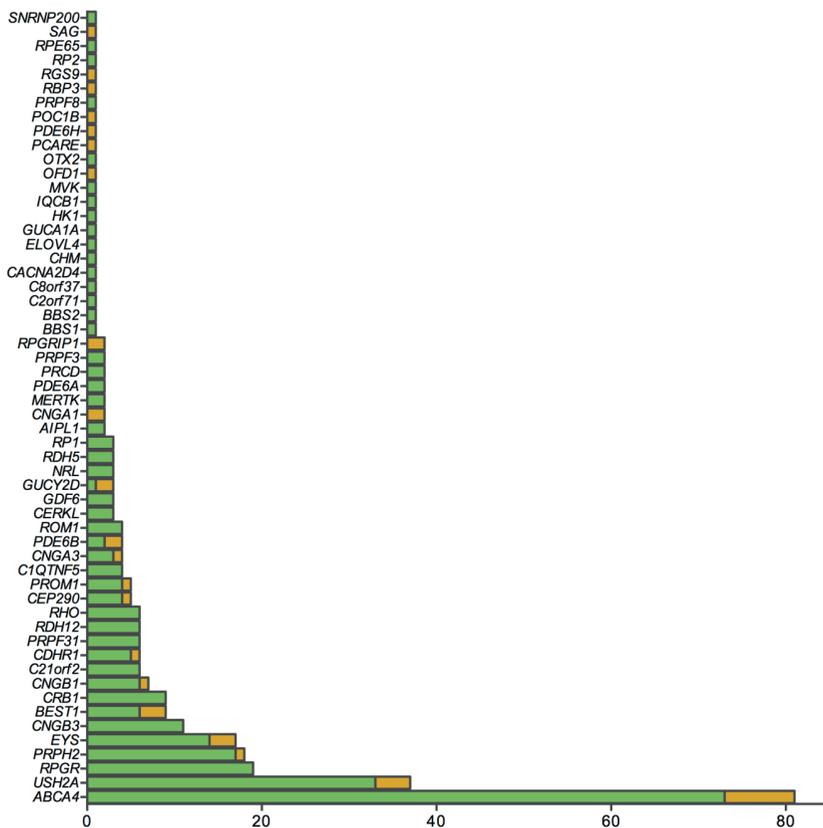


Figura 3. Número de casos en los que se ha visto implicado cada gen.

Tabla 1. Mutaciones identificadas en los pacientes resueltos.

PACIENTE	FAMILIA	DIAGNÓSTICO	GEN	cDNA	PROTEÍNA	ESTADO
RP-434	X1	RP	ROM1	Duplicación gen	p.?	Het
RP-455	FRPN-68	RP	<i>USH2A</i>	c.2276G>T	p.(Cys759Phe)	Het
			<i>USH2A</i>	c.130G>A	p.(Gly44Arg)	Het
RP-506	X2	RP	C8orf37	c.470+1G>A	p.?	Hom
RP-543	X3	RP	<i>PROM1</i>	c.1354dup	p.(Tyr452Leufs*13)	Hom
RP-545	X3	RP	<i>PROM1</i>	c.1354dup	p.(Tyr452Leufs*13)	Hom
RP-547	X3	RP	<i>PROM1</i>	c.1354dup	p.(Tyr452Leufs*13)	Hom
RPN-26	FRPN-8	RP	RPGR	c.1506+1G>A	p.?	Het
RPN-27	FRPN-8	RP	RPGR	c.1506+1G>A	p.?	Het
RPN-60	FRPN-8	RP	RPGR	c.1506+1G>A	p.?	Het
RPN-104	FRPN-38	ACL	<i>AIP1</i>	c.97_104dup	p.(Phe35Leufs*2)	Hom
			<i>IQCB1</i>	c.1518_1519del	p.(His506Clnfs*13)	Het
RPN-106	FRPN-39	STG	<i>BEST1</i>	c.602T>C	p.(Ile201Thr)	Het
			BEST1	c.637-2_637del	p.(Glu213del)	Het
RPN-113	FRPN-43	RP	<i>CERKL</i>	c.C847T	p.(Arg283*)	Hom
RPN-114	FRPN-43	RP	<i>CERKL</i>	c.C847T	p.(Arg283*)	Hom
RPN-116	FRPN-45	RP	<i>RPGR</i>	c.2357_2375del	p.(Lys786Thrfs*23)	Hem
			<i>ABCA4</i>	c.5882G>A	p.(Gly1961Glu)	Het
RPN-117	FRPN-45	RP	<i>RPGR</i>	c.2357_2375del	p.(Lys786Thrfs*23)	Hem

RPN-125	FRPN-50	STG	<i>ABCA4</i>	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.3988G>T	p.(Glu1330*)	Het
RPN-126	FRPN-50	STG	<i>ABCA4</i>	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.3988G>T	p.(Glu1330*)	Het
RPN-129	FRPN-51	STG	<i>ABCA4</i>	c.1804C>T	p.(Arg602Trp)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.982G>T	p.(Glu328*)	Het
RPN-147	FRPN-58	RP PUNCTATA ALBENSSENS	<i>C21orf2</i>	c.96+1G>A	p.?	Hom
RPN-148	FRPN-58	RP PUNCTATA ALBENSSENS	<i>C21orf2</i>	c.96+1G>A	p.?	Hom
			<i>PDE6A</i>	c.1113+1G>A	p.?	Het
RPN-170	FRPN-66	DC/DM	<i>CNGB3</i>	c.1148del	p.(Thr383Ilefs*13)	Het
			<i>CNGB3</i>	c.1432C>T	p.(Arg478*)	Het
RPN-171	FRPN-66	DC/DM	<i>CNGB3</i>	c.1148del	p.(Thr383Ilefs*13)	Het
			<i>CNGB3</i>	c.1432C>T	p.(Arg478*)	Het
RPN-173	FRPN-68	RP	<i>USH2A</i>	c.130G>A	p.(Gly44Arg)	Het
			<i>USH2A</i>	c.2276G>T	p.(Cys759Phe)	Het
			<i>CNGB3</i>	c.852+1G>C	p.?	Het
RPN-187	FRPN-71	RP	<i>RDH12</i>	c.295C>A	p.(Leu99Ile)	Het
			<i>RDH12</i>	c.806_810del	p.(Ala269Glyfs*2)	Het
			<i>GDF6</i>	c.746C>A	p.(Ala249Glu)	Het
RPN-188	FRPN-71	RP	<i>RDH12</i>	c.295C>A	p.(Leu99Ile)	Het
			<i>RDH12</i>	c.806_810del	p.(Ala269Glyfs*2)	Het
			<i>GDF6</i>	c.746C>A	p.(Ala249Glu)	Het
RPN-213	FRPN-84	RP	<i>EYS</i>	c.8834G>A	p.(Gly2945Glu)	Het
			<i>EYS</i>	c.6714del	p.(Ile2239Serfs*16)	Het
RPN-214	FRPN-84	RP	<i>EYS</i>	c.8834G>A	p.(Gly2945Glu)	Het
			<i>EYS</i>	c.6714del	p.(Ile2239Serfs*16)	Het
			<i>CRB1</i>	c.487T>G	p.(Cys163Gly)	Het
RPN-230	FRPN-97	RP	<i>RPGR</i>	c.2442_2445del	p.(Gly817Lysfs*2)	Het
			<i>C2orf71</i>	c.947del	p.(Asn316Metfs*7)	Het
			<i>CNGA3</i>	c.1280G>A	p.(Arg427His)	Het

RPN-231	FRPN-97	RP	<i>RPGR</i>	c.2442_2445del	p.(Gly817Lysfs*2)	Het
RPN-234	FRPN-100	DM	<i>C1QTNF5</i>	c.563C>T	p.(Pro188Leu)	Het
RPN-246	FRPN-99	RP	<i>RP1</i>	c.2029C>T	p.(Arg677*)	Het
RPN-253	FRPN-108	RP	<i>RHO</i>	c.316G>A	p.Gly106Arg	Het
RPN-254	FRPN-108	RP	<i>RHO</i>	c.316G>A	p.Gly106Arg	Het
RPN-256	FRPN-110	RP	<i>CNGB1</i>	c.1822G>T	p.(Glu608*)	Hom
			<i>CNGB1</i>	c.2957A>T	p.(Asn986Ile)	Het
RPN-258	FRPN-110	RP	<i>CNGB1</i>	c.1822G>T	p.(Glu608*)	Hom
			<i>CNGB1</i>	c.2957A>T	p.(Asn986Ile)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.3113C>T	p.(Ala1038Val)	Het
RPN-271	FRPN-118	RP	<i>ROM1</i>	Duplicación gen	p.?	Het
RPN-282	FRPN-125	DCB	<i>GUCY2D</i>	c.2513G>A	p.(Arg838His)	Het
RPN-283	FRPN-126	STG	<i>ABCA4</i>	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)***	Het
			<i>ABCA4</i>	c.4253+5G>A	p.(Ile1377Hisfs*3)	Het
RPN-288	FRPN-131	RP	<i>USH2A</i>	c.1390C>T	p.(Arg464Cys)	Het
			<i>USH2A</i>	c.12575G>A	p.(Arg4192His)	Het
RPN-289	FRPN-132	STG	<i>ABCA4</i>	c.184C>G	p.(Pro62Ala)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.2041C>T	p.(Arg681*)	Het
RPN-290	FRPN-133	STG	<i>ABCA4</i>	c.4457C>T	p.(Pro1486Leu)	Hom
RPN-291	FRPN-134	STG	<i>ABCA4</i>	c.2588G>C	p.(Gly863Ala)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.3311T>C	p.(Leu1104Pro)	Het
			<i>CNGB3</i>	c.1148del	p.(Thr383Ilefs*13)	Het
RPN-294	FRPN-137	STG	<i>ABCA4</i>	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)	Hom

RPN-296	FRPN-139	RP	<i>RPGR</i>	c.2296_2299del	p.(Gly766Asnfs*48)	Hem
RPN-297	FRPN-140	RP	<i>ROM1</i>	Duplicación gen	p.?	Het
RPN-301	FRPN-142	RP	<i>RPGR</i>	c.247+2T>A	p.?	Hem
RPN-304	FRPN-144	STG	<i>PRPH2</i>	c.499G>A	p.(Gly167Ser)	Het
RPN-309	FRPN-147	RP	<i>PRPF3</i>	c.1477C>T	p.(Pro493Ser)	Het
RPN-310	FRPN-147	RP	<i>PRPF3</i>	c.1477C>T	p.(Pro493Ser)	Het
RPN-313	FRPN-150	RP	<i>RDH12</i>	c.689C>G	p.(Pro230Arg)	Het
			<i>RDH12</i>	c.795C>A	p.(Ser265Arg)	Het
RPN-316	X4	RP	<i>SNRNP200</i>	c.2041C>T	p.(Arg681Cys)	Het
RPN-317	FRPN-153	STG	<i>ABCA4</i>	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)	Het
			<i>ABCA4</i>	ex 16 del	p.?	Het
			<i>ABCA4</i>	c.1804C>T	p.(Arg602Trp)	Het
RPN-323	FRPN-158	GFS	<i>RPGR</i>	c.914dup	p.(Asn305Lysfs*41)	Hem
RPN-324	FRPN-159	RP	<i>CDHR1</i>	c.1485+2T>C	p.?	Hom
RPN-327	FRPN-162	STG	<i>ABCA4</i>	c.634C>T	p.(Arg212Cys)	Hom
RPN-331	FRPN-166	DFMVA	<i>PRPH2</i>	c.356_365del	p.(Cys119Phefs*17)	Het
RPN-332	FRPN-166	DFMVA	<i>PRPH2</i>	c.356_365del	p.(Cys119Phefs*17)	Het
RPN-333	FRPN-167	DCAC	<i>CNGB3</i>	c.133G>T	p.Glu45*	Het
			<i>CNGB3</i>	c.1148del	p.Thr383Ilefs*13	Het
			<i>BBS2</i>	c.1197del	p.H399fs	Het
RPN-334	FRPN-167	DCAC	<i>CNGB3</i>	c.133G>T	p.Glu45*	Het
			<i>CNGB3</i>	c.1148del	p.Thr383Ilefs*13	Het

