



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Neuropatía óptica hereditaria de Leber: factores pronósticos, tratamiento actual y estudio de la microvascularización retinocoroidea mediante tecnología “swept source”

Lorena Castillo Campillo

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

NEUROPATÍA ÓPTICA HEREDITARIA DE LEBER: factores pronósticos, tratamiento actual y estudio de la microvascularización retinocoroidea mediante tecnología “swept source”

Memoria de tesis doctoral presentada por **Lorena Castillo Campillo**
para optar al grado de doctora por la Universidad de Barcelona

Dirigida por:

Josep Maria Caminal Mitjana

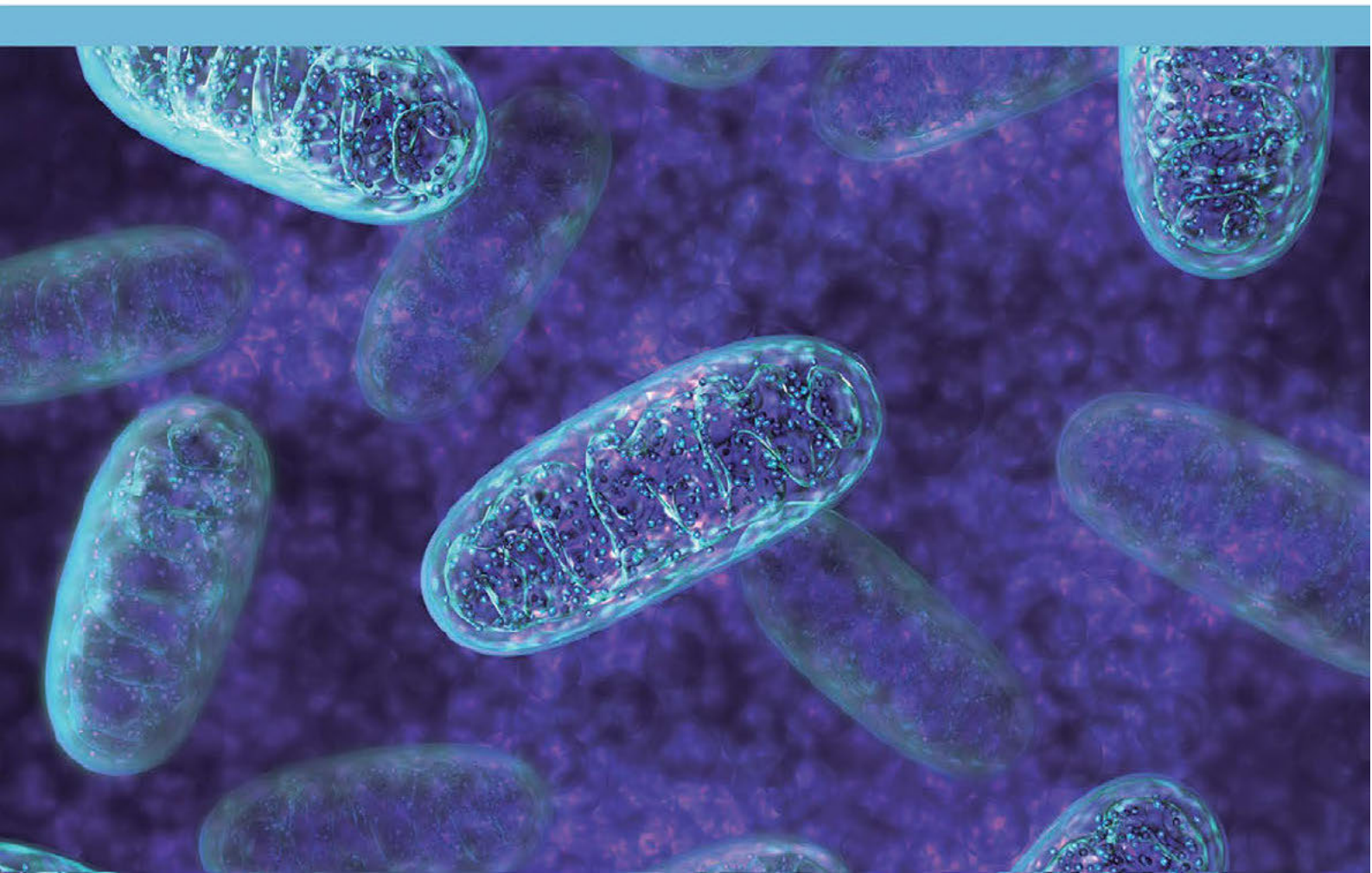
Profesor Asociado de la Universidad de Barcelona
Jefe del Servicio de Oftalmología
Hospital Universitario de Bellvitge

