

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

TESIS DOCTORAL

**“CARACTERIZACION Y EXPRESION DE
MUTACIONES EN GENES ESPECIFICOS DE
RETINA ASOCIADOS A RETINOSIS
PIGMENTARIA AUTOSOMICA DOMINANTE
(RPAD)”**

María Martínez Gimeno

Mayo, 2004

Servei Laboratori. Biología Molecular
Consorci Sanitari de Terrassa

El Dr. Jose Miguel Carballo Villarino, Doctor en Ciencias y facultativo del Servicio de Laboratorio del Hospital de Terrassa,

CERTIFICA:

Que la presente Memoria titulada: "Caracterización y expresión de mutaciones en genes específicos de retina asociados a retinosis pigmentaria autosómica dominante (RPAD)", que presenta Dña. María Martínez Gimeno para obtener el Grado de Doctor, ha sido realizada bajo mi dirección, autorizándola para su presentación al Tribunal Calificador.

Terrassa, a 14 de Mayo de 2004

VºBº

Fdo. Dr. Jose Miguel Carballo Villarino
Director de la Tesis Doctoral

Fdo. Dra. Margarita Sentis
Tutora de la Tesis Doctoral

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Miguel Carballo, por la dirección de esta Tesis y por haberme introducido en el campo de la investigación.

A mis compañeras del laboratorio de Biología Molecular, M^a Jose, Imma y Marta por su ayuda y apoyo diario.

A la Dra. Carmen Gimeno, Jefe del Servicio de Laboratorio del Hospital de Terrassa, por permitir y facilitar toda la ayuda necesaria para realizar este trabajo. Al resto de compañeros del Servicio de Laboratorio por su ayuda y estímulo.

Al Dr. Miquel Maseras, Jefe del servicio de Oftalmología del Hospital de Terrassa y miembros de su equipo por su cooperación en el examen y diagnóstico de pacientes.

A la Dra. Carmen Ayuso, de la Fundación Jiménez Díaz, coordinadora del Grupo Multicéntrico Español para el estudio de la Retinosis Pigmentaria y de la red EsRetNet, y a los demás componentes del grupo, por facilitarnos las muestras y estudios clínicos de los pacientes y su apoyo desinteresado en los momentos de dificultad.

A los pacientes y sus familias, por su colaboración y estímulo para la realización de este trabajo.

Al Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Organización Nacional de Ciegos Española (ONCE) y Fundación Once por la financiación parcial de los proyectos en los que se ha realizado esta Tesis Doctoral.

Al Exmo. Sr. Manel Royes, que desde su puesto de Alcalde de Terrassa y Presidente de la Diputación de Barcelona, demostró gran interés y apoyo en la realización de este trabajo.

A la dirección del Consorci Sanitari de Terrassa, por el apoyo mostrado en todo momento.

A mi familia, a Alvaro y a todos mis amigos, por estar siempre a mi lado y por haber compartido conmigo la ilusión por este trabajo. Muchas gracias a todos.

***A mis padres, hermanos y a Alvaro,
a vosotros os dedico esta tesis***

PROLOGO

La retinosis pigmentaria (RP) incluye un grupo de enfermedades hereditarias en las que se produce una degeneración progresiva de la retina, que afecta severamente a la visión y en la mayor parte de los casos conduce a la ceguera total.

El origen molecular de la RP está en un cambio o mutación en el genoma del paciente. Se observa una gran heterogeneidad tanto clínica como genética entre los pacientes de RP. Se han descrito un gran número de mutaciones distintas en diversos genes causantes de RP. El estudio de caracterización de mutaciones que causan RP se aborda a partir de la determinación del patrón de herencia y el análisis de mutaciones en genes conocidos que se asocian a cada patrón.

La caracterización clínica de los afectados y la determinación del patrón de herencia que sigue la enfermedad (a través del árbol genealógico) ha permitido establecer, tras el análisis molecular de las familias afectadas, posibles correlaciones fenotipo-genotipo entre pacientes de la misma y distintas familias.

En 1990 se crea el Grupo Multicéntrico y Multidisciplinario Español para el Estudio de la Retinosis Pigmentaria en la sede del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) como respuesta a la necesidad de investigar sobre este grupo de enfermedades en España. La entonces recién formada Acción Concertada Europea sobre "Prevention of Blindness" avalada y financiada por la Comunidad Europea, que agrupaba y coordinaba la incipiente investigación en este campo, supuso la oportunidad para la formación y encuadre de este grupo Multicéntrico en la Unión Europea. De esta forma ha sido posible coordinar el trabajo predominantemente clínico de oftalmólogos y neurofisiólogos con el más básico de la genética molecular y la epidemiología.

Dada la complejidad de la RP, se dividió su estudio entre los distintos grupos de investigación. Así, cada grupo aplica a sus pacientes los mismos protocolos internacionales de exploración oftalmológica y neurofisiológica.

El estudio genético molecular se centraliza en los diferentes laboratorios del Grupo atendiendo a la clasificación genética de los pacientes. El grupo del Hospital de Terrassa centraliza todos los casos de retinopatías hereditarias del tipo autosómico dominante.

En el año 2003, el grupo Multicéntrico se ha constituido en la Red Temática de Grupos EsRetNet. Esta red está coordinada por la Dra. Carmen Ayuso de la Fundación Jiménez Díaz (Madrid), y formada por otros cinco grupos liderados por la Dra. Monserrat Baiget, del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona), el Dr. Guillermo Antiñolo, del Hospital Virgen de Rocío (Sevilla), el Dr. Miguel Carballo, del Hospital de Terrassa (Barcelona), el Dr. José María Millán, del Hospital La Fe (Valencia) y la Dra. Diana Valverde, de la Universidad de Vigo (La Coruña).

El trabajo de esta Tesis Doctoral se ha realizado dentro del marco cooperativo de investigación de la Red actualmente denominada EsRetNet.

La Autora de la Tesis

INDICE

INDICE GENERAL

INDICE	ii
INDICE DE FIGURAS	ix
INDICE DE TABLAS	xii
ABREVIATURAS	xiii

INDICE

I. INTRODUCCION.....	1
I.1. LA RETINA. ANATOMÍA Y FISILOGIA.....	1
I.1.1. Tipos Celulares y Función.....	4
I.1.1.1. Fotorreceptores. Conos y bastones.....	5
I.1.1.2. Otros tipos celulares.....	8
I.1.2. Pigmentos visuales y fototransducción.....	9
I.2. RETINOSIS PIGMENTARIA. DEFINICION.....	13
I.2.1. Protocolos internacionales de diagnóstico de RP.....	14
I.2.2. Genética de la retinosis pigmentaria.....	14
I.3. RETINOSIS PIGMENTARIA AUTOSOMICO DOMINANTE (RPAD).....	25
I.3.1. Rasgos fenotípicos en RPAD.....	25
I.3.2. Genes asociados a RPAD.....	26
I.3.2.1. RHO.....	26
I.3.2.2. RDS-periferina y ROM1.....	31
I.3.2.3. RP1.....	35
I.3.2.4. NRL, CRX y FIZ1.....	36
I.3.2.5. FSCN2.....	39
I.3.2.6. Genes de expresión ubicua.....	39

I.4. MECANISMOS MOLECULARES. TERAPIA GENICA EN RP. SITUACION ACTUAL.....	42
II. OBJETIVOS.....	45
III. MATERIAL Y METODOS.....	46
III.1. EQUIPAMIENTO GENERAL.....	46
III.1.1. Instrumental.....	47
III.1.2. Material utilizado.....	47
III.2. PACIENTES Y FAMILIAS ESTUDIADOS.....	50
III.3. ESTUDIO CLINICO.....	52
III.4. ESTUDIO GENETICO DIRECTO DE GENES IMPLICADOS EN ADRP.....	56
III.4.1. Extracción de ADN.....	57
III.4.1.1. Extracción “fenol-cloroformo” (John y cols., 91).....	57
III.4.1.2. Extracción por columnas utilizando el kit “QIAamp® DNA Blood Mini Kit” (QIAGEN).....	58
III.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	59
III.4.2.1. Análisis del resultado de la PCR. Electroforesis en gel de agarosa.....	61
III.4.2.2. Estimación de la concentración de ADN en gel de agarosa.....	62
III.4.3. Cribado de mutaciones.....	63
III.4.3.1. Técnica de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).....	63
III.4.3.2. Técnica de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism).....	66