RPN-335	FRPN-168	RP	PRPF31	ex 10-11 del	p.?	Het
RPN-336	FRPN-169	RP	<i>USH2A</i>	c.1055C>T	p.(Thr352Ile)	Het
			<i>USH2A</i>	c.2299del	p.(Glu767Serfs*21)	Het
			<i>RP1</i>	c.2041dup	p.(Ile681Asnfs*17)	Het
RPN-342	FRPN-173	STG	<i>ABCA4</i>	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.3347C>T	p.(Ser1116Phe)	Het
RPN-343	FRPN-174	RP	RPGR	c.2746del	p.(Glu916Lysfs*173)	Hem
RPN-347	FRPN-175	RP	<i>PRPF31</i>	c.1462_1472del	p.(Lys488Argfs*75)	Het
RPN-361	FRPN-139	STG	RPGR	c.2296_2299del	p.(Gly766Asnfs*48)	Hem
RPN-363	FRPN-178	DMB	<i>BEST1</i>	c.388C>A	p.(Arg130Ser)	Het
			<i>BEST1</i>	c.602T>C	p.(Ile201Thr)	Het
RPN-374	FRPN-139	RP	RPGR	c.2296_2299del	p.(Gly766Asnfs*48)	Het
RPN-375	FRPN-139	RP	RPGR	c.2296_2299del	p.(Gly766Asnfs*48)	Hem
RPN-379	FRPN-179	DC	<i>ABCA4</i>	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.5714+1G>A	p.?	Het
RPN-402	FRPN-183	DCB	<i>C21orf2</i>	c.218G>C	p.(Arg73Pro)	Het
			<i>C21orf2</i>	c.246C>A	p.(Tyr82*)	Het
			<i>MVK</i>	c.803T>C	p.(Ile268Thr)	Het
			<i>RDH5</i>	c.839G>A	p.(Arg280His)	Het
RPN-403	FRPN-183	DCB	<i>C21orf2</i>	c.218G>C	p.(Arg73Pro)	Het
			<i>C21orf2</i>	c.246C>A	p.(Tyr82*)	Het
RPN-406	FRPN-185	FAMILIAR	<i>CDHR1</i>	c.1485+2T>C	p.?	Hom
			<i>ABCA4</i>	c.5882G>A	p.(Gly1961Glu)	Het
RPN-410	FRPN-187	DC/STGD	<i>ABCA4</i>	c.2972G>T	p.(Gly991Val)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.4253+4C>T	p.(Ile1377Hisfs*3)	Het
RPN-415	FRPN-144	DM	<i>PRPH2</i>	c.499G>A	p.(Gly167Ser)	Het

RPN-416	FRPN-144	DM	<i>PRPH2</i>	c.499G>A	p.(Gly167Ser)	Het
RPN-426	FRPN-191	DM	<i>CRB1</i>	c.481G>A	p.(Ala161Thr)	Het
			<i>CRB1</i>	c.2688T>A	p.(Cys896*)	Het
RPN-432	FRPN-194	RP	<i>PRPF8</i>	c.6902C>T	p.(Pro2301Leu)	Het
			<i>CNGA3</i>	c.1405G>A	p.(Ala469Thr)	Het
RPN-440	FRPN-97	RP	<i>RPGR</i>	c.2442_2445del	p.(Gly817Lysfs*2)	Het
RPN-442	FRPN-197	RP	<i>MERTK</i>	c.1450G>A	p.(Gly484Ser)	Hem
			<i>MERTK</i>	Delección 1,8Mb	p.?	Het
RPN-443	X5	RP	<i>EYS</i>	c.5928-2A>G	p.?	Het
			<i>EYS</i>	ex 12 del	p.?	Het
RPN-444	FRPN-198	FUNDUS ALBIPUNCTATUS	<i>RDH5</i>	c.625C>T	p.(Arg209*)	Hom
RPN-445	FRPN-199	STG	<i>ABCA4</i>	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.5882G>A	p.(Gly1961Glu)	Het
RPN-448	FRPN-202	RP	<i>USH2A</i>	c.2299del	p.(Glu767Serfs*21)	Het
			<i>USH2A</i>	c.2276G>T	p.(Cys759Phe)	Het
RPN-450	FRPN-200	RP	<i>CEP290</i>	c.508A>T	p.(Lys170*)	Hom
RPN-451	FRPN-203	RP	<i>PRCD</i>	c.74+5G>C	p.?	Het
			<i>PRCD</i>	c.102_111dup	p.(Ser38*)	Het
RPN-452	FRPN-204	RP	<i>USH2A</i>	c.1841-2A>G	p.?	Het
			<i>USH2A</i>	c.G2276T	p.(Cys759Phe)	Het
			<i>CNGB1</i>	c.801del	p.(Leu267Phefs*10)	Het
RPN-455	FRPN-202	RP	<i>USH2A</i>	c.2299del	p.(Glu767Serfs*21)	Het
			<i>USH2A</i>	c.2276G>T	p.(Cys759Phe)	Het
RPN-461	X1	RP	<i>ROM1</i>	Duplicación gen	p.?	Het

RPN-463	FRPN-206	STG	<i>ABCA4</i>	c.5882G>A	p.(Gly1961Glu)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.5917del	p.(Val1973*)	Het
RPN-475	FRPN-211	DCB	<i>CERKL</i>	c.847C>T	p.(Arg283*)	Hom
RPN-478	FRPN-212	DC	<i>ABCA4</i>	c.2568C>A	p.(Tyr856*)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.4773+1G>T	p.?	Het
RPN-481	FRPN-213	RP	<i>RP2</i>	c.352C>T	p.(Arg118Cys)	Hem
RPN-482	FRPN-214	RP	<i>USH2A</i>	c.2209C>T	p.(Arg737*)	Het
			<i>USH2A</i>	c.5329C>T	p.(Arg1777Trp)	Het
RPN-488	FRPN-174	RP	<i>RPGR</i>	c.2746del	p.(Glu916Lysfs*173)	Het
RPN-495	FRPN-217	RP	<i>CDHR1</i>	c.1485+2T>C	p.?	Hom
RPN-496	FRPN-217	RP	<i>CDHR1</i>	c.1485+2T>C	p.?	Hom
RPN-498	FRPN-217	RP	<i>CDHR1</i>	c.1485+2T>C	p.?	Hom
RPN-508	FRPN-219	STG	<i>ABCA4</i>	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.5819T>C	p.(Leu1940Pro)	Het
RPN-509	FRPN-100	DM	<i>C1QTNF5</i>	c.563C>T	p.(Pro188Leu)	Het
RPN-510	FRPN-220	DC	<i>ABCA4</i>	c.1622T>C	p.(Leu541Pro)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.3113C>T	p.(Ala1038Val)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.5882G>A	p.(Gly1961Glu)	Het
RPN-525	FRPN-224	RP	<i>USH2A</i>	c.1390C>T	p.(Arg464Cys)	Het
			<i>USH2A</i>	c.12575G>A	p.(Arg4192His)	Het
			<i>CNGA3</i>	c.1669G>A	p.(Gly557Arg)	Het
RPN-532	FRPN-38	ACL	<i>AIPL1</i>	c.97_104dup	p.(Phe35Leufs*2)	Hom
RPN-544	FRPN-51	STG	<i>ABCA4</i>	c.982G>T	p.(Glu328*)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.5882G>A	p.(Gly1961Glu)	Het

RPN-551	FRPN-226	RP	<i>USH2A</i>	c.10073G>A	p.(Cys3358Tyr)	Hom
RPN-552	FRPN-100	DM	<i>C1QTNF5</i>	c.563C>T	p.(Pro188Leu)	Het
RPN-560	FRPN-8	RP	<i>RPGR</i>	c.1506+1G>A	p.?	Het
RPN-584	FRPN-168	RP	<i>PRPF31</i>	ex, 10-11 del	p.?	Het
RPN-585	FRPN-168	RP	<i>PRPF31</i>	ex, 10-11 del	p.?	Het
RPN-587	FRPN-132	STG	<i>ABCA4</i>	c.184C>G	p.(Pro62Ala)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.2041C>T	p.(Arg681*)	Het
RPN-602	fRPN-232	RP	<i>EYS</i>	c.4120C>T	p.(Arg1374*)	Het
			<i>EYS</i>	ex 16-21 del	p.?	Het
RPN-603	fRPN-233	RP	<i>PRPF31</i>	c.1462_1472del	P.(Lys488Argfs*75)	Het
RPN-605	fRPN-235	ACL	<i>RPE65</i>	c.1022T>C	p.(Leu341Ser)	Hom
RPN-608	fRPN-238	STG	<i>PRPH2</i>	c.514C>T	p.(Arg172Trp)	Het
RPN-609	fRPN-239	STG	<i>ABCA4</i>	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.182T>C	p.(Met61Thr)	Het
RPN-640	fRPN-100	DM	<i>C1QTNF5</i>	c.563C>T	p.(Pro188Leu)	Het
RPN-646	FRPN-244	RP	<i>RHO</i>	c.328T>C	p.(Cys110Arg)	Het
RPN-649	FRPN-246	DM/STG	<i>ABCA4</i>	c.5917del	p.(Val1973*)	Hom
RPN-657	FRPN-252	STG	<i>ABCA4</i>	c.5714+1G>A	p.?	Het
			<i>ABCA4</i>	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)	Het
RPN-659	FRPN-254	RP	<i>EYS</i>	c.7736_7742del	p.(Thr2579Lysfs*36)	Hom
RPN-660	FRPN-255	RP	<i>USH2A</i>	c.4732C>T	p.(Arg1578Cys)	Het
			<i>USH2A</i>	c.1214del	p.(Asn405Ilefs*3)	Het

RPN-661	FRPN-256	RP/LCA	<i>CRB1</i>	c.2416G>T	p.(Glu806*)	Hom
RPN-663	FRPN-258	STG	<i>ABCA4</i>	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)	Hom
			<i>ABCA4</i>	c.6718A>G	p.(Thr2240Ala)	Het
RPN-666	FRPN-261	ND	<i>ABCA4</i>	c.5929G>A	p.(Gly1977Ser)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.5882G>A	p.(Gly1961Glu)	Het
RPN-668	FRPN-263	DC	<i>CRB1</i>	c.1604T>C	p.(Leu535Pro)	Het
			<i>CRB1</i>	c.2843G>A	p.(Cys948Tyr)	Het
RPN-670	FRPN-265	ND	<i>RP1</i>	c.3157del	p.(Tyr1053Thrfs*4)	Het
			<i>PRPH2</i>	c.623G>A	p.(Gly208Asp)	Het
			<i>USH2A</i>	c.6957+1G>C	p.?	Het
			<i>USH2A</i>	c.4955C>T	p.(Pro1652Leu)	Het
RPN-671	FRPN-266	RP	<i>EYS</i>	c.5928-2A>G	p.?	Hom
RPN-672	FRPN-267	RP	<i>CNGB1</i>	c.2492+2T>G	p.?	Hom
RPN-673	FRPN-268	RP	<i>USH2A</i>	c.2276G>T	p.(Cys759Phe)	Het
			<i>USH2A</i>	c.13894C>T	p.(Pro4632Ser)	Het
RPN-675	FRPN-269	RP	<i>USH2A</i>	c.4732C>T	p.(Arg1578Cys)	Het
			<i>USH2A</i>	c.12575G>A	p.(Arg4192His)	Het
RPN-679	FRPN-273	DC/STGD	<i>ABCA4</i>	c.4880del	p.(Leu1627Argfs*35)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.5714+5G>A	p.?	Het
			<i>ABCA4</i>	c.2953G>A	p.(Gly985Arg)	Het
RPN-682	FRPN-276	DM	<i>BEST1</i>	c.247G>T	p.(Val83Phe)	Het
RPN-683	FRPN-277	RP	<i>RPGR</i>	c.1366del	p.(Gln456Lysfs*20)	Hem
RPN-684	FRPN-278	RP	<i>EYS</i>	c.9468T>A	p.(Tyr3156*)	Hom
RPN-685	FRPN-279	ND	<i>PRPH2</i>	c.658C>T	p.(Arg220Trp)	Het
RPN-686	FRPN-280	RP	<i>USH2A</i>	c.12575G>A	p.(Arg4192His)	Hom

RPN-687	FRPN-281	DCB/STG	CRB1	c.481G>A	p.(Ala161Thr)	Hom
RPN-692	FRPN-284	RP PUNCTATA ALBENSSENS	ABCA4	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)	Het
			ABCA4	c.6148G>C	p.(Val2050Leu)	Het
RPN-694	FRPN-286	ND	PRPH2	c.440dup	p.(Gly148Trpfs*29)	Het
RPN-697	FRPN-289	STG	ABCA4	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)	Het
			ABCA4	c.634C>T	p.(Arg212Cys)	Het
RPN-701	FRPN-293	RP	PRPH2	c.647C>A	p.(Pro216His)	Het
RPN-702	FRPN-294	DM	<i>ELOVL4</i>	c.59A>G	p.(Asn20Ser)	Het
RPN-704	FRPN-296	DC	GUCA1A	c.66C>A	p.(Tyr22*)	Het
RPN-706	FRPN-298	DCB	CRB1	c.613_619del	p.(Ile205Aspfs*13)	Hom
			CRB1	c.2291G>A	p.(Arg764His)	Het
RPN-707	FRPN-299	RP	USH2A	c.13811+2T>G	p?	Het
			USH2A	c.2276G>T	p.(Cys759Phe)	Het
RPN-708	FRPN-300	ND	OTX2	c.638T>A	p.(Leu213*)	Het
RPN-709	FRPN-301	RP	PROM1	ex 11 del	p?	Hom
RPN-710	FRPN-302	DM	<i>PRPH2</i>	c.641G>A	p.(Cys214Tyr)	Het
RPN-711	FRPN-303	RP	USH2A	c.14803C>T	p.(Arg4935*)	Het
			USH2A	c.2332G>T	p.(Asp778Tyr)	Het
RPN-715	FRPN-307	RP	<i>RHO</i>	c.512C>A	p.(Pro171Gln)	Het
RPN-717	FRPN-308	RP	ABCA4	c.6148G>C	p.(Val2050Leu)	Het
			PRPF31	Delección gen	p?	Het
RPN-718	FRPN-309	RP	<i>USH2A</i>	c.2276G>T	p.(Cys759Phe)	Hom

RPN-721	FRPN-312	RP	<i>RHO</i>	c.512C>A	p.(Pro171Leu)	Het
RPN-725	FRPN-315	DM/STG	<i>ABCA4</i>	c.6310C>T	p.(Gln2104*)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)	Het
RPN-726	FRPN-316	RP	<i>NRL</i>	c.149C>T	p.(Ser50Leu)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.5908C>T	p.(Leu1970Phe)	Het
RPN-728	FRPN-318	JOUBERT SYNDROME	<i>CEP290</i>	c.4966_4967del	p.(Glu1656Asnfs*3)	Het
			<i>CEP290</i>	c.2817G>T	p.(Lys939Asn)	Het
RPN-730	FRPN-320	DM/STG	<i>PRPH2</i>	c.537G>A	p.(Trp179*)	Het
RPN-732	FRPN-322	RP	<i>PDE6B</i>	c.1920+1G>A	p.?	Het
			<i>PDE6B</i>	c.2470_2478del	p.(Lys824_Glu826del)	Het
RPN-733	FRPN-323	DM	<i>PRPH2</i>	c.421T>C	p.(Tyr141His)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.5908C>T	p.(Leu1970Phe)	Het
RPN-734	FRPN-324	DM/DC	<i>ABCA4</i>	c.3113C>T	p.(Ala1038Val)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.4539+2064C>T	[p.?, p.(=,Arg1514Leufs*36)]	Het
			<i>ABCA4</i>	c.1364T>A	p.(Leu455Gln)	Het
RPN-735	FRPN-325	ND	<i>EYS</i>	c.8854del	p.(Thr2973Leufs*23)	Het
			<i>EYS</i>	c.1194del	p.(Gly399Aspfs*22)	Het
			<i>RDH5</i>	c.712G>T	p.(Gly238Trp)	Het
RPN-737	FRPN-327	DM/STG	<i>PRPH2</i>	c.641G>A	p.(Cys214Tyr)	Het
RPN-738	FRPN-328	DM/STG	<i>BBS1</i>	c.1169T>G	p.(Met390Arg)	Hom
RPN-745	FRPN-335	RP	<i>RPGR</i>	c.935-2A>G	p.?	Hem
			<i>ABCA4</i>	c.5908C>T	p.(Leu1970Phe)	Het
			<i>PDE6A</i>	c.2144T>C	p.(Met715Thr)	Het
RPN-747	FRPN-337	RP	<i>RHO</i>	c.670G>A	p.(Gly224Arg)	Het

RPN-749	FRPN-339	STG	<i>ABCA4</i>	c.3386G>T	p.(Arg1129Leu)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.3210_3211dup	p.(Ser1071Cysfs*14)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.560G>A	p.(Arg187His)	Het
RPN-750	FRPN-340	ACL	<i>CEP290</i>	c.2991+1655A>G	p.(Cys998*)	Hom
RPN-769	FRPN-343	DM/ ACROMATOPSIA	<i>ABCA4</i>	c.5196+1056A>G	p.(Met1733Valfs*2)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.428C>T	p.(Pro143Leu)	Het
			<i>CACNA2D4</i>	c.2974+3G>T	p.?	Het
			<i>HK1</i>	c.27G>A	p.(Ser9Ser)	Het
RPN-770	FRPN-344	ND	<i>BEST1</i>	c.538G>A	p.Gly286Ser	Het
RPN-772	FRPN-346	DM	<i>PRPH2</i>	c.421T>C	p.(Tyr141His)	Het
			<i>NRL</i>	c.654delC	p.(Cys219Valfs*4)	Het
RPN-773	FRPN-347	ND	<i>ABCA4</i>	c.3113C>T	p.(Ala1038Val)	Het
			<i>GDF6</i>	c.746C>A	p.(Ala249Glu)	Hom
RPN-776	FRPN-350	RP	<i>EYS</i>	c.9468T>A	p.(Tyr3156*)	Hom
RPN-778	FRPN-352	RP	<i>CHM</i>	c.856C>T	p.(Gln286*)	Hem
RPN-779	FRPN-346	DM	<i>PRPH2</i>	c.421T>C	p.(Tyr141Hist)	Het
			<i>NRL</i>	c.654delC	p.(Cys219Valfs*4)	Het

Todas las mutaciones noveles identificadas en este estudio están resaltadas en negrita. Las mutaciones intrónicas profundas están resaltadas en las celdas azules. A las familias cuyo código es el apellido se les ha asignado uno nuevo representado por una "X" seguido de un número. RP: Retinosis pigmentaria; DC: Distrofia de conos; DCB: Distrofia de conos y bastones; DCAC: Distrofia corioidea areolar central; DM: Distrofia macular; DMACB: Distrofia macular anular concéntrica benigna; DFMVA: Distrofia foveomacular viteliforme del adulto; GFS: síndrome de Goldmann-Favre; STG: enfermedad de Stargardt; ACL: Amaurosis congénita de Leber; DMB: Distrofia macular de Best; ND: No disponible.

Tabla 2. Mutaciones identificadas en los pacientes con un resultado no concluyente.

PACIENTE	FAMILIA	DIAGNÓSTICO	GEN	cDNA	PROTEÍNA	ESTADO
RP-36	X6	RP	<i>PDE6B</i>	c.2408A>G	p.(Asn803Ser)	Het
RP-44	X6	RP	<i>PDE6B</i>	c.2408A>G	p.(Asn803Ser)	Het
RP-49	X7	RP	<i>GUCY2D</i>	c.1991A>G	p.(His664Arg)	Het
RP-632	X8	RP	<i>EYS</i>	ex. 32-33 del	p.?	Het
RP-645	X8	RP	<i>EYS</i>	ex. 32-33 del	p.?	Het
RP-1943	FRPN-566	RP	<i>USH2A</i>	c.2276G>T	p.(Cys759Phe)	Het
RPN-287	FRPN-130	DMB	<i>CNGA1</i>	c.304dup	p.(Arg102Lysfs*12)	Het
RPN-319	FRPN-155	RP	<i>PROM1</i>	c.1354dup	p.(Thr452Leufs*13)	Het
RPN-320	FRPN-156	DCB	<i>ABCA4</i>	c.5908C>T	p.(Leu1970Phe)	Het
			<i>PDE6H</i>	c.35C>G	p.(Ser12*)	Het
RPN-322	FRPN-157	DFMVA	<i>BEST1</i>	c.393C>A	p.(Tyr131*)	Het
RPN-326	FRPN-161	DMB	<i>BEST1</i>	c.698C>A	p.(Pro233Gln)	Het
			<i>ABCA4</i>	c.5642C>T	p.(Ala1881Val)	Het
RPN-330	FRPN-165	DFMVA	<i>ABCA4</i>	c.5882G>A	p.(Gly1961Glu)	Het
RPN-339	FRPN-170		<i>ABCA4</i>	c.5908C>T	p.(Leu1970Phe)	Het
RPN-427	FRPN-192	DCACB	<i>RGS9</i>	c.1546C>T	p.(Arg516*)	Het
RPN-466	FRPN-207	DMB	<i>BEST1</i>	c.11C>T	p.(Thr4Ile)	Het
RPN-536	FRPN-225	RP	<i>CNGA1</i>	c.1892C>T	p.(Thr631Met)	Het
			<i>CNGB1</i>	c.3150del	p.(Phe1051Leufs*12)	Het
RPN-645	FRPN-243	RP	<i>USH2A</i>	c.2276G>T	p.(Cys759Phe)	Het
			<i>CEP290</i>	c.7394_7395del	p.(Glu2465Valfs*2)	Het

RPN-678	FRPN-272	STG	<i>ABCA4</i>	c.288C>A	p.(Asn96Lys)	Het
			<i>USH2A</i>	c.754G>T	p.(Gly252Cys)	Het
RPN-691	FRPN-283	RP PUNCTATA ALBENSSENS	<i>CDHR1</i>	c.783G>A	p.(Pro261 =)	Het
			<i>POC1B</i>	c.1079_1080del	p.(Pro360Argfs*8)	Het
RPN-695	FRPN-287	ND	<i>ABCA4</i>	c.6089G>A	p.(Arg2030Gln)	Het
RPN-696	FRPN-288	ND	<i>ABCA4</i>	c.6148G>C	p.(Val2050Leu)	Het
RPN-712	FRPN-304	RP	<i>RPGRIP1</i>	c.3339+5G>C	p.?	Het
RPN-713	FRPN-305	RP	<i>SAG</i>	c.577C>T	p.(Arg193*)	Het
			<i>GUCY2D</i>	c.1991A>G	p.(His664Arg)	Het
RPN-720	FRPN-311	RP	<i>RPGRIP1</i>	c.767C>G	p.(Ser256*)	Het
RPN-722	FRPN-313	RP	<i>RBP3</i>	c.3238G>A	p.(Asp1080Asn)	Het
RPN-724	FRPN-314	RP	<i>EYS</i>	c.6882_6883del	p.(Gln2294Hisfs*3)	Het
RPN-729	FRPN-319	RP	<i>CNGA3</i>	c.673+5G>T	p.?	Het
RPN-746	FRPN-336	DM	<i>PCARE</i>	c.656_665dup	p.(Ala223Argfs*38)	Het
RPN-768	FRPN-342	RP	<i>OFD1</i>	c.2489-2A>C	p.?	Het
RPN-774	FRPN-348	RP	<i>ABCA4</i>	c.3113C>T	p.(Ala1038Val)	Het
			<i>USH2A</i>	c.8605C<A	p.(Pro2869Thr)	Het
RPN-777	FRPN-351	DC	<i>PRPH2</i>	c.568A>G	p.(Lys190Glu)	Het

Todas las mutaciones novedales identificadas en este estudio están resaltadas en negrita. A las familias cuyo código es el apellido se les ha asignado uno nuevo representado por una "X" seguido de un número. RP: Retinosis pigmentaria; DC: Distrofia de conos; DCB: Distrofia de conos y bastones; DCAC: Distrofia coroidea areolar central; DM: Distrofia macular; DMACB: Distrofia macular

anular concéntrica benigna; DFMVA: Distrofia foveomacular viteliforme del adulto; GFS: síndrome de Goldmann-Favre; STG: enfermedad de Stargardt; ACL: Amaurosis congénita de Leber; DMB: Distrofia macular de Best; ND: No dispo

DISCUSIÓN:

El presente estudio cuenta con un porcentaje de diagnóstico del 64,8%, que se encuentra dentro de la media de 50-70% obtenida en otros estudios (24–27). Teniendo en cuenta la heterogeneidad clínica de la cohorte de pacientes, el porcentaje de éxito en el diagnóstico se puede considerar alto. Si bien Birtel *et al* en 2018 (28) alcanzaron un mayor porcentaje de éxito (70%), cabe destacar que se trataba de pacientes que compartían la misma clínica relativa a RP, lo cual facilita el abordaje del estudio genético. En la literatura también encontramos casos de estudios de cohortes de clínica más heterogénea, como el de Jespersgaard *et al.* de 2019 (29), y el de Zenteno *et al.* de 2020 (24). En esos estudios se analizaron dos cohortes de 677 y 143 pacientes respectivamente, muy heterogéneas clínicamente, tal y como ocurría en nuestra cohorte. En ambos casos el porcentaje de éxito fue similar al del presente estudio. En el primer caso la secuenciación de un panel de 125 genes permitió un porcentaje de diagnóstico de 63% (29) residing in Denmark, with IRD and report 806 variants of which 187 are novel. We found that deletions and duplications spanning one or more exons can explain 3% of the cases, and thus copy number variation (CNV, mientras que en el segundo caso la secuenciación de un panel de 199 genes permitió un porcentaje de diagnóstico del 66% (24)

Los genes *ABCA4* y *USH2A* son los que más variantes patogénicas acumulan en nuestra cohorte, tanto en pacientes resueltos como en pacientes con diagnóstico no concluyente. El gen *ABCA4* es el responsable de la enfermedad de Stargardt, principalmente, y de otros tipos de distrofias de conos y bastones (30,31), mientras que *USH2A* se relaciona con el Síndrome de Usher y retinosis pigmentaria no sindrómica (3,32). Estos resultados coinciden con los resultados de otros estudios previos en los cuales ambos genes aparecen como los más mutados (29,33,34).

En muchos de los pacientes con un diagnóstico no concluyente se ha encontrado sólo una mutación en los genes *ABCA4* o *USH2A*. Según la literatura, ambos genes reúnen un alto número de mutaciones intrónicas profundas que producen la inclusión de pseudoexones e interfieren en el proceso de splicing, derivando en un efecto patogénico (13,14,16–22). En este estudio sólo se han analizado aquellas variantes intrónicas ya descritas, así que es posible que los pacientes con mutaciones en *ABCA4* o *USH2A* con un diagnóstico no concluyente presenten alteraciones localizadas en otras regiones no estudiadas como promotores o regiones UTRs.

Por otro lado, continuamente se describen nuevos genes como causantes de DHR, de manera que es posible que el resultado negativo de algunos pacientes se deba a variantes en estos nuevos genes que aún no están incluidos en los paneles estudiados. De hecho, los pacientes con una sola mutación podrían ser meros portadores de la misma, y en este caso las variantes responsables de la enfermedad podrían residir en otros genes no incluidos en los paneles o no descritos hasta la fecha.