III.4.4. Secuenciación automática.....	68
III.4.4.1. Purificación del producto de PCR.....	68
III.4.4.2. Secuenciación.....	69
III.4.5. Análisis con enzimas de restricción.....	71
III.5. CLONACION.....	76
III.5.1. Obtención del plásmido pGL3-130.....	78
III.5.1.1. Obtención del inserto.....	78
III.5.1.2. Vector utilizado. Vector pGL3-Enhancer (<i>Promega</i>).....	78
III.5.1.2.1. Amplificación del vector.....	79
III.5.1.3. Digestión enzimática.....	80
III.5.1.4. Desfosforilación del vector.....	80
III.5.1.5. Ligación vector - inserto, de extremos cohesivos.....	81
III.5.1.6. Transformación en células competentes.....	81
III.5.1.6.1. Cultivos bacterianos. Medios y condiciones.....	81
III.5.1.6.2. Transformación.....	83
III.5.1.7. Obtención de ADN plasmídico.....	83
III.5.1.7.1. “ <i>Mini-prep</i> ”.....	83
III.5.1.7.2. “ <i>Midi-prep</i> ”.....	84
III.5.1.7.3. Determinación de la concentración de ADN.....	86
III.5.1.7.4. Comprobación de secuencias.....	86
III.5.2. Clonación del gen NRL. Obtención del plásmido pUC-NRL.....	87
III.5.2.1. Obtención del inserto.....	87

III.5.2.2. Vector utilizado. Vector pUC18 (<i>Invitrogen</i>).....	88
III.5.1.2.1. Amplificación del vector.....	89
III.5.2.3. Digestión enzimática.....	89
III.5.2.4. Ligación y transformación.....	89
III.5.3. Mutagénesis dirigida mediante PCR.	
Obtención del plásmido pUC-NRL51.....	90
III.5.4. Obtención del plásmido pCI-NRL51.....	92
III.5.4.1. Doble digestión del plásmido pUC-NRL51.....	92
III.5.4.2. Aislamiento y purificación del inserto NRL51.....	92
III.5.4.3. Vector utilizado. Vector pCI-neo (<i>Promega</i>).....	92
III.5.4.4. Digestión enzimática.....	93
III.5.4.5. Ligación y transformación.....	93
III.5.5. Obtención del plásmido pCI-NRL122.....	94
III.5.5.1. Obtención del inserto NRL122.....	94
III.5.5.2. Vector utilizado. Vector pCI-neo (<i>Promega</i>).....	95
III.5.5.3. Digestión enzimática.....	95
III.5.5.4. Ligación y transformación.....	95
III.5.6. Clonación del gen CRX. Obtención del plásmido pCI-CRX.....	96
III.5.6.1. Obtención del inserto.....	96
III.5.6.2. Vector utilizado. Vector pCI-neo (<i>Promega</i>).....	97
III.5.6.3. Digestión enzimática.....	97
III.5.6.4. Ligación y transformación.....	97
III.5.7. Clonación directa de un fragmento de PCR (TA-Cloning).....	93

III.6. EXPRESION GENICA.....	101
III.6.1. Cultivo de células eucariotas.....	101
III.6.1.1. Descripción y características de la línea celular.....	101
III.6.1.2. Condiciones de crecimiento de la línea celular.....	101
III.6.1.3. Mantenimiento de la línea celular.....	102
III.6.1.3.1. Congelación de la línea celular.....	103
III.6.1.3.2. Descongelación de la línea celular.....	104
III.6.2. Transfección transitoria.....	105
III.6.2.1. Transfección transitoria mediante lípidos catiónicos.....	105
III.6.2.1.1. Sembrado en placa.....	105
III.6.2.1.2. Transfección.....	106
III.6.2.2. Transfección transitoria por precipitación de Fosfato Cálcico.....	107
III.6.2.2.1. Sembrado en placa.....	107
III.6.2.2.2. Transfección.....	107
III.6.2.2.3. Cambio de medio de cultivo.....	108
III.6.2.3. Plásmidos control de los experimentos de transfección.....	108
III.6.2.3.1. Vector pGL3-control (<i>Promega</i>).....	108
III.6.2.3.2. Vector pRL-CMV (<i>Promega</i>).....	109
III.6.3. Lectura de los resultados de la transfección.....	110
III.6.3.1. Ensayos de luciferasa.....	110
III.6.3.1.1. Lisado celular.....	110
III.6.3.1.2. Detección de la actividad luciferasa de <i>Photinus pyralis</i> (P-Luc).....	110

III.6.3.1.3. Detección de la actividad luciferasa de <i>Renilla reniformes</i> (R-Luc).....	110
IV. RESULTADOS	113
IV.1. ESTUDIO GENETICO DIRECTO EN FAMILIAS ADRP.....	113
IV.1.1. Gen RHO.....	115
IV.1.1.1. Caracterización de mutaciones y polimorfismos.....	116
IV.1.1.2. Análisis familiar.....	118
IV.1.2. Gen RDS / Periferina.....	128
IV.1.2.1. Caracterización de mutaciones.....	129
IV.1.2.2. Análisis familiar.....	130
IV.1.3. Gen ROM1.....	134
IV.1.3.1. Caracterización de mutaciones.....	135
IV.1.3.2. Análisis familiar.....	135
IV.1.4. Gen RP1.....	136
IV.1.4.1. Caracterización de mutaciones.....	137
IV.1.4.2. Análisis familiar.....	138
IV. 1.6. Gen NRL.....	145
IV.1.6.1. Caracterización de mutaciones.....	146
IV.1.6.2. Análisis familiar.....	147
IV.1.7. Gen CRX.....	149
IV.1.7.1. Caracterización de mutaciones.....	150
IV.1.7.2. Análisis familiar.....	150

IV. 2. ESTUDIOS DE EXPRESION GENICA.....	151
IV.2.1. Efecto sinérgico de los factores Nrl y Crx en la transactivación del gen RHO.....	151
IV.2.2. Efecto diferencial en la actividad del promotor del gen RHO inducido por el factor de transcripción Nrl y los mutantes de éste P51L y G122E.....	152
V. DISCUSION.....	154
VI. CONCLUSIONES.....	175
VII. BIBLIOGRAFIA.....	178
VIII. BASES DE DATOS.....	194
IX. PUBLICACIONES.....	195

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la anatomía del ojo humano.....	2
Figura 2. Células Fotorreceptoras.....	5
Figura 3. Distribución de los distintos tipos celulares en las capas retinianas...	9
Figura 4. Cascada de Fototransducción.....	12
Figura 5. Fondos de ojo.....	13
Figura 6. Distribución de las RP no sindrómicas en España.....	18
Figura 7. Esquema de la región RPPR del promotor del gen de la rodopsina..	27
Figura 8. Esquema de la proteína RHO.....	30
Figura 9. Fondo de ojo y angiografía de un paciente afectado de DMAD.....	32
Figura 10. Esquema de la proteína RDS-periferina.....	34
Figura 11. Esquema de PCR; DGGE perpendicular.....	64
Figura 12. Protocolo general de obtención de plásmidos.....	77
Figura 13. Mapa del vector pGL3-Enhancer.....	79
Figura 14. Mapa del vector pUC18.....	88
Figura 15. Mutagénesis dirigida por PCR.....	91
Figura 16. Mapa del vector pCI-neo.....	93
Figura 17. Mutagénesis (NRL122).....	95
Figura 18. Mapa del vector pCR [®] 4-TOPO [®]	98

Figura 19. Mapa del vector pGL3-control.....	109
Figura 20. Mapa del vector pRL-CMV.....	109
Figura 21. Familia RPAD V873; Asn15Ser; <u>AAT</u> → <u>AGT</u> ; RHO 1A.....	118
Figura 22. Familia RPAD V9; Thr17Met; <u>ACG</u> → <u>ATG</u> ; RHO1A.....	119
Figura 23. Familia RPAD 279; Leu40Pro; <u>CTG</u> → <u>CCG</u> ; RHO 1A.....	119
Figura 24. Familia RPAD 314; Arg135Trp; <u>CGG</u> → <u>TGG</u> ; RHO 2.....	120
Figura 25. Familia RPAD 262; Ala164Glu; <u>GCG</u> → <u>GAG</u> ; RHO 2.....	121
Figura 26. Familia RPAD Z111; A-G3811-2nt; (Splicing 2º Intrón); RHO.....	121
Figura 27. Familia RPAD Z68; Gly188Arg; <u>GGA</u> → <u>AGA</u> ; RHO 3.....	122
Figura 28. Familia RPAD 188; Asp190Tyr; <u>GAC</u> → <u>TAC</u> ; RHO 3.....	124
Figura 29. Familia RPAD Z106; Pro215Leu; <u>CCG</u> → <u>CTG</u> ; RHO 3.....	125
Figura 30. Familia RPAD 206; Thr289Pro; <u>ACC</u> → <u>ICC</u> ; RHO 4.....	125
Figura 31. Familia RPAD 290; Val345Gly; <u>GIG</u> → <u>GGG</u> ; RHO 5.....	126
Figura 32. Familia RPAD 542; Pro347Leu; <u>CCG</u> → <u>CTG</u> ; RHO 5.....	127
Figura 33. Familia DMAD 24; Tyr141His; <u>CTA</u> → <u>CCA</u> ; RDS 1B.....	130
Figura 34. Familia DMAD 25; Arg142Trp; <u>CGG</u> → <u>TGG</u> ; RDS 1B.....	131
Figura 35. Familia DMAD 13; Cys214Tyr; <u>TGC</u> → <u>TAC</u> ; RDS 2.....	131
Figura 36. Angiografías y fondo de ojo (DMAD; Tyr141His).....	132
Figura 37. Fondo de ojo y Angiografía (DMAD; Arg142Trp).....	133