En resumen, la secuenciación de paneles personalizados de genes es una herramienta eficaz para el diagnóstico genético de pacientes afectados de DHR. Sin embargo, la heterogeneidad genética y la implicación de regiones que no son sistemáticamente estudiadas, hace necesaria la ampliación de los estudios genéticos mediante estrategias complementarias, como pueden ser el análisis de intrones, la secuenciación del exoma completo o incluso la secuenciación del genoma completo.

REFERENCIAS:

1. Sahel JA, Marazova K, Audo I. Clinical characteristics and current therapies for inherited retinal degenerations. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(2):1–25.
2. Ayuso C, Millan JM. Retinitis pigmentosa and allied conditions today: a paradigm of translational research. *Genome Med* [Internet]. 2010;2(5):34. Available from: <http://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/gm155%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2887078&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

3. Rivolta C, Sweklo EA, Berson EL, Dryja TP. Report Missense Mutation in the USH2A Gene: Association with Recessive Retinitis Pigmentosa without Hearing Loss. *Am J Hum Genet.* 2000;66:1975–8.
4. Kajiwara K, Berson E, Dryja T. Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science* (80-) [Internet]. 1994 Jun 10;264(5165):1604–8. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.8202715>
5. Dryja TP, Hahn LB, Kajiwara K, Berson EL. Dominant and digenic mutations in the peripherin/RDS and ROM1 genes in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 1997 Sep;38(10):1972–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9331261>
6. Neveling K, den Hollander AI, Cremers FPM, Collin RWJ. Identification and Analysis of Inherited Retinal Disease Genes. In 2012. p. 3–23. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-080-9_1
7. Parmeggiani F, Sorrentino F, Ponzin D, Barbaro V, Ferrari S, Di Iorio E. Retinitis Pigmentosa: Genes and Disease Mechanisms. *Curr Genomics* [Internet]. 2011;12(4):238–49. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2029&volume=12&issue=4&spage=238>
8. Carss K, Arno G, Erwood M, Stephens J, Sanchis-Juan A, Hull S, et al. Comprehensive Rare Variant Analysis via Whole-Genome Sequencing to Determine the Molecular Pathology of Inherited Retinal Disease. *Am J Hum Genet.* 2017;100(1):75–90.
9. Sanchis-Juan A, Stephens J, French C, Gleadall N, Mégy K, Penkett C, et al. Complex Structural Variants Resolved by Short-Read and Long-Read Whole Genome Sequencing in Mendelian Disorders. *bioRxiv.* 2018;281683.
10. Rodríguez-Muñoz A, Aller E, Jaijo T, González-García E, Cabrera-Peset A, Gallego-Pinazo R, et al. Expanding the Clinical and Molecular Heterogeneity of Nonsyndromic Inherited Retinal Dystrophies. *J Mol Diagnostics* [Internet]. 2020 Apr;22(4):532–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525157820300088>
11. Den Hollander AI, Koenekoop RK, Yzer S, Lopez I, Arends ML, Voeselek KEJ, et al. Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet.* 2006;79(3):556–61.
12. Littink KW, Pott J-WR, Collin RWJ, Kroes HY, Verheij JBG, Blokland EAW, et al. A Novel Nonsense Mutation in CEP290 Induces Exon Skipping and Leads to a Relatively Mild Retinal Phenotype. *Investig Ophthalmology Vis Sci* [Internet]. 2010 Jul 1;51(7):3646. Available from: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.09-5074>
13. Webb TR, Parfitt DA, Gardner JC, Martinez A, Bevilacqua D, Davidson AE, et al. Deep intronic mutation in OFD1, identified by targeted genomic next-generation sequencing, causes a severe form of

- X-linked retinitis pigmentosa (RP23). *Hum Mol Genet* [Internet]. 2012 Aug 15;21(16):3647–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22619378>
14. Braun TA, Mullins RF, Wagner AH, Andorf JL, Johnston RM, Bakall BB, et al. Non-exonic and synonymous variants in ABCA4 are an important cause of Stargardt disease. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2013 Dec 20;22(25):5136–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23918662>
15. Vaché C, Besnard T, le Berre P, García-García G, Baux D, Larrieu L, et al. Usher syndrome type 2 caused by activation of an USH2A pseudoexon: Implications for diagnosis and therapy. *Hum Mutat*. 2012;33(1):104–8.
16. Fowler A, Mahamdallie S, Ruark E, Seal S, Ramsay E, Clarke M, et al. Accurate clinical detection of exon copy number variants in a targeted NGS panel using DECoN. *Wellcome Open Res* [Internet]. 2016 Nov 25;1:20. Available from: <https://wellcomeopenresearch.org/articles/1-20/v1>
17. Liquori A, Vaché C, Baux D, Blanchet C, Hamel C, Malcolm S, et al. Whole USH2A Gene Sequencing Identifies Several New Deep Intronic Mutations. *Hum Mutat* [Internet]. 2016 Feb;37(2):184–93. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.22926>
18. Baux D, Vaché C, Blanchet C, Willems M, Baudoin C, Moclyn M, et al. Combined genetic approaches yield a 48% diagnostic rate in a large cohort of French hearing-impaired patients. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 1;7(1):16783. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-16846-9>
19. Zernant J, Xie YA, Ayuso C, Riveiro-Alvarez R, Lopez-Martinez M-A, Simonelli F, et al. Analysis of the ABCA4 genomic locus in Stargardt disease. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2014 Dec 20;23(25):6797–806. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25082829>
20. Bauwens M, De Zaeytijd J, Weisschuh N, Kohl S, Meire F, Dahan K, et al. An Augmented ABCA4 Screen Targeting Noncoding Regions Reveals a Deep Intronic Founder Variant in Belgian Stargardt Patients. *Hum Mutat* [Internet]. 2015 Jan;36(1):39–42. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.22716>
21. Khan M, Cornelis SS, Khan MI, Elmelik D, Manders E, Bakker S, et al. Cost-effective molecular inversion probe-based ABCA4 sequencing reveals deep-intronic variants in Stargardt disease. *Hum Mutat*. 2019;40(10):1749–59.
22. Fadaie Z, Khan M, Del Pozo-Valero M, Cornelis SS, Ayuso C, Cremers FPM, et al. Identification of splice defects due to noncanonical splice site or deep-intronic variants in ABCA4. *Hum Mutat* [Internet]. 2019;40(12):2365–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31397521>
23. Sangermano R, Garanto A, Khan M, Runhart EH, Bauwens M, Bax NM, et al. Deep-intronic ABCA4 variants explain missing heritability in

Stargardt disease and allow correction of splice defects by antisense oligonucleotides. *Genet Med* [Internet]. 2019;21(8):1751–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41436-018-0414-9>

24.Zenteno JC, García-Montaña LA, Cruz-Aguilar M, Ronquillo J, Rodas-Serrano A, Aguilar-Castul L, et al. Extensive genic and allelic heterogeneity underlying inherited retinal dystrophies in Mexican patients molecularly analyzed by next-generation sequencing. *Mol Genet Genomic Med*. 2020;8(1):1–17.

25.Di Resta C, Spiga I, Presi S, Merella S, Pipitone GB, Manitto MP, et al. Integration of multigene panels for the diagnosis of hereditary retinal disorders using Next Generation Sequencing and bioinformatics approaches. *Electron J Int Fed Clin Chem Lab Med*. 2018;29(1):15–25.

26.Wang L, Zhang J, Chen N, Wang L, Zhang F, Ma Z, et al. Application of whole exome and targeted panel sequencing in the clinical molecular diagnosis of 319 Chinese families with inherited retinal dystrophy and comparison study. *Genes (Basel)*. 2018;9(7):1–11.

27.Ellingford JM, Barton S, Bhaskar S, O’Sullivan J, Williams SG, Lamb JA, et al. Molecular findings from 537 individuals with inherited retinal disease. *J Med Genet*. 2016;53(11):761–7.

28.Birtel J, Gliem M, Mangold E, Müller PL, Holz FG, Neuhaus C, et al. Next-generation sequencing identifies unexpected genotype-phenotype correlations in patients with retinitis pigmentosa. *PLoS One*. 2018;13(12):1–18.

29.Jespersgaard C, Fang M, Bertelsen M, Dang X, Jensen H, Chen Y, et al. Molecular genetic analysis using targeted NGS analysis of 677 individuals with retinal dystrophy. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–7.

30. Allikmets R, Singh N, Sun H, Shroyer NF, Hutchinson A, Chidambaram A, et al. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Starqardt macular dystrophy. *Nat Genet* [Internet]. 1997 Mar 1;15(3):236–46. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ng0397-236>

31.Maugeri A, Klevering BJ, Rohrschneider K, Blankenagel A, Brunner HG, Deutman AF, et al. Mutations in the ABCA4 (ABCR) Gene Are the Major Cause of Autosomal Recessive Cone-Rod Dystrophy. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2000 Oct;67(4):960–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000292970763287X>

32.Eudy JD, Weston MD, Yao S, Hoover DM, Rehm HL, Ma-Edmonds M, et al. Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type IIa. *Science* [Internet]. 1998 Jun 12;280(5370):1753–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9624053>

33.Ezquerria-Inchausti M, Anasagasti A, Barandika O, Garai-Aramburu G, Galdós M, López de Munain A, et al. A new approach based on targeted pooled DNA sequencing identifies novel mutations in patients with Inherited Retinal Dystrophies. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–12.

34. Bernardis I, Chiesi L, Tenedini E, Artuso L, Percesepe A, Artusi V, et al. Unravelling the Complexity of Inherited Retinal Dystrophies Molecular Testing : Added Value of Targeted Next-Generation Sequencing. 2016;2016.

CAPÍTULO IV.

LA VIDA DEL PACIENTE CON PATOLOGÍA VISUAL

VIDEOJUEGOS Y AUDIODESCRIPCIÓN: METODOLOGÍA DE UN CUESTIONARIO

María Eugenia Larreina-Morales

Universitat Autònoma de Barcelona

Los videojuegos

Los videojuegos se han convertido en todo un fenómeno cultural y económico. Se espera que los beneficios globales de la industria asciendan a 180 000 millones de dólares en 2021 (Dobrilova, 2021). En España, el 47 % de la población entre 6 y 64 años juega habitualmente, lo que se traduce en 15,9 millones de jugadores (Asociación Española de Videojuegos, 2021, p. 23). Sin embargo, es común que los videojuegos presenten una serie de barreras innecesarias que dificultan que todas las personas puedan acceder a ellos.

Yuan et al. (2010, pp. 3-4) distinguen tres tipos de barreras de accesibilidad a los videojuegos: dificultades al recibir estímulos, al determinar la respuesta a los estímulos y al proporcionar dicha respuesta a través de la interacción con el videojuego. Las personas ciegas y con baja visión pueden enfrentarse a dificultades para recibir estímulos visuales, que suelen ser predominantes en los videojuegos. Asimismo, determinar la respuesta a los estímulos puede ser complicado si, por ejemplo, el videojuego es incompatible con un lector de pantalla. Finalmente, proporcionar la respuesta puede suponer un obstáculo si no es posible reconfigurar los controles, como utilizar el teclado del ordenador en vez del ratón.

La accesibilidad a los videojuegos consiste en prevenir y eliminar dichas barreras, que generan un desajuste entre las capacidades de una persona y su interacción con el videojuego. Es responsabilidad de los agentes de la industria tener en cuenta estas cuestiones desde la fase de diseño (IGDA-GASIG, 2021b).

Con el objetivo de mejorar la accesibilidad a los videojuegos, los usuarios y la industria están impulsando grandes avances. Tres grandes organizaciones dedicadas a este fin se constituyeron hace menos de dos décadas: IGDA-GASIG en 2003, AbleGamers en 2004 y SpecialEffect en 2007. En 2012, se publicaron dos guías sobre accesibilidad a los videojuegos, elaboradas por expertos, desarrolladores y académicos: *Includification* (Barlet y Spohn, 2012) y *Game Accessibility Guidelines* (Game Accessibility Guidelines, 2012). Ambas se han convertido en referentes para la investigación (Cairns et al., 2019a) y la industria. Dos ejemplos de esta última son las opciones de accesibilidad implementadas en 2015 en PlayStation 4 (Koller, 2015) y en Xbox One (Kingett, 2015). Las dos consolas empezaron a incluir un lector de pantalla y una opción de alto contraste.

Asimismo, los videojuegos comerciales comenzaron a incorporar opciones de accesibilidad. Uno de los más influyentes fue *Uncharted 4: El desenlace del ladrón* (Naughty Dog, 2016), un triple A en el que es posible activar la ayuda de cámara, fijar al apuntar a los blancos enemigos, disponer de subtítulos y pulsar o mantener los botones del controlador según las preferencias del usuario (PlayStation, 2016). En 2020, se produjo otro gran avance con la publicación de *The Last of Us Parte II* (Naughty Dog, 2020) y sus más de sesenta opciones de accesibilidad. Cuenta con tres ajustes predefinidos de accesibilidad (visual, sonora y motora), así como la posibilidad de reasignar los controles, automatizar ciertas acciones (como cambiar de arma o apuntar a los enemigos) y obtener ayudas visuales, entre las que destacan la personalización del tamaño, color y contraste de los elementos en pantalla (PlayStation, 2020).