Figura 38. Angiografías (DMAD; Cys214Tyr).....	133
Figura 39. Familia RPAD F22; Cys253Lys; TGC→TAC; ROM 1.....	135
Figura 40. Familia RPAD 265; Gln686Ter; C2204T; RP1 4A.....	138
Figura 41. Familias RPAD 11/90, 265/99; Arg677Ter; C2177T; RP1 4A.....	139
Figura 42. Familia RPAD 455; Lys705fsX712; 2260/2263delA; RP1 4B.....	140
Figura 43. Familia RPAD 177; Lys722fsX737; 2312/2314delAAinsG; RP1 4B.	141
Figura 44. Pruebas clínicas. Familia con mutación K705fsX712.....	143
Figura 45. Pruebas clínicas. Familia con mutación Q686X.....	144
Figura 46. Familia RPAD T27; Pro51Leu; CCC→CTC; NRL 2A.....	147
Figura 47. Familia SRP V874; Gly122Glu; GGA→GAA; NRL 2B.....	148
Figura 48. Familia RPAD 272; G4862A; CRX.....	150
Figura 49. Actividad Luciferasa/Renilla.....	151
Figura 50. Actividad Luciferasa/Renilla.....	153
Figura 51. Incremento transcripcional (“Fold Activation”).....	153

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Genes y <i>loci</i> asociados a RP.....	22
Tabla II. Cebadores y condiciones de PCR y DGGE empleados para el estudio genético directo de genes asociados a RPAD.....	72
Tabla III. Cebadores empleados en los experimentos de clonación.....	100
Tabla IV. Plásmidos recombinantes empleados en los experimentos de expresión génica.....	111

ABREVIATURAS

A: Absorbancia
Aa: Aminoácido
AcOH: Ácido acético
ADN: Ácido Desoxirribonucleico
ADNc: Cadena complementaria del ARNm
ARN: Ácido Ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
AV: Agudeza visual
BrEt: Bromuro de Etidio
BSA: Albúmina sérica bovina
C- : Control negativo
C+: Control positivo
CNB: "Congenital Night Blindness"
CORD: Distrofia de conos y bastones
CRX: "Cone Rod Homeobox"
csp: "cantidad suficiente para"
CV: Campo Visual
ddNTP: Dideoxi Nucleótido Tri-fosfato
DGGE: "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis"
DMAD: Distrofia Macular Autosómica Dominante
DMEM: "Dulbecco's Modified Eagle's Medium"
DMSO: Dimetilsulfóxido
dNTP: Deoxi Nucleótido Tri-fosfato (oligonucleótido)
EDTA: Ácido etilendiaminotetracético
EOG: Electrooculograma
EPR: Epitelio Pigmentario Retiniano
ERG: Electrorretinograma
EtOH: Etanol
FIS: Fondo de Investigación Sanitaria
FSCN2: "Human retinal fascin"
GC-clamp: Cola de bases GC
GMPc: Guanidin monofosfato cíclico

GPCR: "G-protein-coupled receptor"
GTP: Guanosin trifosfato
HEPES: Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
IMPDH1: "Inosine monophosphate dehydrogenase 1"
INL: "Inner Nuclear Layer"
IPL: "Inner Plexiform Layer"
IRBP: "Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein"
Kb: Kilobase
KDa: Kilodalton
LB: "Luria Beltrani" (Medio de cultivo)
LCA: Amaurosis Congénita de Leber
MOPS: Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
NRE: "Nrl Response Element"
NRL: "Neural Retina Leucine Zipper"
ONL : Outer Nuclear Layer
OPL : Outer Plexiform Layer
pb: "par de bases"
PBS: "Phosphate Buffered Saline"
PCR: "Polymerase Chain Reaction". Reacción en cadena de la polimerasa
PDE: Fosfodiesterasa
PDEA: Subunidad α de la Fosfodiesterasa
PDEB: Subunidad β de la Fosfodiesterasa
PM: Peso Molecular
PSA: Persulfato amónico
PSB: "Protonated Schiff base"
RDS: "Retinal Degeneration Slow"
RHO: Rodopsina
ROM-1: "Rod Outer segment Membrana protein 1"
RP: Retinosis Pigmentaria
RPAD: Retinosis Pigmentaria Autosómica Dominante
RPAR: Retinosis Pigmentaria Autosómica Recesiva
Rpm: "revoluciones por minuto"
RPXL: Retinosis Pigmentaria ligada al cromosoma X
SBF: Suero Bovino Fetal
SRP: Retinosis Pigmentaria Esporádica

SSCP: "Single Strand Conformation Polimorphism"

TAE: Tris-Acetato-EDTA

TB: "Terrific Broth"

TBE: Tris-Borato-EDTA

TE: Tris-EDTA

TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina

Tm: Temperatura de fusión

Uds.: Unidades

UV: Ultra Violeta

Vf: Volumen Final

WT: "Wild Type" (fenotipo salvaje)

X-Gal: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranósido

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

I.1. LA RETINA. ANATOMIA Y FISIOLOGIA

La retina es la más interna de las tres tunicas de la que se componen los ojos de los vertebrados (esclerótica, coroides y retina) (Weisz y Keogh, 1987).

La capa retiniana circunda la cámara posterior y el espacio vítreo del ojo. Se diferencian dos regiones:

- Retina anterior o ciega que reviste el cuerpo ciliar, los procesos ciliares y el iris, en su segmento posterior.
- Retina posterior o sensitiva encargada de la percepción visual.

La retina posterior es la porción del ojo sensible a la luz. Tiene una función receptora e integradora de las imágenes que recibe. Codifica una respuesta eléctrica compleja que contiene la información sobre la forma, luminosidad, color, movimiento y entorno de los objetos que detecta para enviarla al cerebro a través del nervio óptico.

En la retina posterior se observan:

- La papila del nervio óptico, punto ciego de la retina por el cual los axones de las células ganglionares abandonan la retina para formar el nervio óptico. Desde la porción central de la papila emergen los vasos sanguíneos que llegan a la retina (Arteria Central de la Retina).
- La mácula, región de la retina de unos 5 mm de diámetro que se sitúa en su eje óptico, es la región encargada de la visión de mayor nitidez y definición. Esta zona presenta una coloración amarillenta, debido al pigmento xantofilina luteínica que se encuentra en los axones de los conos, a nivel de la capa de fibras de Henle, y por ello recibe el nombre de mácula lútea. Se piensa

que la función de este pigmento es actuar de filtro para las radiaciones luminosas de onda más corta, ayudando de esta forma al cristalino. La mácula comprende la foveola, la fovea y la región parafoveal. La foveola se localiza en el centro de la fovea, es una zona donde se produce una alta concentración de conos (no existen bastones) que adoptan una disposición muy regular dando lugar a un patrón casi perfectamente hexagonal. Esta foveola es avascular y en ella sólo existen conos (no hay células de asociación, ni ganglionares, ni bipolares). Es la zona de máxima agudeza visual.

Se denomina región central de la retina a la porción de retina que se encuentra alrededor de la fovea (unos 6 mm de radio). El resto es retina periférica y llega hasta la zona de la ora serrata (a unos 21 mm desde el centro de la papila). El diámetro total de la retina es aproximadamente de 42 mm.

La luz entra al ojo a través de la córnea. Atraviesa la cámara anterior, el cristalino y el humor vítreo y llega a la retina. Una vez aquí debe atravesar todas las capas de la retina antes de interactuar con la porción donde se encuentran los elementos fotosensibles: conos y bastones.

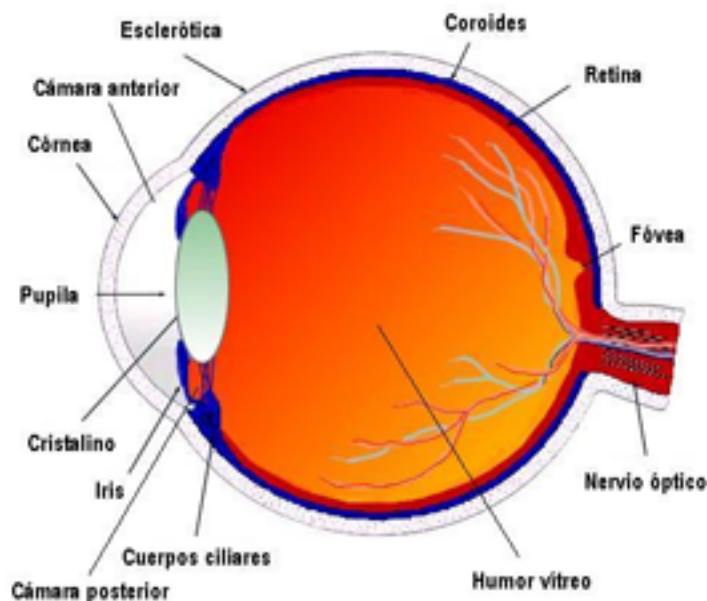


Figura 1. Esquema de la anatomía del ojo humano (John Moran Eye Center. University of UTA. Webvisión) en el que se localizan, entre otras, las diferentes partes de éste que atraviesa la luz hasta llegar a la retina.

Todas las retinas de vertebrados están compuestas por tres capas que contienen cuerpos celulares y dos capas de interacciones sinápticas (denominadas plexiformes):

- Capa nuclear externa (ONL), contiene los cuerpos celulares de los conos y bastones.
- Capa nuclear interna (INL), contiene los cuerpos celulares de las células horizontales, bipolares y amacrinas.
- Capa de células ganglionares, contiene los cuerpos celulares de estas células ganglionares además de los de algunas células amacrinas desplazadas.

Entre estas tres capas se localizan las capas plexiformes donde se realizan la mayor parte de contactos sinápticos de la retina (Kolb H., 1994):

- Capa plexiforme externa (OPL), donde contactan los conos y los bastones con las dendritas de las células bipolares y con las células horizontales.
- Capa plexiforme interna (IPL), donde se produce la segunda sinapsis de la vía vertical de la retina. Aquí contactan los axones de las células bipolares con las dendritas de las células ganglionares. En este nivel terminan gran cantidad de prolongaciones de las células amacrinas, que modulan la información que es pasada a las células ganglionares.
Estas células ganglionares son en último término las que mandan la información ya codificada hacia el sistema nervioso central a través del nervio óptico.

Las células del epitelio pigmentario forman la capa más externa de la retina (EPR). Se organizan como una sola capa de células que reposan sobre una membrana basal. El citoplasma de estas células se caracteriza por la

abundancia de mitocondrias, microvesículas y gránulos de melanina que absorben el exceso de luz y evitan la reflexión de la luz por todo el globo ocular.

Las funciones del epitelio pigmentario son:

- Fagocitar y digerir los discos de las membranas del segmento externo de conos y bastones (Young y Bok, 1969), con un recambio diario del 10% (Bridges, 1976).
- Participar en el ciclo de la vitamina A, a nivel retiniano.
- Síntesis de melanina que absorbe la luz que no es capturada por los fotorreceptores, impidiendo que ésta se refleje dentro del ojo (Curtis, 1985; Zinn y Marmor, 1979).
- Aporte de nutrientes para los fotorreceptores (Nicoletti y cols., 1995).
- Síntesis de componentes de la matriz que existe entre los fotorreceptores (glicosaminoglicanos).
- Barrera entre la circulación coroidal y las capas externas de la retina.
- Transporte iónico y de agua desde el espacio subretinal.

La membrana limitante externa (OLM) forma una barrera entre el espacio subretinal, donde se encuentran los segmentos internos y externos de los fotorreceptores, en íntima aposición con los procesos de las células del epitelio pigmentario y la retina neural propiamente dicha. La membrana limitante interna (ILM) se sitúa a nivel de la superficie de contacto entre la retina y el humor vítreo actuando como barrera de difusión entre ambos.

I.1.1. Tipos Celulares y Función

La retina contiene siete tipos de células distintas: los fotorreceptores (conos y bastones), las células bipolares, las células horizontales, las células amacrinas, las células ganglionares y las células de Müller.

El riego sanguíneo que proporciona los nutrientes a la retina consiste por un lado en la arteria retiniana central, que entra en el globo ocular por el nervio óptico que se divide para irrigar toda la superficie retiniana interna y, por otro lado, la coroides (tejido muy vascularizado entre la retina y la esclerótica) que se encarga de nutrir y, en especial, de aportar oxígeno a la superficie externa de la retina incluyendo los segmentos externos de conos y bastones, por difusión de los vasos coroideos (Guyton, 1992).

I.1.1.1. Fotorreceptores. Conos y bastones

El fotorreceptor es la célula más abundante de la retina. Se estima que cada ojo contiene alrededor de 125 millones de fotorreceptores, de los cuales alrededor de 120 millones son bastones.

Los bastones son los encargados de la visión nocturna y en blanco y negro, su fotorreceptor es la rodopsina. Los conos son los encargados de la visión diurna y

en color, su pigmento son las denominadas fopsinas.

En la retina humana se encuentran aproximadamente 3 millones de conos por ojo y éstos se subdividen, según el fotorreceptor que portan, en rojos, verdes y azules.

Los conos y los bastones son células nerviosas con una función específica: la fototransducción. La distribución de estas células varía a lo largo de la retina. La región de mayor densidad celular es la fóvea, localizada en la parte central de la retina, donde el tipo celular casi exclusivo es el cono.

Conforme nos alejamos de la fóvea la densidad celular disminuye progresivamente.



Figura 2. Células Fotorreceptoras.

En la retina periférica el fotorreceptor predominante es el bastón (Wässle y Boycott, 1991).

Los conos presentan una estructura cónica, con sus núcleos alineados en una sola capa justo por debajo de la membrana limitante externa.

Sus segmentos internos y externos se proyectan dentro del espacio subretinal hacia el epitelio pigmentario.

Los bastones poseen una morfología alargada con sus segmentos internos y externos que rellenan el espacio entre los conos y los procesos de las células del epitelio pigmentario. Los cuerpos celulares de los bastones constituyen el resto de la capa nuclear externa, donde se sitúan formando varias capas.

En ambas células distinguimos dos partes bien diferenciadas en cuanto a composición y función:

El Segmento Externo del fotorreceptor es el polo sensorial de la célula. En íntimo contacto con el epitelio pigmentario, es la zona celular en la que se llevará a cabo la fototransducción. Se trata de una prolongación celular que adopta la forma de cono o bastón, diferenciando así los dos tipos de células fotorreceptoras morfológicamente.

Estructuralmente, el segmento externo deriva de repliegues de la membrana plasmática del fotorreceptor. En el caso de los bastones, estos repliegues acaban constituyendo discos membranosos independientes de la membrana plasmática donde se encuentran inmersos los pigmentos fotosensibles (Rawn JD, 1989). Estos discos se reciclan mediante un proceso de migración progresiva hacia el epitelio pigmentario retiniano que finalmente los fagocita y digiere (Travis, 1997). Se cree que la estructura del disco se mantiene gracias a proteínas específicas del segmento externo como son las proteínas RDS-periferina y ROM1, que contribuyen al mantenimiento de la curvatura de los discos y a su anclaje al citoesqueleto del fotorreceptor (Connel y Molday, 1990).

Bioquímicamente, la rodopsina constituye el 90% del componente proteico del segmento externo del fotorreceptor bastón.

Esta proteína contiene el pigmento, 11-cis-retinal, encargado de fotoactivarse con la luz e iniciar la cascada bioquímica de la fototransducción (Guyton, 1992).

El segmento externo presenta también una elevada fluidez de membranas que contribuyen a la difusión de proteínas transmembrana y periféricas involucradas en la fototransducción. Esta fluidez se debe a su composición baja en colesterol y muy alta en ácidos grasos esenciales (Deamen, 1973). Esto explica también la concentración, inusualmente alta, de vitamina E (alfa-tocoferol) en el segmento externo, que contribuye a impedir la eliminación de ácidos grasos y la fotooxidación.

El Segmento Interno es la región del fotorreceptor encargada del metabolismo celular y de la síntesis de macromoléculas y energía necesarias para la fototransducción. Así, se observa un acumulo de mitocondrias en la región próxima al cilio y segmento externo. En su porción más interna se encuentran el núcleo y el cuerpo sináptico donde se produce la primera conexión de la vía visual, estableciendo la sinapsis con la célula bipolar. Esta región se caracteriza por la riqueza en vesículas sinápticas cargadas de glutamato, neurotransmisor que será liberado al establecer las sinapsis químicas tanto con las células bipolares como con las horizontales (Massey, 1990).