En cuanto a las iniciativas centradas en informar a los usuarios y la industria, destaca la GAConf, un congreso dedicado a la accesibilidad de los videojuegos. Lo organiza IGDA-GASIG y se celebra desde 2017. Es un punto de encuentro para usuarios, desarrolladores y académicos en el que se reflexiona sobre los avances recientes y los próximos pasos de la industria para que cada vez sea más inclusiva (IGDA-GASIG, 2021a).

Además, existen dos recursos importantes creados por y dirigidos a jugadores con discapacidad para informar sobre

el tema. Por un lado, la página web *Can I Play That?* publica desde 2018 reseñas y noticias en inglés sobre la accesibilidad a los videojuegos. Recientemente, ofrece talleres dirigidos a los desarrolladores de videojuegos para mejorar la práctica (Can I Play That?, 2021). Por otro lado, la recién lanzada *Accessible Games Database* (DAGERSystem, 2021) es una base de datos de videojuegos accesibles. Proporciona información sobre las opciones de accesibilidad de cada uno de ellos, la plataforma en la que están disponibles, el género y la calificación de su contenido según el sistema de clasificación estadounidense Entertainment Software Rating Board (ESRB).

Respecto a proyectos en español, la publicación *Buenas prácticas de accesibilidad en videojuegos*, editada por Pérez-Castilla Álvarez (2012), aporta recomendaciones y ejemplos de buenas prácticas. Los usuarios y expertos que participan enfatizan el valor de los videojuegos como una herramienta lúdica, pedagógica y terapéutica.

Finalmente, el proyecto *Researching Audio Description: Translation, Delivery and New Scenarios* (RAD), financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (2019-2021), investiga la audiodescripción. Uno de sus objetivos es explorar su posible aplicación a los videojuegos. En el siguiente apartado se define la audiodescripción y se presenta el proyecto RAD.

La audiodescripción

La audiodescripción (AD) es un servicio de accesibilidad que describe oralmente los elementos visuales. Su uso está extendido en el cine, las artes escénicas y los museos (CESyA, 2014). Desde 2013, las televisiones públicas deben ofrecer un mínimo de diez horas de contenido audiodescrito a la semana (Ley 7/2010, de 31 de marzo, General de la Comunicación Audiovisual, 2010).

La AD tiene un gran potencial para los videojuegos que aún está por explorar. Por un lado, se podría aplicar a las cinemáticas, es decir, las secuencias de vídeo integradas en los videojuegos que proporcionan información sobre la trama, los personajes o los escenarios. Como se trata de escenas en las que la interacción del jugador es limitada o incluso inexistente,

podrían audiodescribirse de manera similar al cine (Mangiron y Zhang, 2016, p. 92). De hecho, recientemente, los tráilers de los videojuegos han comenzado a incorporar AD. En 2021, Ubisoft ha publicado 61 vídeos audiodescritos en inglés de material promocional de *Assassin's Creed: Valhalla*, *Watch Dogs: Legion* o *Far Cry 6*, entre otros (Ubisoft North America, 2021).

Por otro lado, audiodescribir la acción de los videojuegos puede resultar más sencillo en algunos géneros que en otros. Implementar la AD en videojuegos de acción que requieren reacciones rápidas pueden suponer un gran esfuerzo de procesamiento por parte de los usuarios. Sin embargo, los videojuegos basados en texto o con una predominancia de elementos narrativos se pueden prestar a ello con más facilidad. Mangiron y Zhang (2016, p. 94) sugieren comenzar por la AD de los videojuegos de aventura y de rol, así como las novelas visuales.

Antes de explorar la aplicación práctica de la AD a los videojuegos, es necesario comprobar si los usuarios estarían interesados en esta nueva solución. Para ello, uno de los objetivos del proyecto RAD es definir las preferencias y las necesidades de las personas ciegas y con baja visión respecto a la accesibilidad a los videojuegos, incluyendo la AD. Esta consulta a los usuarios se ha realizado mediante un cuestionario en línea, cuya metodología se expone a continuación.

Cuestionario sobre videojuegos y audiodescripción

El cuestionario es un estudio de recepción transversal en el que se consulta a las personas ciegas y con baja visión sobre sus experiencias con los videojuegos. Tiene tres objetivos:

Describir las preferencias de los participantes sobre los videojuegos y su accesibilidad.

Analizar los perfiles sociodemográficos de los participantes.

Analizar la preferencia de los participantes por la posible aplicación de la audiodescripción (AD) a los videojuegos.

Los requisitos de participación, basados en el alcance del proyecto RAD, son ser una persona ciega o con baja visión, tener dieciocho años o más y residir en España. Para establecer la

muestra, se utilizó un muestreo no probabilístico de tres tipos. El primero fue un muestreo de conveniencia para la prueba piloto. La realizaron tres contactos personales de las investigadoras que cumplían con los requisitos de participación. El segundo fue un muestreo intencional: se pidió la colaboración de usuarios, expertos en accesibilidad, asociaciones, organizaciones y publicaciones que forman parte de la población estudiada o que tienen acceso a ella en la distribución del cuestionario. El tercero fue un muestreo por bola de nieve en el que se pidió a estas personas y entidades que enviaran el cuestionario a sus contactos personales o que lo publicaran en las redes sociales.

Estos métodos de muestreo son adecuados en los estudios de naturaleza exploratoria (Elorza Pérez-Tejada, 2008, p. 185). Sin embargo, excluyen a una parte de la población objetivo, en este caso, aquella sin acceso a internet o con competencias digitales limitadas (Bryman, 2012, p. 658).

Se contactó con un total de 71 personas y entidades para la distribución del cuestionario: los tres participantes de la prueba piloto, nueve asociaciones de profesionales de la accesibilidad, diez sitios web y foros sobre videojuegos y accesibilidad, quince expertos en accesibilidad y 36 asociaciones y organizaciones de personas con discapacidad visual. Veintiocho de los contactos accedieron a distribuir el cuestionario.

Se recibieron 124 respuestas durante los dos meses en los que el cuestionario estuvo abierto, a finales de 2020. Se descartaron dieciocho, porque los participantes no daban el consentimiento informado o no cumplían con los requisitos de participación. Por tanto, el número total de respuestas válidas fue 106. Se trata de un resultado positivo, si se compara con otros estudios similares. Por ejemplo, Andrade et al. (2019) recibieron diecisiete respuestas en su cuestionario en línea dirigido a personas con discapacidad visual angloparlantes sobre sus hábitos de juego. Cairns et al. (2019b) realizaron un cuestionario en línea sobre las motivaciones de las personas con discapacidad para jugar a videojuegos en Estados Unidos y recibieron veinticuatro respuestas de personas con pérdida de visión. Gonçalves et al. (2020) recibieron 140 respuestas de personas con discapacidad

visual sobre sus experiencias de juego multijugador, aunque su cuestionario estaba abierto a participantes de todo el mundo.

De los 106 participantes en el cuestionario, 58 juegan habitualmente a videojuegos y 48 no lo hacen. Los resultados sugieren que hay interés por la implementación de la AD en los videojuegos, aunque esta conclusión preliminar no puede generalizarse a toda la población por haber utilizado un muestreo no probabilístico. Sin embargo, como estudio exploratorio, revela la variedad de las preferencias de los usuarios en cuanto a los videojuegos y su accesibilidad. Los resultados completos se publicarán próximamente.

Después de completar el cuestionario, quince personas se prestaron voluntarias para participar en una entrevista sobre sus necesidades de accesibilidad a los videojuegos. En la siguiente fase de la investigación, se presentará la información recogida en el cuestionario y las entrevistas a los representantes de la industria. También se les consultará por la viabilidad técnica de incluir la AD en los videojuegos.

CONCLUSIÓN:

Las personas ciegas y con baja visión que participaron en el cuestionario manifestaron su interés por jugar a videojuegos y hacerlo con opciones de accesibilidad que se ajusten a sus preferencias. Para ello, la audiodescripción puede ser una opción efectiva, empezando por las cinemáticas y los videojuegos predominantemente narrativos (Mangiron y Zhang, 2016, p. 94). Aunque es necesario realizar estudios sobre su viabilidad técnica, el entusiasmo mostrado por los participantes en el cuestionario es señal del potencial de la audiodescripción.

Un mayor conocimiento sobre las experiencias de los usuarios, recogidas a través de estudios exploratorios como este cuestionario, puede contribuir a mejorar la accesibilidad de los videojuegos y, con ello, el acceso al ocio y la cultura de todas las personas. La integración de la accesibilidad desde que se comienza a desarrollar un producto, y no como una función adicional que se añade posteriormente, permite que un gran número de personas puedan utilizarlo sin necesidad de una

adaptación específica (Carney, 2019), sean cuales sean sus preferencias, necesidades y capacidades.

Finalmente, agradecemos a todas las personas que participaron en el cuestionario su tiempo y dedicación. La información recogida es muy valiosa para la investigación sobre la accesibilidad a los videojuegos y esperamos que contribuya a mejorarla en un futuro cercano. Asimismo, nos gustaría expresar nuestro agradecimiento a todas las personas y entidades que distribuyeron el cuestionario. Su contribución ha sido fundamental para alcanzar los objetivos del proyecto.

FINANCIACIÓN:

El proyecto Researching Audio Description: Translation, Delivery and New Scenarios está financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, la Agencia Estatal de Innovación y el European Regional Development Fund [PGC2018-096566-B-I00 (MCIU/AEI/FEDER, UE)].

TransMedia Catalonia es un grupo de investigación financiado por la Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Empresa i Coneixement de la Generalitat de Catalunya, bajo el sistema de financiación SGR (código de referencia 2017SGR113).

REFERENCIAS:

- Andrade, R., Rogerson, M. J., Waycott, J., Baker, S. y Vetere, F. (2019). Playing blind: revealing the world of gamers with visual impairment. *CHI Conference on human factors in computing systems proceedings (CHI 2019)*. Glasgow, 4-9 mayo 2019. Nueva York: ACM. DOI: <https://doi.org/10.1145/3290605.3300346>
- Asociación Española de Videojuegos (2021). *La industria del videojuego en España. Anuario 2020*. Disponible en: http://www.aevi.org.es/web/wp-content/uploads/2021/04/AEVI_Anuario_2020.pdf [Última consulta: 18 octubre 2021].
- Barlet, M. C. y Spohn, S. D. (2012). *Includification. A practical guide to game accessibility*. Disponible en: https://accessible.games/wp-content/uploads/2018/11/AbleGamers_Includification.pdf [Última consulta: 18 octubre 2021].

- Bryman, A. (2012). *Social research methods. 4th edition*. Nueva York: Oxford University Press.
- Carney, A. (2019). Accommodation versus inclusive design. *100 days of A11y*. Disponible en: <https://100daysofa11y.com/2019/12/03/accommodation-versus-inclusive-design/> [Última consulta: 18 octubre 2021].
- CESyA (2014). *Publicaciones divulgativas*. Disponible en: <https://www.cesya.es/comunicacion/publicaciones> [Última consulta: 18 octubre 2021].
- Cairns, P., Power, C., Barlet, M. y Haynes, G. (2019a). Future design of accessibility in games: a design vocabulary. *Journal of human-computing studies*, 131, 64-17.
- Cairns, P., Power, C., Barlet, M., Haynes, G., Kaufman, C. y Beeston, J. (2019b). Enabled players: the value of accessible digital games. *Games and culture*, 16(2), 262-282. DOI: <https://doi.org/10.1177/1555412019893877>
- Can I Play That? (2021). About Can I Play That? *Can I Play That?* Disponible en: <https://caniplaythat.com/about-can-i-play-that/> [Última consulta: 18 octubre 2021].
- DAGERSystem (2021). *Accessible Games Database*. Disponible en: <https://accessiblegamesdatabase.com/> [Última consulta: 18 octubre 2021].
- Dobrilova, T. (2021). How much is the gaming industry worth in 2021? *Tech Jury*. Disponible en: <https://techjury.net/blog/gaming-industry-worth/#gref> [Última consulta: 18 octubre 2021].
- Elorza Pérez-Tejada, H. (2008). *Estadística para las ciencias sociales, del comportamiento y de la salud. 3.ª edición*. Santa Fe. Cengage Learning Editores, S.A.
- Game Accessibility Guidelines (2012). *Game accessibility guidelines*. Disponible en: <http://gameaccessibilityguidelines.com/> [Última consulta: 18 octubre 2021].
- Gonçalves, D., Rodrigues, A. y Guerreiro, T. (2020). Playing with others: depicting multiplayer gaming experiences of people with visual impairments. *ASSETS '20: Proceedings of the 22nd international ACM SIGACCESS conference on computer and accessibility*. Grecia, evento virtual, 26-28 octubre 2020. Nueva York: ACM. DOI: <https://doi.org/10.1145/3373625.3418304>
- IGDA-GASIG (2021a). Conference. *GACConf*. Disponible en: <https://www.gacconf.com/conference/> [Última consulta: 18 octubre 2021].
- IGDA-GASIG (2021b). What and why. *IGDA-GASIG*. Disponible en: <https://igda-gasig.org/what-and-why/> [Última consulta: 18 octubre 2021].
- Kingett, R. (2015). Xbox One adds accessibility with screen reader and more. *Techraptor*. Disponible en: <https://techraptor.net/gaming/news/>

[xbox-one-adds-accessibility-screen-reader-and-more](#) [Última consulta: 18 octubre 2021].