El bastón tiene un potencial de membrana en reposo (ausencia de luz) de -40mV, debido a la llamada corriente oscura catiónica. El transportador catiónico $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ dependiente de GMPc, localizado en la membrana plasmática del segmento externo del bastón, permanece abierto en la oscuridad. De esta forma, en el polo sináptico se efectúa una liberación tónica de glutamato al espacio sináptico en ausencia de estímulos visuales.

I.1.1.2. Otros tipos celulares

- Células bipolares

Son las primeras células que establecen sinapsis con los fotorreceptores tras ser estimulados por la luz. Existen dos tipos, las que se hiperpolarizan y las que se despolarizan. Éstas, a su vez, establecen sinapsis con las células horizontales.

- Células horizontales

Estas células presentan terminales postsinápticos con las células receptoras y presinápticos inhibitorios con las células bipolares y los conos.

- Células amacrinas

Son células muy variadas morfológica y funcionalmente. En ellas se generan sinapsis eléctricas y químicas.

- Células ganglionares

Son las únicas células de la retina capaces de generar potenciales de acción. Existe aproximadamente un millón de este tipo de células. Los axones de las células ganglionares constituyen el nervio óptico cuya entrada, junto con la de los vasos retinianos, forma el punto ciego de la retina.

- Células gliales de Müller

Son células de soporte no neuronales que ocupan los espacios retinianos.

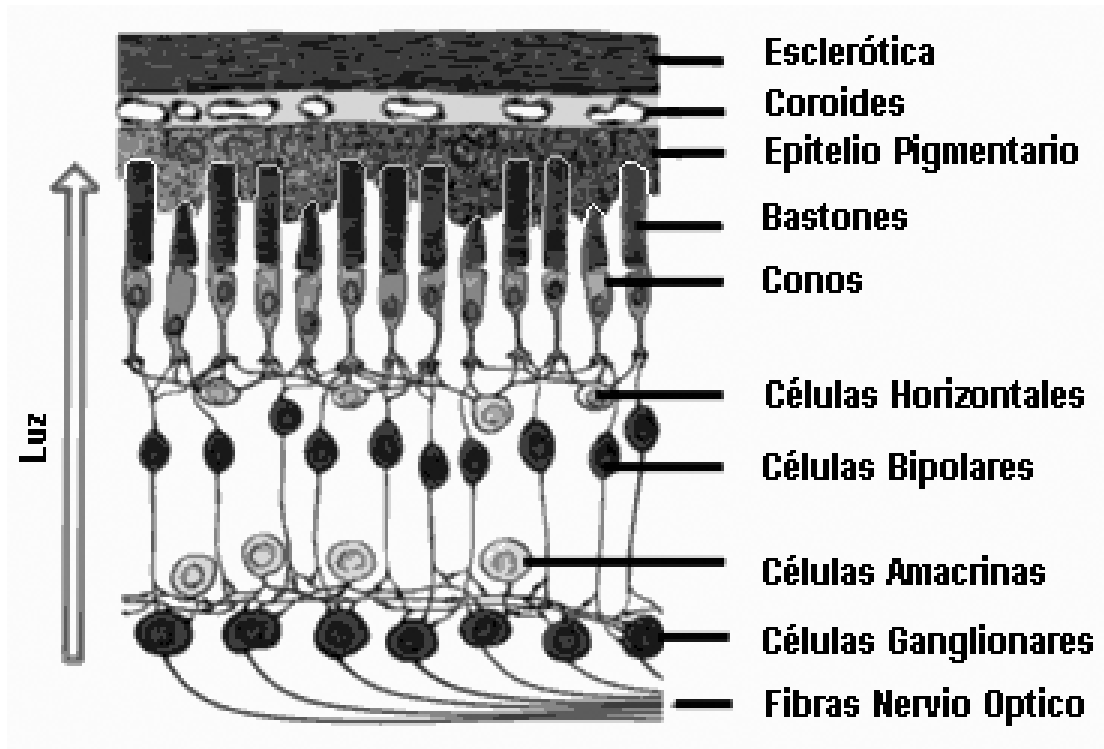


Figura 3. Distribución de los distintos tipos celulares formando las capas de las que se compone la retina.

I.1.2. Pigmentos visuales y fototransducción

Los fotorreceptores de todos los vertebrados responden a la luz en función de los pigmentos visuales que se encuentran incrustados en la bicapa lipídica de los repliegues (conos) y discos membranosos (bastones).

Los bastones contienen rodopsina y son responsables de la visión en condiciones de baja luminosidad, presentando un pico de mayor sensibilidad hacia la longitud de onda de los 500nm (luz verde azulada).

Los conos contienen tres tipos diferentes de opsinas. Una con mayor sensibilidad para las longitudes de onda largas (luz roja), otra que es sensible a las longitudes de onda medias (luz verde) y otra con mayor sensibilidad a las longitudes de onda cortas (luz azul). Los conos son la base de la percepción del color.

En el proceso de la fototransducción distinguimos dos fases caracterizadas por la ausencia o presencia de luz:

Fase luminosa

La cascada visual comienza con la captación de un fotón de luz que provoca la activación de la rodopsina por la rápida isomerización del 11 *cis*-retinal a todo *trans*-retinal, provocando un despliegue de la proteína que adopta así una conformación más estable. A su vez, se desprotona la base de Schiff, rompiéndose así el enlace proteína / cromóforo para dar finalmente opsina y todo-*trans* retinal libre. Esta fotoisomerización se produce mediante la transición de varios isómeros conformacionales, de los cuales, el que presenta la conformación activa es la metarodopsina II (Chabre M., 1989).

La rodopsina activada (metarodopsina II) interacciona con la transducina (proteína G) y cataliza el cambio de GDP a GTP por disociación de la subunidad alfa de las subunidades inhibitoras. La transducina activa es capaz, a su vez, de activar a la fosfodiesterasa (proteína G) dependiente de GMPc.

La fosfodiesterasa consta también de dos subunidades activas y dos inhibitoras, cuya disociación permite al enzima hidrolizar el GMPc, disminuyendo así su concentración y, por ello, provocando el cierre de los canales catiónicos (Na⁺, K⁺ y Ca⁺⁺) dependientes de GMPc, que se encuentran en la membrana plasmática del fotorreceptor (Yau, 1994). El cierre de estos canales provoca una hiperpolarización de la membrana receptora que genera el potencial receptor, primera señal eléctrica de transmisión de información neuronal que, a través del nervio óptico llega al cerebro. De esta manera el fotorreceptor deja de liberar el neurotransmisor, principalmente Glutamato, al espacio sináptico.

Fase Oscura

El descenso de Ca^{++} en el citoplasma, activa la recoverina y ésta a su vez activa la guanilato ciclasa que restituye de nuevo los canales dependientes de GMPc. Al restablecerse los niveles de Ca^{++} , la recoverina es inhibida y la transducina GTPasa cataliza la separación de la transducina y la fosfodiesterasa permitiendo su inactivación al unirse de nuevo a sus subunidades inhibitoras.

La rodopsina kinasa fosforila residuos de serina y treonina en la región carboxi-terminal de la rodopsina cuando está activa. La rodopsina fosforilada es capturada a su vez por la arrestina, lo que evita que la primera se una a la transducina, paralizando el proceso (Wilden y cols., 1986). Mientras, el cromóforo (todo-*trans* retinal) es rápidamente reducido a todo *trans*-retinol o vitamina A, por la retinoldeshidrogenasa y mediado por el paso de NADPH a $NADP^+$.

La vitamina A es dirigida hacia el epitelio pigmentario donde es transformada a retinil éster e isomerizado a 11-*cis*-retinol. Éste vuelve al segmento del disco externo donde es oxidado a 11-*cis*-retinal gracias a la reducción de NAD a NADH. El 11-*cis* retinal es transportado de nuevo al interior del disco estando de nuevo disponible para su unión a la opsina.

Los canales de sodio en la membrana plasmática del segmento externo permanecen abiertos en la oscuridad, lo que permite un flujo pasivo de sodio del espacio extracelular al citoplasma del segmento externo, también se da una difusión de sodio del segmento externo al interior del segmento interno. Allí, la ATPasa Na^+/K^+ bombea sodio fuera del segmento interno tanto en luz como en oscuridad completando el ciclo de la fase oscura.

En estado despolarizado (oscuridad) los neurotransmisores se liberan del terminal presináptico del fotorreceptor llegando hasta el espacio postsináptico de las células bipolares y horizontales.

Dependiendo de la forma de interacción, las células bipolares pueden ser despolarizadas ó hiperpolarizadas en la fase oscura. Las células horizontales se encuentran despolarizadas en la fase oscura al igual que los fotorreceptores.

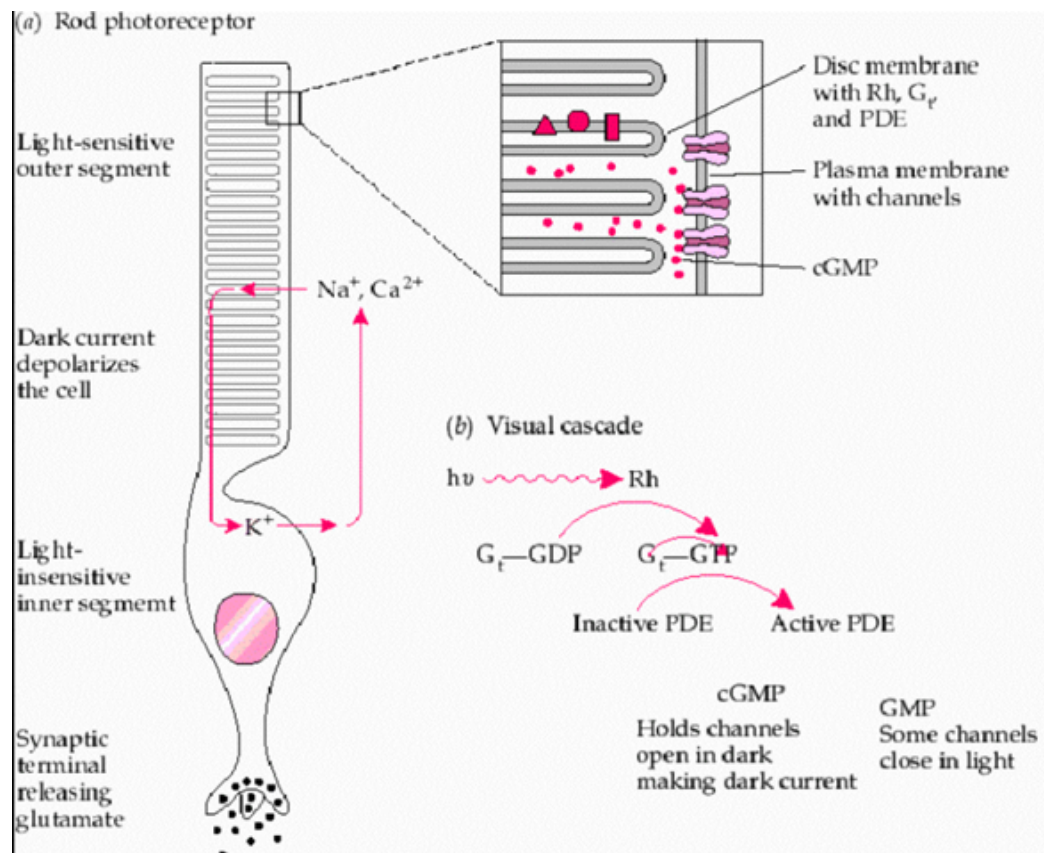


Figura 4. Cascada de Fototransducción. (Feldman. Fundamentals of Neuropsychopharmacology. Fig 6-30). a) La célula se mantiene despolarizada en la oscuridad, mediante la entrada de iones Na⁺ y Ca²⁺ y la salida de iones K⁺, liberando el neurotransmisor glutamato al espacio sináptico; b) La llegada de un fotón de luz activa la rodopsina que interacciona con la transducina y provoca la fosforilación de GDP a GTP. La transducina activa la fosfodiesterasa que es capaz ahora de hidrolizar GMPc, disminuyendo los niveles de éste y provocando el cierre de los canales de Na⁺, Ca²⁺ y K⁺ dependientes de GMPc. El cierre de estos canales provoca una hiperpolarización de la membrana generando el llamado potencial receptor.

I.2. RETINOSIS PIGMENTARIA. DEFINICION

El término de Retinosis Pigmentaria (RP) describe un conjunto de patologías hereditarias caracterizadas por la degeneración progresiva de las células fotorreceptoras de la retina. Se atribuye a Donders quien lo acuñó, entre los años 1855 y 1857, como “retinitis pigmentosa” (término que todavía se utiliza en inglés) creyendo que se trataba de una inflamación de la retina. Los primeros síntomas se caracterizan por la pérdida de visión periférica y ceguera nocturna. Su progresión conduce en la mayor parte de los casos a la ceguera total.

La prevalencia de esta enfermedad entre la población occidental se ha estimado en 1/4000. Se trata de la cuarta causa de ceguera más frecuente después de la retinopatía diabética, el glaucoma y la degeneración macular senil.

Hasta ahora no existe tratamiento para esta enfermedad y, por el momento, lo que se ofrece a los pacientes es seguimiento clínico y consejo genético.

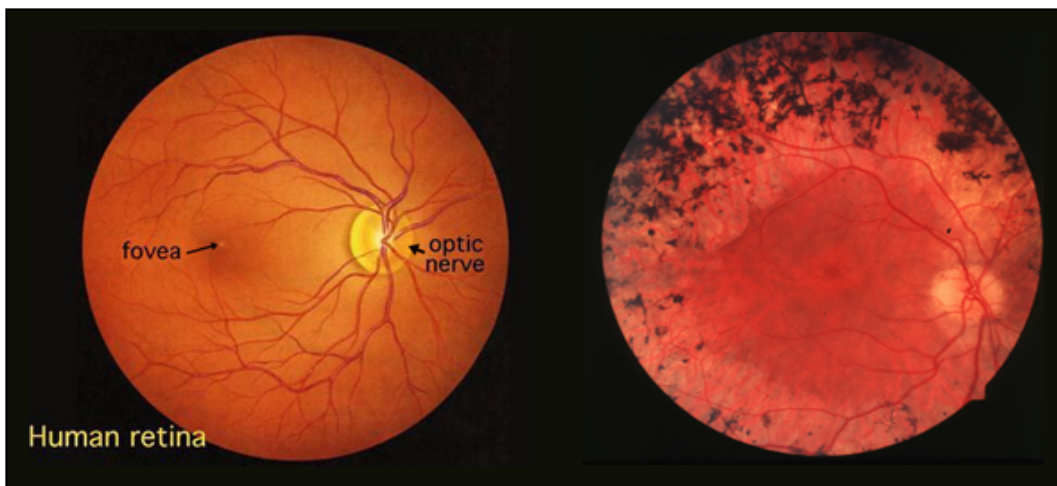


Figura 5. Fondos de ojo de un paciente normal (izquierda) (John Moran Eye Center. Webvision) y de un paciente afectado de retinosis pigmentaria (derecha). En el paciente afectado de retinosis se observan la pigmentación en forma de espículas en la periferia (zona de alta densidad de bastones), característica que da el nombre a la enfermedad, y estrechamiento de los vasos sanguíneos.

I.2.1. Protocolos internacionales de diagnóstico de RP

La RP es una enfermedad que presenta una elevada heterogeneidad clínica (Berson EL, 1993). La aparición de los síntomas es variable, se observan fenotipos que van desde la enfermedad severa de aparición temprana hasta formas limitadas de aparición tardía y evolución lenta.

Esta elevada heterogeneidad hizo necesario el establecimiento de unos criterios comunes a todos los individuos afectados de RP, establecidos internacionalmente en 1982 (Marmor y cols., 1983), que son los siguientes:

- Afectación bilateral.
- Pérdida de la visión periférica.
- Alteración funcional de los bastones, con umbrales anormalmente elevados de adaptación a la oscuridad y/o respuestas en el electroretinograma de amplitud reducida y con tiempos implícitos patológicamente alargados o no detectables.
- Pérdida progresiva de la función de los fotorreceptores (bastones y conos).

Los signos anteriores se traducen en una pérdida de la visión nocturna para el paciente, reducción periférica del campo visual (visión en “cañón de escopeta”) y dificultad en la adaptación a los cambios bruscos de luz. Frecuentemente se observa la presencia de pigmento en el fondo del ojo, característica que da nombre a la enfermedad.

I.2.2. Genética de la retinosis pigmentaria

La retinosis pigmentaria es una enfermedad hereditaria. Además de la elevada heterogeneidad clínica también se observa una gran heterogeneidad genética (Humphries P. y cols., 1992; Dryja T. y cols., 1995).