Koller, J. (2015). PS4 system update 2.50 available tomorrow, features detailed. *PlayStation.Blog*. Disponible en: <https://blog.playstation.com/2015/03/25/ps4-system-update-2-50-available-tomorrow-features-detailed/> [Última consulta: 18 octubre 2021].

Ley 7/2010, de 31 de marzo, General de la Comunicación Audiovisual. (2010). *Boletín Oficial del Estado*, 79, de 1 de mayo de 2010. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2010/BOE-A-2010-5292-consolidado.pdf> [Última consulta: 18 octubre 2021].

Mangiron, C. y Zhang, X. (2016). Game accessibility for the blind: current overview and the potential application of audio description as the way forward. En A. Matamala y P. Oreo (eds.). *Researching audio description: new approaches* (pp. 75-95). Londres: Palgrave Macmillan. PlayStation (2016). *UNCHARTED 4: A thief's end - a new adventure in video game accessibility video | PS4*. Disponible en: https://www.youtube.com/watch?v=Ls_CD4mB42s [Última consulta: 18 octubre 2021].

PlayStation (2020). Opciones de accesibilidad para *The Last of Us Parte II*. *PlayStation.com*. Disponible en: <https://www.playstation.com/es-es/games/the-last-of-us-part-ii/accessibility/> [Última consulta: 18 octubre 2021].

Pérez-Castilla Álvarez, L. (ed) (2012). *Buenas prácticas de accesibilidad en videojuegos*. Madrid: Instituto de Mayores y Servicios Sociales (IMSERSO). Disponible en: http://riberdis.cedd.net/bitstream/handle/11181/3300/buenas_pr%c3%a1cticas_videojuegos.pdf?sequence=1&rd=0031543170242113 [Última consulta: 18 octubre 2021].

Ubisoft North America (2021). *Audio description trailers*. Disponible en: <https://www.youtube.com/playlist?list=PLpwyzkZhaOZ7KuyrS0PUOFpzfxcDjFlo> [Última consulta: 18 octubre 2021].

Yuan, B., Folmer, E. y Frederick, H. Jr. (2010). Game accessibility: a survey. *Universal Access in the Information Society*, 10, 1-19.

EL VALOR DEL TRABAJO SOCIAL EN LAS DISTROFIAS DE RETINA

Carmen María Gómez Navarro

Universidad de Murcia

Distrofias de retina: característica y condiciones

Las enfermedades crónicas degenerativas de la retina, las distrofias hereditarias de retina, cursan con la degeneración y muerte de las células de la retina por lo que conducen irremediabilmente a la ceguera. Debido a la baja prevalencia de las patologías retinianas las convierte en enfermedades minoritarias o raras, es decir, que afectan a menos de 1 persona por cada 2.000.

Las características destacables:

- pueden tener origen genético o ambiental, y pueden ser de carácter hereditario.
- tienen una evolución progresiva, aunque pueden permanecer estáticos por periodos de tiempo, por lo que el avance es diferente en cada persona aún teniendo la misma enfermedad.
- a pesar de su condición genética, pueden debutar en cualquier momento de la vida
- no tienen, en la gran mayoría de los casos, tratamiento paliativo ni curativo
- como consecuencia de su condición de enfermedad poco frecuente, hay gran dificultad para su diagnóstico, conllevando que se tenga que esperar hasta 5 años para conseguirlo.
- se da falta de apoyo psicosocial una vez que es diagnosticada la enfermedad ya que se enfrentan a una enfermedad progresiva y degenerativa, que no tiene cura ni tratamiento
- hay falta de información sobre servicios, derechos y recursos a los que tienen derecho debido a su nueva situación

Todas estas características, ¿cómo afecta a las personas que viven con una distrofia de retina? La enfermedad afecta en los planos físico, emocional y social. Esto es debido a que la salud se concibe como un estado de completo bienestar físico, mental y social, y no solamente como la ausencia de afecciones o enfermedades. Consiste en integrar los factores emocionales, sociales y comportamentales en la práctica médica mediante la interacción (no sumatoria) de los tres determinantes principales del estado de salud: el biológico, el psicológico y el social.

Estas enfermedades afectan a las personas en todas las esferas de su vida, tanto a nivel individual como familiar, relacional, laboral y académico. Cuando una persona tiene una DHR no solo la vive ella, sino que afecta a todas las personas con las que se rodea. En la vida familiar hay una reasignación de roles, hay un cambio en las actividades de ocio y de consumir el tiempo libre, una readaptación laboral o de los sistemas de aprendizaje.

Las personas con discapacidad se enfrentan a una situación de vulnerabilidad derivada no solamente de la complejidad clínica de la enfermedad, las disfunciones sensoriales que ésta produce (baja visión o ceguera) y la consecuente pérdida de autonomía y dependencia de terceras personas, sino también por las barreras de inclusión dentro de su entorno (tolerancia, discriminación, adaptabilidad de servicios). Es importante, igualmente, tener en cuenta que esta situación no sólo afecta a las personas afectadas, sino también al ritmo de vida personal y social de los familiares.

Además, las personas afectadas y sus familiares se enfrentan a:

- Situaciones de angustia y ansiedad tras el diagnóstico de la enfermedad con las consecuentes dificultades para asumir la enfermedad y sus consecuencias.
 - Disminución de la participación social y pasividad
 - Sensación de inutilidad y pérdida de autoestima, ante una pérdida de autonomía personal para el desarrollo las ABVD e instrumentales
 - Sobrecarga de los familiares o entorno social (cuidador o cuidadora)

Intervención sociosanitaria

La intervención con familias y pacientes con ER debe ser interdisciplinar dadas las repercusiones que tiene sobre la persona y sobre su familia.

La intervención que se plantea es una intervención integral en la que se tenga en cuenta a todos agentes que intervienen (afectados/as, familiares, profesionales sanitarios y otros profesionales), priorizando el trabajo con los/as afectados y sus familias.

Se plantean tres niveles de intervención: individual, grupal y comunitario. Se priorizará la intervención individual, que será complementada con acciones grupales y comunitarias, en función de las necesidades y recursos disponibles.

Esto significa que se puede y se debe trabajar de manera conjunta desde el sistema sanitario y el sistema social. Trabajando de forma conjunta los distintos aspectos de la enfermedad se pueden cubrir las necesidades que van surgiendo a lo largo del desarrollo de la enfermedad.

El trabajador social es un profesional que trabaja desde las instituciones sanitarias (centros de atención primaria y centros hospitalarios) cuya función es dar apoyo y ayuda a la persona y su familia que está inmerso en un proceso de dificultad de salud, y dirige su intervención en la promoción de la salud, la recuperación, normalización y adaptación social; acceso a los servicios, a los recursos y a los derechos del paciente.

La intervención con familias y pacientes debe ser interdisciplinar dadas las repercusiones que tiene sobre la persona y sobre su familia.

Los objetivos que nos marcamos los trabajadores sociales cuando estamos con personas con DHR son:

Ayudar a la familia a convivir con una enfermedad degenerativa de la retina

- Activar recursos personalizados emocionales y psicológicos a través del servicio de psicología.
- Difundir a la sociedad el impacto de las ERO para darlas a conocer y facilitar la integración.

- Intervención en todas las etapas del proceso de la enfermedad:

- Detección precoz de la enfermedad → permite intervenir para frenar la evolución de la enfermedad. Un diagnóstico temprano permite adquirir hábitos de vida más saludables para la salud visual, así que competencias de manejo personal que facilite la autonomía en posteriores etapas de la enfermedad.

- Información del Diagnóstico → la promoción de la comunicación médico-paciente-familia es un factor potenciador de la adherencia al tratamiento. Cómo se informa del diagnóstico influye en cómo se vive la enfermedad, en cómo el paciente entiende su patología y lo que puede esperar sobre su pronóstico.

- Rehabilitación → según el estadio de la enfermedad y permite educar para prevenir complicaciones. Talleres de rehabilitación visual, de manejo

Papel del trabajador social en asociaciones con personas con discapacidad visual

El profesional que hace la acogida y el acompañamiento de las personas y familias que viven con una enfermedad visual suele ser un trabajador social, que escucha y

- Servicio de información y Orientación. La información es el primer recurso en el orden secuencial que se puede establecer en el camino desde la necesidad hasta su satisfacción.

- Se ofrece información y orientación sobre aspectos clínicos de la enfermedad (pruebas específicas como: campo visual, agudeza visual, potenciales evocados, electroretinograma, O.C.T), hospitales o centros de referencia para su realización, información sobre la unidad de genética (si la hubiera) y el estudio genético.

- Asesoramiento sobre las gestiones relativas a la valoración de la discapacidad, la tramitación de la incapacidad laboral o de la situación de dependencia, entre otras.

- Derivación a recursos de empleo, a la red de recursos de personas con discapacidad, a la red de servicios para personas invidentes, etc.

- Grupos de ayuda mutua. Los GAM son un “modelo social de salud”, se desarrollan para favorecer la participación de un grupo de personas con una misma enfermedad, que busca compartir el esfuerzo y el mutuo modelo con el fin de conseguir cambios favorables hacia actitudes más positivas que permitan lidiar con el miedo, estrés o el sentimiento de soledad o de incompreensión.

- Seguimiento y evaluación del caso. Se llevará a cabo la evaluación de los objetivos marcados en el Plan Individual con el objetivo de revisarlos y marcar nuevos objetivos en caso de que fueran necesarios.

- Difusión y sensibilización. Se favorecerá la difusión de las características y consecuencias de la enfermedad a través de campañas de sensibilización. En la organización de éstas se incluye a profesionales de la entidad, socios, afectados/as, familiares y profesionales y especialistas del ámbito de la salud.

- Actividades formativas. Partiendo de la visión integral del programa se prevé la organización de conferencias dirigidas a afectados/familiares y personal sanitario (oftalmólogos, genetistas,...) para tratar temas específicos y nuevas terapias e investigaciones llevadas a cabo.

- Las principales funciones para desarrollar por los trabajadores sociales en este espacio de ejercicio profesional son, entre otras, las siguientes:

- Función de atención directa: atención a individuos o grupos que presentan o están en riesgo de presentar, problemas de índole social como consecuencia de su patología visual. Su objeto será potenciar el desarrollo de las capacidades y facultades de las personas para afrontar por sí mismas futuros problemas e integrarse satisfactoriamente en la vida social.

- Función de planificación: proponer objetivos, actividades y acciones en un programa determinado tras un proceso de análisis de la realidad, que de respuesta a las necesidades detectadas y a las metas propuestas a alcanzar.

- Función docente: mediante el acompañamiento a estudiantes en prácticas de trabajo social se favorece la

formación teórico-práctica de pregrado y postgrado de alumnos/as de Trabajo Social y de otras disciplinas afines.

- Función de promoción: se realiza mediante actuaciones encaminadas a restablecer, conservar y mejorar las capacidades, la facultad de autodeterminación y el funcionamiento individual o colectivo.

- Función de evaluación: contrastar los resultados obtenidos en las distintas actuaciones, en relación con los objetivos propuestos, teniendo en cuenta técnicas, medios y tiempos empleados.

- Función gerencial: se desarrolla a través de las responsabilidades en la planificación de centros, organización, dirección y control de programas.

POSICIONANDO LA ESPECIFICIDAD DE LAS DISTROFIAS HEREDITARIAS DE RETINA EN LOS MEDIOS DE COMUNICACIÓN

Elena Mora

Área de Comunicación de FEDER

Aún nos queda mucho camino para asegurar que las enfermedades raras, y más concretamente las Distrofias Hereditarias de Retina, tienen la suficiente presencia en los medios de comunicación. Sin embargo, si echamos la vista atrás, lo cierto es que podemos afirmar que sí que se ha producido un cambio de paradigma que ha motivado grandes avances.

Pero hemos de tener en cuenta que hablamos de un **concepto relativamente “joven”**, en tanto en cuanto el término ‘enfermedad rara’ es relativamente reciente, ya que se acuñó a finales de los 70 y se consolidó a mediados de los 80 en Estados Unidos, de la mano de los denominados ‘medicamentos huérfanos’. De hecho, “enfermedades huérfanas” también es una de las referencias más utilizadas para referirnos a este grupo de patologías.

Y es que, desde la aparición del término hasta ahora, y según el punto del mapa en el que nos encontremos, han ido surgiendo una serie de definiciones análogas de las enfermedades raras como “minoritarias” o “poco frecuentes”. No obstante, lo cierto es que actualmente no existe una única definición de “enfermedad rara”, ya que tampoco existe consenso a nivel global ni regional al respecto, ya no sólo en términos etimológicos sino también clínicos vinculados con la prevalencia.

En términos de comunicación, dado que no existe un sentir generalizado, la labor para definir un término adecuado se complejiza. En castellano, el concepto de ‘enfermedad rara’

surge como una traducción literal del término en inglés *Rare Disease* haciendo alusión a su baja prevalencia. Esto se vincula también a la abreviatura, ya que históricamente se ha utilizado en castellano 'ER' siguiendo la fórmula 'RD' del inglés.

Poco a poco, el término se ha ido afianzando en la sociedad hasta día de hoy, donde las **enfermedades raras generan una media de 20.000 impactos en medios de comunicación digitales e impresos al año**. Una cifra que evidencia la presencia, aunque insuficiente, de nuestro colectivo en los medios.

Este posicionamiento ha sido posible gracias al movimiento asociativo que representa la causa, que en FEDER ha pasado de 7 a casi 400 entidades en 2021. Un movimiento tan fuerte con el que cuentan las Distrofias Hereditarias de Retina, dentro y fuera de las enfermedades raras. Hablamos de organizaciones que, como RETIMUR, comenzaron a surgir en la **década de los 90 focalizadas en patologías concretas como la retinosis pigmentaria**.

Pero ellas mismas, posteriormente, entendieron las oportunidades que suponía **abrirse para representar también a otras patologías afines**. Quizá ésta sea una de las claves de la creciente evolución de la visibilidad de estas patologías, cristalizando a día de hoy en los manifiestos ya habituales de FARPE y Fundaluce en marcos como el Día Mundial de la Retina, la Retinosis Pigmentaria o la Visión.

Todo ello ha motivado, además, y esto es muy importante, un **cambio de paradigma en cómo la sociedad entiende a estas patologías**. Un ejemplo de ello es que ya no hablamos únicamente de personas ciegas, la sociedad de hoy también entiende que hay otras realidades como la discapacidad visual o la baja visión.

Este cambio de paradigma es muy representativo y alude a esa presencia mediática que tanto necesitamos pero que finalmente se traduce en la perspectiva social hacia nuestra causa. Por ello, es fundamental que preste atención al valor de la persona y no a sus circunstancias, tratándola desde una perspectiva de normalización capaz de fomentar la concienciación social y la visibilidad de los retos que suponen las enfermedades raras.

Ahora bien, ¿qué queremos que la sociedad perciba de nuestra causa? ¿Qué queremos conseguir? En el caso de las Distrofias

Hereditarias de Retina, el mensaje histórico ha estado muy claro: queremos investigar, queremos diagnósticos en tiempo, centros de atención especializados y acceso a medicamentos.

Gracias a ello, el movimiento ha conseguido que este mismo **2021 se hayan designado dos nuevos Centros, Servicios y Unidades de Referencia (CSUR) para Distrofias Hereditarias de Retina. Y, sobre todo, ha motivado la llegada de la terapia génica para este colectivo.**

Dos noticias clave que responden a los mensajes que desde el colectivo de organizaciones de retina vienen trasladando en los últimos años.

Ahora bien, todo ello también evidencia esa necesidad de mayor presencia y en consecuencia, mayor presión. No olvidemos que **esta terapia génica que ha llegado, se aprobó en 2018 en Europa y no ha sido hasta 2021 cuando se ha logrado acceder en España.**

El tiempo, la visibilidad, el papel del tejido asociativo es clave para evidenciar todo esto.

Ahora bien, ¿cómo podemos conseguirlo?

En primer lugar, utilizando como gancho **marcos como los días mundiales**. Es nuestro momento de ser protagonistas y posicionar nuestros mensajes más prioritarios. En casos concretos como los que nos vinculan, pero también, por qué no, utilizando otros contextos como pueda ser el Día Internacional de la Discapacidad o el de la Cobertura Universal de la Salud, campos por los que todos trabajamos.

En segundo lugar, **humanizando nuestro mensaje**. El propio IV Congreso de Retina Murcia es un ejemplo de ello, contando con diferentes mesas con personas que viven en primera persona las Distrofias Hereditarias de Retina e incluso con Noa, la primera persona en recibir la terapia génica en España.

Y es que, resulta mucho más fácil de empatizar y que el mensaje de nuestras organizaciones llegue, de acuerdo además con ese mismo espíritu de humanizar el sistema sanitario.

Por otro lado, es muy positivo **aliarse con personas influyentes que nos ayuden a posicionar nuestro mensaje en la agenda pública, así como con grandes medios** de comunicación. Desde una perspectiva de organizaciones de pacientes, llegar hasta aquí

no es fácil. Pero, entre los primeros pasos, podemos conectar y estrechar lazos con los **medios de comunicación autonómicos**.

En el caso de Murcia existe una gran trayectoria en este sentido y es que, trabajar conjuntamente, nos permite aterrizar nuestro mensaje en las Comunidades Autónomas que es donde, además, se toman las decisiones sobre nuestra salud, educación, servicios sociales o ámbito laboral, teniendo en cuenta que la mayor parte de las competencias están transferidas.

Posicionar nuestro mensaje a nivel autonómico nos permite asimismo trabajar con los agentes políticos que trabajan en nuestro territorio y hacerlo además con una proyección nacional, ya que parte de estos agentes decisores puede que acaben mañana en una cámara parlamentaria como el Senado, de representación territorial.

También desde una perspectiva integral. Porque si bien la mayor manifestación de estas patologías es de carácter clínico, debemos tener presente todas las implicaciones sociales que las mismas conllevan. De ahí que podamos dirigirnos a medios de comunicación **especializados en sanidad, pero también a aquellos de índole social**.

En cuarto lugar, es fundamental que seamos nosotros, las organizaciones de pacientes, quienes motivemos la **accesibilidad de nuestro mensaje**. Esto es: tanto motivando el desarrollo de herramientas y plataformas accesibles para cualquier persona, independientemente de si tiene discapacidad o no, así como a través de un lenguaje divulgativo y fácil para todo. El Canal Retina de RETIMUR es un buen ejemplo de ello.

Como último punto, y precisamente el más importante, tener siempre la **especificidad de las enfermedades raras, de las Distrofias Hereditarias de Retina, en nuestro mensaje**. Nuestra lucha de lo local a lo global, de lo específico a lo transversal, es lo que nos hace únicos.

Es decir, en tanto en cuanto logremos mejorar nuestra realidad, en tanto en cuanto motivemos el acceso a una atención sanitaria de calidad, a un diagnóstico en tiempo o a un medicamento en condiciones de equidad, estaremos mejorando la realidad de todo el sistema, de toda la sociedad.

REPERCUSIONES PSICOSOCIALES EN LA PAREJA DE AFECTADOS CON ENFERMEDAD RARA

Dolores María Peñalver-García, Carmen María
Gómez-Navarro

Universidad de Murcia

INTRODUCCIÓN:

La Unión Europea¹ define las EERR como aquella que puede producir la muerte o debilitar de forma crónica al afectado y que presenta una prevalencia muy baja, inferior a 5 casos por 10.000 personas, además dicha enfermedad debe requerir diferentes esfuerzos para su tratamiento. La prevalencia varía según el país, por ejemplo en Japón es 4/10.000 y en EEUU es 200.000 personas afectadas en todo el país (Avellaneda, Izquierdo, Torrent-Farnell, & Ramón, 2007).

Del Barrio & Castro(2008) afirman que bajo el epígrafe de Enfermedades Raras se aglutina un gran número de enfermedades, desórdenes y síntomas pero que tienen unas características comunes:

- Son graves por su carácter generalmente degenerativo que pueden llevar a la muerte.
- Para el 50% de las enfermedades la etapa de comienzo se produce en la niñez.
- Suele llevar a la incapacitación y por tanto a la dependencia.
- Suponen un desgaste psicosocial para el enfermo y su familia.
- Son incurables y por tanto crónicas.
- Las familias tienen dificultades para encontrar el tratamiento adecuado.

1 Decisión nº 1295/1999/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 1999. Diario Oficial de las Comunidades Europeas L 155/1. 1999

Cuando hay una enfermedad rara existe un costo emocional oculto detrás de su cuidado. Es el precio que paga el cuidador principal cuando es la pareja quien sufre la enfermedad o discapacidad y lo priva de la intimidad que alguna vez disfrutó.

“Como cuidador de un ser querido que padece una enfermedad rara, puedes sentirte abrumado y no saber bien por dónde empezar. No es nada sorprendente. Los cuidadores de la comunidad de pacientes con enfermedades raras se enfrentan a desafíos excepcionales”, declaró John Schall, director ejecutivo de la Caregiver Action Network.

El cuidado de una persona enferma representa una gran carga emocional, para el cuidador principal y la familia, a partir de los diferentes problemas a los que habrán de enfrentarse. Ello genera un alto grado de estrés y depresión en los cuidadores. La distribución de cuidadores de pacientes con demencia según sexo mostró que el 89 % de los cuidadores eran mujeres, mientras que solo el 11 % pertenecían al sexo masculino. El cuidador principal de este estudio fue un familiar del paciente en el 98 % de los casos. Se destacaban en el cuidado, en primera línea, las esposas con un 42 %, y en segunda línea las(o) hijas(o), con un 32 %.

“La enfermedad, generalmente, afecta de forma negativa a las relaciones de pareja ya que es una fuente de estrés, desgaste emocional y sufrimiento, sobre todo en enfermedades graves, degenerativas y dolorosas”, apunta la psicóloga Laura Rojas Marcos, autora del libro *La familia: de relaciones tóxicas a relaciones sanas*

Diagnóstico de la enfermedad en la pareja

Afectados y familiares tienen que adaptarse a las características de cada enfermedad en sus diferentes fases (diagnóstico, tratamientos...) reestructurando su vida familiar. La enfermedad puede ser impredecible, requiere atención constante y llegar a formar parte de la vida familiar, produciendo cambios estructurales, procesuales y emocionales en la familia, y especialmente en la forma de relacionarse la pareja.

Una ER supone un impacto psicosocial y económico en el paciente y su familia. La familia y el afectado tienen que enfrentarse

a un diagnóstico, no siempre claro y con un pronóstico difícil y poco esperanzador. Ni que decir tiene que estas circunstancias producen una situación de estrés, miedo e inquietud, tanto para el enfermo como para su familia. Para Ledón (2011) los enfermos crónicos y sobre todo sus familias sufren el impacto de la enfermedad principalmente por la cronicidad de la patología, ya que supone una lucha continua.

En este sentido y debido a que una de las características de las ER es la cronicidad, podemos afirmar que los afectados de ER también sufren este impacto, a esto debemos añadir otra característica de las ER, la progresiva degeneración, por lo que estos enfermos sufren no sólo el impacto de padecer una enfermedad crónica, sino que hay que sumar la ansiedad ante el empeoramiento y, por consiguiente, el estrés debido a la continua adaptación a la nueva situación.

No todas las familias reaccionan igual al diagnóstico de una ER, dependerán de su resiliencia. La resiliencia es el “conjunto de procesos sociales y personales que posibilitan conseguir el bienestar físico y psicológico a pesar de las adversidades”. Aquellas familias con una alta resiliencia se enfrentan a la enfermedad como una oportunidad de superación, son capaces de controlar los pensamientos negativos, son activos en el tratamiento del enfermo y se informan acerca de la enfermedad (Grau & Fernández Hawrylak, 2010).

Por estos motivos, en las últimas décadas se ha apreciado un cambio en la intervención de las ER, teniendo en cuenta también a la familia como destinataria de terapia para desarrollar la resiliencia y enfrentarse a la nueva situación y centrando los servicios tanto en el enfermo como en su familia (Grau & Fernández Hawrylak, 2010). En esta línea, (C. Zubizarreta & C. Zubizarreta) consideran que la familia debe ser objeto de terapia de grupo en el caso de ER. Para ello, existen tres tipos de grupos de ayuda, que principalmente se ofrecen en las asociaciones de afectados y que son Grupo de Acogida, Grupo de Ayuda Mutua y Grupo de Apoyo. En ellos las familias encuentran apoyo emocional, sienten que no están solos ante la enfermedad y que otras personas han sufrido y vivido las mismas situaciones que

ellos están experimentando en esos momentos (Del Barrio & Castro, 2008).

Evolución de la enfermedad. Alteraciones estructurales y emocionales:

Cambios en los roles, funciones y jerarquía familiar. Adscripción del rol de «cuidador primario»

La enfermedad crónica (Aja Alelán & Villanueva, 1998) y por extensión las ER producen cambios estructurales y emocionales en la familia. Tras el diagnóstico y el evidente impacto, se produce la adscripción del cuidador principal que se encargará de atender en todo momento al enfermo. En España el 75% del cuidado de una persona con discapacidad lo lleva a cabo las mujeres (García-Calvente, Mateo-Rodríguez, & Maroto-Navarro, 2004). Por motivos socio-culturales, es la mujer la que asume el papel de cuidadora principal. En este sentido, existen también diferencias, ya que son más susceptibles cuanto menor es el nivel socio-económico y educativo de estas (García-Calvente, Mateo-Rodríguez, & Eguiguren, 2004).