Desde el punto de vista genético clínico podemos dividir la RP en dos grupos: sindrómico y no sindrómico (Berson EL., 1993; Rivolta C. y cols., 2002).

Los individuos afectados de RP sindrómicas presentan otras patologías extra oculares además de RP.

El origen molecular de las RP sindrómicas reside en la mutación de un gen que se expresa en varios órganos además de la retina. La funcionalidad de la proteína codificada por el gen mutado se pierde o produce un efecto patológico en varios de los tejidos en los que se expresa. En este caso, se observan cuadros clínicos concretos y bien caracterizados que forman síndromes como: síndrome de Bardet-Biedl, síndrome de Laurence-Moon, síndrome de Usher, síndrome de Alstrom, etc... (RetNet; IRPA). En general estos síndromes se transmiten con un patrón de herencia recesivo.

Los individuos afectados de RP no sindrómicas sólo presentan afectación retiniana.

En estos casos, la mutación causante de la enfermedad se localiza en un gen que, al estar mutado, codifica una proteína anómala cuya expresión produce una patología solamente en la retina.

Se ha considerado que las RP no sindrómicas se debían a mutaciones en genes de expresión específica en retina, por lo que la investigación se dirigió a la caracterización de mutaciones en genes candidatos que presentan esta característica. Sin embargo, recientemente, se ha descubierto que mutaciones en genes de expresión ubicua producen RP. Sorprendentemente, y a diferencia de las mutaciones causantes de RP sindrómica, estas mutaciones son patológicas sólo en retina y no parecen afectar a otros tejidos (Mc Kie y cols., 2001).

La retinosis pigmentaria es muy heterogénea. Se han descrito diversas formas de herencia. Se observa además una gran variabilidad clínica entre distintas familias con el mismo patrón de herencia e incluso dentro de la misma familia (Humphries P. y cols., 1992).

Los distintos patrones de herencia que se han observado en esta enfermedad son los siguientes:

- Herencia autosómica dominante (RPAD)

En este tipo de herencia aparecen uno o más afectados en generaciones sucesivas. Varones y mujeres se encuentran afectados por igual. El gen responsable se localiza en los cromosomas autosómicos y presenta dos alelos uno normal y otro mutado. El riesgo de transmisión es del 50% para cada hijo (Fishman y cols., 1985).

- Herencia autosómico recesiva (RPAR)

En este caso sólo encontramos miembros afectados en una misma generación, siendo los progenitores sanos. Varones y mujeres se encuentran afectados con igual gravedad. La probabilidad de padecer la enfermedad (los dos alelos mutados) a partir de dos padres portadores (un alelo normal y otro mutado) es de un 25% para cada hijo. Todos los hijos de un afectado serán portadores. En este tipo de herencia la consanguinidad suele ser un hecho frecuente.

- Herencia ligada al cromosoma X (XLRP)

En este tipo de herencia el gen responsable se encuentra en el cromosoma X. Así sólo los varones padecen la enfermedad (un solo alelo mutado). Las mujeres portadoras (un alelo mutado y otro normal) son, en general, asintomáticas aunque en ocasiones presentan rasgos clínicos de la enfermedad debido a la inactivación al azar del cromosoma X. En las mujeres los síntomas suelen ser mucho más leves, perdiéndose incluso en algunos casos la bilateralidad característica en esta enfermedad. La probabilidad en este caso será de un 50% de tener hijos varones afectados y un 50% de tener hijas portadoras, si la transmisora es una mujer. Cuando el varón es el transmisor, todas sus hijas serán portadoras y ningún hijo varón presentará RP.

- Herencia digénica

En este caso el individuo es portador en heterocigosis de mutaciones en dos genes distintos, no ligados, pero cuyos productos interaccionan.

Este tipo de herencia ha sido descrita en una familia afecta de retinosis pigmentaria, en la que los individuos afectados eran dobles heterocigotos con mutaciones en dos genes diferentes ROM1 y RDS-Periferina (Dryja T. y cols., 1997; Kajiwara K. y cols., 1994). Los progenitores presentaban mutaciones en heterocigosis pero sólo en uno de los dos genes. Los productos de estos dos genes, son dos proteínas que interaccionan entre sí para su activación y constituyen una función estructural esencial en el fotorreceptor.

- Herencia mitocondrial

El ADN mitocondrial presenta una herencia materna característica debido a la proporción elevada de estos orgánulos en las células germinales. Mutaciones en el ADN mitocondrial se han asociado a patologías oftalmológicas hereditarias (Dryja T. y col. 1995).

Los casos aislados o esporádicos (SRP) constituyen un porcentaje (40%) a tener en cuenta en la población afectada de retinosis pigmentaria. Estos casos pueden tratarse de mutaciones de novo. Si esta mutación se ha producido en un gen asociado a RPAD se transmitirá con un patrón de herencia dominante, si se ha producido en un gen asociado a RPAR el patrón será recesivo. Cabe la posibilidad de que se traten de casos pertenecientes a familias RPAR pequeñas o, en los casos de SRP varones, a familias XLRP en las que apenas hay varones. Estos criterios deberán tenerse en cuenta tanto en el consejo genético como en el análisis molecular de estos pacientes.

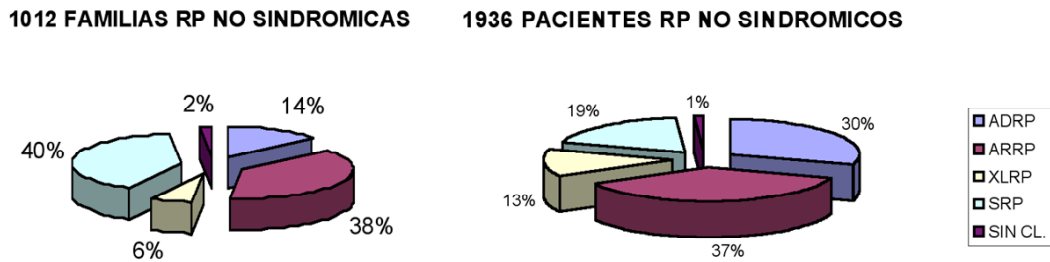


Figura 6. Distribución de las RP no sindrómicas en España: familias e individuos afectados (La Retinosis Pigmentaria en España: estudio clínico y genético. 2001).

Además de la heterogeneidad en el patrón de herencia, se define otro tipo de heterogeneidad genética que denominamos alélica ó no alélica (Lyndsay S. y cols. 1992; Wang MX. y cols. 1995, 2001):

- Heterogeneidad genética alélica: genes involucrados en el desarrollo de la retinosis pigmentaria pueden ser responsables de otras patologías oculares diferentes.
- Heterogeneidad genética no alélica: distintos genes o *loci* son responsables de la misma enfermedad.

Esta elevada heterogeneidad explica la importancia de establecer, tras el diagnóstico oftalmológico, una correcta clasificación genética en cuanto al patrón de herencia que sigue la enfermedad en una familia, ya que, el consejo genético debe basarse en estos criterios, y además, el estudio molecular posterior estará dirigido hacia unos genes u otros dependiendo de la clasificación inicial.

La RP se produce por una alteración en el genoma del paciente lo cual se traduce, desde el punto de vista molecular, en un cambio o mutación en la secuencia de ADN.

Las mutaciones que generan un cambio de aminoácido o un codón de finalización (codón "stop") generan proteínas anómalas o truncadas. Estos cambios se producen en secuencias codificantes o exónicas del gen.

Las mutaciones que afectan a señales de empalme o procesamiento (“splicing”) del RNA mensajero también conducen a la ausencia de la proteína funcional. Estas mutaciones pueden darse tanto en regiones intrónicas, no codificantes, como dentro de las regiones codificantes o exones. Las regiones codificantes contienen algunas secuencias potenciadoras del procesamiento del RNAm, secuencias ESE (“exonic splicing enhancers”). Así, las mutaciones silenciosas (no comportan un cambio de aminoácido en la secuencia proteica) sólo pueden ser descartadas como causantes de la enfermedad si se descarta la co-segregación de éstas con la enfermedad en las familias correspondientes (Maniatis T. y Tasic B., 2002; Cartegni L. y cols., 2002 y 2003).

Así, el cambio en la secuencia conlleva la síntesis de una proteína anómala con deficiencia en su función que puede ejercer un efecto negativo dominante. La mutación puede conducir en otros casos a la inestabilidad de la proteína o a la ausencia de síntesis de la misma, produciéndose así un efecto de alteración de la dosis génica (haploinsuficiencia). Estas situaciones desencadenan, mediante mecanismos aún desconocidos, la degeneración retiniana característica de la RP.

Una parte fundamental en la investigación de retinosis pigmentaria consiste en el aislamiento y caracterización de los genes relacionados con la enfermedad, bien mediante el estudio genético directo de genes candidatos, bien mediante el estudio genético indirecto realizando análisis de ligamiento.

Genes candidatos:

Gen candidato se define como aquel que se expresa de forma específica en un órgano determinado e interviene en la estructura y/o función de éste, en nuestro caso la retina.

Una de las estrategias de estudio se basa en el análisis directo de genes conocidos que codifican proteínas que, de alguna manera, están involucradas en procesos bioquímicos de la visión o tengan una función estructural.

El estudio genético directo de estos genes en las familias afectadas, se basa en el cribado y caracterización de mutaciones a lo largo de su secuencia nucleotídica.

En RP se han propuesto distintos genes que podemos agrupar como:

1- Genes que codifican proteínas que participan en la cascada de fototransducción (Dryja y Li, 1995).

2- Genes que codifican factores de transcripción (Bessant D. y cols., 1999). Es el caso de los genes NRL (Neural retina-linked leucine zipper) y CRX (cone-rod homeobox), ambos involucrados en RPAD.

3- Genes que codifican proteínas estructurales de las células de la retina y tejidos (Arikawa K. y cols., 1992).

Las proteínas Rom1 y Rds/periferina forman homodímeros que constituyen un papel esencial en el mantenimiento de la estructura del segmento externo del fotorreceptor. Los genes que codifican estas proteínas han sido relacionados con retinosis pigmentaria y distrofia macular de tipo autosómico dominante (Farrar G. y cols., 1991; Kajiwara K. y cols., 1991; Bascom RA. y cols., 1995). Otras proteínas importantes en el mantenimiento del tejido retiniano son las metaloproteínas y sus inhibidores.

4- Genes que codifican proteínas de función desconocida.

Son genes que, por su localización en el genoma y su expresión específica de retina, se consideran genes candidatos pero todavía no se conoce su función.

5- Genes que codifican proteínas que intervienen en el control y mantenimiento de la cascada de traducción.

6- Genes que codifican proteínas de transporte.

Genes que codifican proteínas como las pertenecientes a la familia Rab, RPGR (Retinitis pigmentosa GTPase regulator), PDE6D (subunidad delta de la fosfodiesterasa) y Rep-1 (Rab escort protein).

El descubrimiento reciente de que mutaciones en genes de expresión ubicua están implicadas en el desarrollo de RP, obliga a ampliar el concepto de gen candidato. Sin embargo, ya que esta tesis doctoral contempla sólo genes específicos de retina, utilizaremos la definición de gen candidato de manera restrictiva.

Análisis de ligamiento:

En los casos en los que la participación de genes conocidos ha sido excluida se procede a estudiar secuencias de ADN altamente polimórficas o microsatélites (secuencias de ADN repetidas en tándem y no codificantes) SNP's, estas secuencias se encuentran repartidas por todo el genoma y son variables entre la población.

Para los estudios de ligamiento es importante disponer de familias grandes que permitan delimitar secuencias que sólo compartan los individuos afectados. Así, podemos predecir que estas secuencias están ligadas a la enfermedad.

En estos estudios no se determina el gen involucrado pero sí su ubicación (locus) dentro del genoma.

El análisis de familias consanguíneas facilita el análisis de ligamiento especialmente en los genes de carácter recesivo.

Hasta el momento, la retinosis pigmentaria se asocia a 23 genes y 14 *loci*. Dentro de las formas recesivas se han descrito 16 genes y 5 *loci*; para las dominantes 9 genes y 6 *loci* y para las formas ligadas al X, 3 genes y 3 *loci*.

La información completa y actualizada de estos genes se encuentra en el dominio informático RetNet. Esta red constituye un esfuerzo conjunto de los investigadores en el campo de las retinopatías.

La siguiente tabla expone, de manera resumida, los genes y *loci* relacionados con retinosis pigmentaria (Tabla I).

Tabla I. Genes y loci asociados a Retinosis Pigmentaria.

Genes clonados					
Gen	Locus	Nombre Gen/Proteína	Función	Expresión	Herencia
ABCA4	RP19 (1p21-p22)	“ATP-binding cassette (ABC) transporter for retinoids”	Ciclo Vitamina A	Específica retina	Recesiva
CNGA1	RP4 (4p12-cen)	“Rod cGMP-gated cation channel, alpha subunit”	Fototransducción	Específica retina	Recesiva
CNGB1		“Rod cGMP-gated cation channel, beta subunit”	Fototransducción	Específica retina	Recesiva
FSCN2	(17q25)	“Retinal fascin”	Estructural	Específica retina	Dominante
TULP1	RP14 (6p21.3)	“Tubby-like protein 1”	Desconocida	Específica retina	Recesiva
RP1	RP1 (8q11-q13)	“Oxygen-regulated photoreceptor protein”	Desconocida	Específica retina	Dominante
RDS	RP7 (6p21.2-cen)	“Peripherin/Retinal degeneration Slow”	Estructural	Específica retina	Dominante Digénica
ROM1	RP1 (11q13)	“Retinal outer segment membrane protein”	Estructural	Específica retina	Digénica
CRX	CORD2	“Cone-rod homeobox transcription factor”	Factor de transcripción	Específica retina	Dominante Recesiva
NRL	RP27 (14q11.2)	“Neural retina leucine zipper”	Factor de transcripción	Específica retina	Dominante
RHO	RP4 (3q21-q24)	“Rhodopsin”	Fototransducción	Específica retina	Dominante Recesiva

Tabla I. Genes y loci asociados a Retinosis Pigmentaria (cont.).

Genes clonados					
Gen	Locus	Nombre (Gen/Proteína)	Función	Expresión	Herencia
CRB1	RP12 (1q31-q32.1)	“Drosophila crumbs homolog 1”	Interacciones intercelulares	Específica retina	Recesiva
PDE6A	RP29 (5q31.2-q34)	“Rod cGMP phosphodiesterase, alpha subunit”	Fototransducción	Específica retina	Recesiva
PDE6B	RP4 (4p16.3)	“Rod cGMP phosphodiesterase, beta subunit”	Fototransducción	Específica retina	Recesiva
SAG	RP26 (2q37.1)	“Arrestin/s-antigen”	Fototransducción	Específica retina	Recesiva
RLBP1	RP27 (15q26)	“Cellular retinaldehyde-binding protein”	Ciclo Vitamina A	Específica retina	Recesiva
RPE65	RP20 (1p31)	“Retinal pigment epithelium-Specific 65kD protein”	Ciclo Vitamina A	Específica Epitelio Pigmentario Retiniano (EPR)	Recesiva
LRAT		“Lecithin retinol acyltransferase”	Ciclo Vitamina A	Específica Epitelio Pigmentario Retiniano (EPR)	Recesiva
RGR	RP1 (10q23)	“RPE Gprotein-coupled receptor”	Ciclo Vitamina A	Específica Epitelio Pigmentario Retiniano (EPR)	Recesiva
HPRP3	RP18	“Yeast pre-mRNA splicing factor 3 homolog”	Procesamiento ARNm	Ubicua	Dominante
MERTK	RP28 (2q14.1)	“c-mer protooncogene receptor tyrosine kinase”	Fagocitosis	Ubicua	Recesiva
USH2A	USH2A	“Usherin”	Estructural	Ubicua	Recesiva

Tabla I. Genes y loci asociados a Retinosis Pigmentaria (cont.).

Genes clonados					
Gen	Locus	Nombre (Gen/Proteína)	Función	Expresión	Herencia
PRPC8	RP13	“Yeast pre-mRNA splicing factor C8 homolog”	Procesamiento ARN	Ubicua	Dominante
PRPF31	RP11	“Yeast pre-mRNA splicing Factor 31 homolog”	Procesamiento ARN	Ubicua	Dominante
RPGR	RP3 (Xp21.1)	“Retinitis pigmentosa GTPase regulator”	Desconocida	Ubicua	Ligada al X
RP2	RP2 (Xp11.3) (Xp13.3)	“Novel protein similar to human cofactor C” “PGK (phosphoglycerate)”	Desconocida	Ubicua	Ligada al X
<u>Loci/Genes no descritos</u>					
Símbolo	Localización	Herencia			
RP10	7q31.3	Dominante			
RP17	17q22	Dominante			
RP22	16p12.1-p12.3	Recesiva			
RP23	Xp22	Ligada al X			
RP24	Xp26-q27	Ligada al X			
RP25	6cen-q15	Recesiva			
RP28	2p11-p16	Recesiva			
RP29	4q32-q34	Recesiva			
RP6	Xp21.3-p21.2	Ligada al X			
RP9	7p15-p13	Dominante			