El cuidador principal, tiene que hacer cambios importantes en su vida cotidiana, adaptándose a la nueva situación. Debe adoptar nuevos roles (García-Calvente et al., 2004; Ahmad, 2018), además de continuar con su trabajo fuera de casa o abandonarlo por la falta de tiempo, debe realizar las tareas domésticas y todo ello junto con el cuidado del enfermo. Por lo que produce un desgaste en la salud física y psicológica del cuidador. Según las autoras García-Calvente et al. (2004) las cuidadoras presentan problemas de depresión, ansiedad, se sienten irritables, tristes y por supuesto cansadas, incluso pueden perder la ilusión por la vida. Pero también, son capaces de encontrar estrategias de afrontamiento emocional (García-Calvente et al, 2004; López-Ríos, E. y Guarate-Coronado, Y., 2020). En el caso de que el cuidador principal fuera la pareja del afectado, parece lógico deducir que la relación conyugal se verá afectada. En esta línea Kimmel (2001) en su artículo sobre pacientes con diálisis, afirma que las relaciones de pareja se ven afectadas en el caso de que el cuidador sea el cónyuge del enfermo, al tratarse de

una enfermedad crónica podemos extrapolar estos datos a las ER. El cónyuge suele dejar de trabajar para dedicar más tiempo al cuidado, esto produce desgaste psicológico y falta de ilusión por la incapacidad de desarrollo personal y profesional. Por otro lado, si no abandona su trabajo debe estructurar su tiempo para poder atender a las necesidades del enfermo, lo que supone un sobreesfuerzo físico y mental. A esto unimos, que en ocasiones el cuidador es la diana de los sentimientos negativos del enfermo. Todo esto puede llevar al desarrollo de depresión y hostilidad (Kimmel, 2001). Del Barrio (2008) en su artículo sobre las ER también comenta cómo dichas enfermedades causan problemas en diferentes ámbitos incluido el de la pareja. Pero en este sentido, los cónyuges sienten que no pueden quejarse porque ellos no son los que están enfermos, se sienten culpables por sentirse mal y ocultan sus sentimientos, pensamientos y miedos (C. Zubizarreta & C. Zubizarreta).

Interacción familiar y Aislamiento social

Una ER también produce un impacto social, ya que se reduce el tiempo de ocio (Grau & Fernández Hawrylak, 2010) e incluso muchas personas que pensaban eran amigos se van alejando de la familia, lo que produce además decepción (Aja Alelán & Villanueva, 1998). Debido a que toda persona necesita momentos de ocio y diversión, deducimos que se producirán problemas en la pareja debido a esta nueva y difícil situación.

Impacto en los ingresos familiares

Según el estudio ENSERIO de FEDER El nivel de ingresos de los afectados y sus familias es bastante heterogéneo, La media de esos ingresos está aproximadamente en los 2.000 euros, pero encontramos que casi un cuarto de los afectados y familiares apenas ganan menos de 1.200 euros al mes. Existe, además, una correlación importante estadísticamente significativa entre la posición económica y la pérdida de oportunidades laborales y formativas, además de este nivel de ingresos limitado por

los costes de oportunidad, tanto de los afectados como de sus familiares, las personas con enfermedades raras y sus familias asumen gastos extraordinarios relacionados exclusivamente con la atención a la enfermedad. Esto se traduce no solo en un esfuerzo para asumir los gastos médicos, farmacológicos y de prestaciones, sino en la reducción de oportunidades laborales para la persona afectada y su cuidador principal.

Por otro lado, como comentábamos, las ER producen impacto económico en las familias. El enfermo deja de trabajar, abandona sus responsabilidades y es el resto de la familia la que tiene que asumir todos los roles de la dinámica familiar como la administración, la economía y el cuidado. Algunos estudios demuestran que las familias con mayores recursos económicos se muestran más sólidas ante la enfermedad crónica (Aja Alelán & Villanueva, 1998).

La conocida Ley de la dependencia² clasifica la dependencia en física, mental, social y económica, el enfermo pasa de ser una persona activa laboralmente a ser inactivo e incluso dependiente. El hecho de que el enfermo se vea obligado a abandonar su trabajo, repercute en un menor ingreso económico en la familia, si además los hijos del matrimonio son menores, será el cónyuge el único responsable de la economía familiar. A esto añadimos que las ER suponen en muchas ocasiones un gasto económico extra, en medicamentos, médicos o tratamientos. Es obvio pensar, que esta situación económica complicada puede producir también desgaste en las relaciones de pareja.

Repercusiones en la intimidad de la pareja

La intimidad requiere confianza y esfuerzo. No es automática, va y viene con el transcurso del tiempo y al cambiar las circunstancias. Cuidar de alguien puede, sin dudas, alterar la intimidad –y el esfuerzo por mantener la intimidad puede ser más estresante que nunca– pero no permita que la intimidad sea una víctima de su rol de cuidador.

2 Ley 39/2006, de 14 de diciembre, de Promoción de la Autonomía Personal y Atención a las personas en situación de dependencia

CONCLUSIÓN:

La ER puede afectar a la relación de pareja cuando uno de los cónyuges es el afectado. La nueva situación a la que se tiene que enfrentar la familia va a producir un cambio de roles recayendo la mayor responsabilidad de todos ellos en el cónyuge sano. Esto producirá una sobrecarga emocional, física y psicológica que afectará a la relación y convivencia de pareja.

En la revisión de la bibliografía sobre el impacto psicosocial en el cónyuge de un afectado de ER ha quedado patente que no hay estudios concretos sobre este tema. Se ha tenido que extrapolar la información de enfermedades crónicas o degenerativas para llegar a la conclusión de que ocurriría lo mismo con los afectados de ER. Sería interesante abrir una nueva línea de estudio para describir cómo afectan las ER en las parejas cuando uno de los cónyuges es el afectado. La mayoría de los artículos encontrados están relacionados con ER pediátricas o si es en adultos se refiere sobre todo a enfermedades crónicas o a alzheimer pero nada concreto en ER. Incluso los artículos hacen referencia a enfermedades en las que el paciente ya es totalmente dependiente, pero no hablan del proceso hasta llegar hasta esa situación.

REFERENCIAS:

- Aja Alelán, M., & Villanueva, N. (1998). El impacto de la enfermedad de alzheimer en la familia. *Escuela Vasca de Terapia Familiar*.
- Ahmad, M., Amaya, L., Calabria, B., Arcon, A., Carrillo, D., Sánchez-Muños, A., De la Cruz Angulo, A., Ortega-Dias, K., Navarro-Agamez, M., Rodríguez-Benavide, D., Reales-Fontalvo, D. (2018). Calidad de vida en pacientes con enfermedad de Huntington y sus cuidadores. *Revista Salud en Movimiento*, 10(1).
- Avellaneda, A., Izquierdo, M., Torrent-Farnell, J., & Ramón, J. (2007). Enfermedades raras: enfermedades crónicas que requieren un nuevo enfoque sociosanitario. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, vol.30, n.2, 177-190.
- Del Barrio, J., & Castro, A. (2008). Infraestructura y recursos de apoyo social, educativo y sanitario en las enfermedades raras. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 31: 153-163.

Díaz-Rodríguez, C.; J.L. Rodríguez-Arias-Palomo, J.L.; Prado-Meis, M.C.; Rey-Pais, C.; Durana-Tonder, B.; Canosa-Diz, J.; Venero-Celis, M.; Otero-Larrea, M.; Programa de apoyo y asesoramiento para familias con enfermo crónico y su repercusión en la gestión del proceso de hemodiálisis en *Diálisis y Trasplante*, Volume 27, Issue 4, October 2006, Pages 113-118

FEDER (2013) Estudio sobre situación de Necesidades Sociosanitarias de las personas con Enfermedades Raras en España. Estudio ENSERIO FEDER (Federación Española de Enfermedades Raras)

García-Calvente, M., Mateo-Rodríguez, I., & Eguiguren, A. P. (2004). El sistema informal de cuidados en clave de desigualdad. *Gaceta sanitaria*, vol.18, suppl.1:132-139.

García-Calvente, M., Mateo-Rodríguez, I., & Gutiérrez, P. (1999). Cuidados y cuidadores en el sistema informal de salud. *Escuela Andaluza de Salud Pública*.

García-Calvente, M., Mateo-Rodríguez, I., & Maroto-Navarro, G. (2004). El impacto de cuidar en la salud y la calidad de vida de las mujeres. *Gaceta Sanitaria*, vol18 suppl2: 83-92.

Grau, C., & Fernández Hawrylak, M. (2010). Familia y enfermedad crónica pediátrica. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, vol.33, n.2:203-212.

Kimmel, P. L. (2001). Psychosocial factors in dialysis patients. *Kidney International*, 59, 1599-1613.

Ledón, L. (2011). Enfermedades crónicas y vida cotidiana. *Revista Cubana de Salud Pública*, vol.37, n.4: 488-499.

López-Ríos, E., Guarate-Coronado, Y. (2020). Afrontamiento familiar ante el diagnóstico y evolución de la enfermedad ataxia de Friedreich. *Revista Ocronos*, vol.3 (8)

Pozo Muñoz, C; Bretones Nieto, B.; Martos Méndez, M.J.; Alonso Morillejo, E.; Cid Carrique,N.; Repercusiones psicosociales del cáncer infantil: apoyo social y salud en familias afectadas, en *Revista Latinoamericana de Psicología*, Volume 47, Issue 2, April–June 2015, Pages 93-101 http://ac.els-cdn.com/S0120053415000047/1-s2.0-S0120053415000047-main.pdf?_tid=ba9328e4-3a8d-11e5-a472-00000aab0f27&acdnat=1438681790_706d147d140e5f97881fe1105a987669 visitado el 4 agosto de 2015

Robert V.; Álvarez C.; Valdivieso F.; (2013) Psicooncología: Un modelo de intervención y apoyo psicosocial en *Revista Médica Clínica Las Condes*, Volume 24, Issue 4, July 2013, Pages 677-684. http://ac.els-cdn.com/S0716864013702074/1-s2.0-S0716864013702074-main.pdf?_tid=7f00e7ac-3a93-11e5-97a6-00000aab0f27&acdnat=1438684267_7d0ab052c9bd19b125209ca7ee474d88

Zubizarreta, C.; Zubizarreta, A. (s.f.). Necesidades de apoyo psicosocial en las enfermedades raras.

PROYECTO “PÍDEME PLACER”

Luna Flores Torres,
periodista multimedia

María Sanabria Vals
psicóloga y sexóloga

Hablar de sexualidad puede causar revuelo e incomodidad siempre y cuando se entienda y se limite el sexo a la pornografía, grave error, pero triste verdad porque, ¿quién no ha consumido alguna vez contenido de este tipo? Pero, ¿qué variedad de realidades muestra?

Desde Pídeme Placer teníamos claro que para nada nos sentíamos reflejadas con un contenido machista, vejatorio y carente de valores. Y nos frustraba profundamente que un pilar tan fundamental, tan esencial en la vida de cualquier ser humano, como es el de la sexualidad, quedase reducido a ese contenido, porque es la principal fuente a la que acuden niños, adolescentes y adultos para, en muchas ocasiones, aprender y lo que se acaba aprendiendo es a repetir patrones y reproducir conductas donde todo el foco estaba en el placer del hombre y en la sumisión de la mujer y donde la comunicación, el consentimiento y el respeto brillan por su ausencia.

Fue entonces cuando, además, pensamos cómo podrían sentirse personas con cualquier tipo de discapacidad al no estar reflejadas y al no existir sus realidades en el terreno de lo sexual. Porque al no tener referentes ni referencias, ¿cómo se percibe uno o una como alguien deseable?

Se lleva años pecando de infantilizar y negar la sexualidad a las personas con discapacidad. Es como hablar de dos tabúes potentes que no hacen más que perjudicar y negarle un derecho a millones de personas, negar el autoconocimiento, negar la autonomía, negar el disfrute, la exploración y lo que más nos preocupa, negar el desarrollo personal y el bienestar sexual.

Y dentro de las discapacidades nos quisimos centrar en la visual porque en una sociedad donde “una imagen vale más que mil palabras”, es necesario aprender a sentir y vivir de otro modo la sexualidad y la erótica.

Lamentablemente la sociedad o las grandes industrias han vendido en forma de estímulos visuales toda una experiencia sensorial que precisa de ser entendida mucho más allá de la visión. Y esta misma sociedad necesita aprender a percibir cada uno de los estímulos y sensaciones que nos envuelven en una situación de intimidad y aprender una serie de valores que son necesarios para relacionarnos tanto con nuestros propios cuerpos como con las demás personas.

Por ello, Pídeme Placer surge para que más de 285 millones de personas con discapacidad visual en el mundo puedan experimentar, vivir y disfrutar de su sexualidad creando una serie de productos digitales para hacer que el placer se escuche.

Pídeme Placer trata de crear un enlace de unión entre el disfrute y la información en materia de sexualidad. Por un lado, mediante las “Dosis de placer”, que son audios eróticos con sonido envolvente que permite sumergirte dentro de cada historia, donde los valores y la diversidad siempre están presentes. Y, por otro lado, tenemos la “Radio del Placer”, un espacio seguro, de confianza e interactivo, centrado en la educación y divulgación a través de audio-podcast sobre sexualidad y discapacidad visual.

Además de esos servicios, Pídeme Placer cuenta con asesoramiento sexológico personal para así hacer una triada de servicios de beneficios para la salud y de promoción para la misma porque de eso se trata, de vivir la sexualidad de manera saludable.

Realmente confiamos en que estamos cada vez más cerca de entender que lo real en esta vida es la diversidad y no hay nada más diverso que la sexualidad. Es hora de que el placer se escuche.