Lluís Arias Barquet

Profesor Agregado de la Universidad de Barcelona
Jefe de Sección de Retina
Hospital Universitario de Bellvitge

Programa de Doctorado en Medicina e Investigación Traslacional
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Barcelona

Mayo de 2023



NEUROPATÍA ÓPTICA HEREDITARIA DE LEBER: factores pronósticos, tratamiento actual y estudio de la microvascularización retinocoroidea mediante tecnología “swept source”

Memoria de tesis doctoral presentada por **Lorena Castillo Campillo**
para optar al grado de doctora por la Universidad de Barcelona

Dirigida por:

Josep Maria Caminal Mitjana

Profesor Asociado de la Universidad de Barcelona
Jefe del Servicio de Oftalmología
Hospital Universitario de Bellvitge

Lluís Arias Barquet

Profesor Agregado de la Universidad de Barcelona
Jefe de Sección de Retina
Hospital Universitario de Bellvitge

Programa de Doctorado en Medicina e Investigación Traslacional
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Barcelona

Mayo de 2023

AUTORIZACIÓN DE LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS

El Dr. Josep Maria Caminal Mitjana, Profesor Asociado de la Universidad de Barcelona y Jefe del Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario de Bellvitge, con DNI: [REDACTED] y el Dr. Lluís Arias Barquet, Profesor Agregado de la Universidad de Barcelona y Jefe de Sección de Retina del Hospital Universitario de Bellvitge, con DNI: [REDACTED]

DECLARAN QUE:

La memoria de tesis presentada por la Sra. Lorena Castillo Campillo con título "Neuropatía óptica hereditaria de Leber: factores pronósticos, tratamiento actual y estudio de la microvascularización retinocoroidea mediante tecnología «swept source»", ha sido realizada bajo nuestra dirección y que autorizamos su depósito para ser defendida y juzgada por un tribunal.

Firmado el día 24 de abril de 2023.



Director



Director



DECLARACIÓN DE LA PERSONA DOCTORANDA Y DE LAS PERSONAS QUE DIRIGEN DE LA ORIGINALIDAD Y BUENAS PRÁCTICAS DE LA TESIS

El Dr. Josep Maria Caminal Mitjana, Profesor Asociado de la Universidad de Barcelona y Jefe del Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario de Bellvitge, con DNI: [REDACTED] el Dr Lluís Arias Barquet, Profesor Agregado de la Universidad de Barcelona y Jefe de Sección de Retina del Hospital Universitario de Bellvitge, con DNI: [REDACTED] y la doctoranda Lorena Castillo Campillo, con DNI [REDACTED]

DECLARAN QUE

La tesis doctoral, con título “Neuropatía óptica hereditaria de Leber: factores pronósticos, tratamiento actual y estudio de la microvascularización retinocoroidea mediante tecnología «swept source»”, es original, conteniendo resultados e información fruto de investigación propia, y que no contiene plagios de otras tesis, publicaciones o investigaciones de otros autores. Asimismo, confirman que se han seguido los códigos éticos y de buenas prácticas, para su elaboración. Manifiestan que consienten que la memoria de tesis pueda ser sometida a procedimientos para la comprobación de su originalidad.

Para que así conste, firman el 24 de abril de 2023.



Director



Director



DECLARACION DE AUTORIA DE LA TESIS

La doctoranda Sra. Lorena Castillo Campillo, con DNI [REDACTED]

DECLARA QUE

Es autora de la tesis doctoral titulada "Neuropatía óptica hereditaria de Leber: factores pronósticos, tratamiento actual y estudio de la microvascularización retinocoroidea mediante tecnología «swept source»".

Firmado el día 24 de abril de 2023.



La doctoranda

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, el Dr. Josep Maria Caminal y el Dr. Lluís Arias, por su tiempo y dedicación. Desde que empecé mis primeros pasos como residente, siempre les he tenido una gran admiración y estima.

Al Dr. Jorge Arruga, por sus enseñanzas. Tuve la suerte de caminar con él por los senderos de la Neuroftalmología durante 14 años. El cariño persistirá siempre.

A todos los compañeros de ICR que, de una u otra forma, han contribuido a hacer realidad esta tesis. Empezando por los Directores Médicos, el Dr. Ignasi Jürgens y el Dr. Alfonso Antón, por creer en mi proyecto y permitirme desarrollarlo. Muy afectuosamente, a mis compañeras de Departamento. Clara, tú iniciaste un viaje lejos de nosotros, pero no sólo dejaste una huella imborrable, sino que, desde la distancia, has sido una pieza clave en esta tesis. Muchas gracias por tu implicación y, sobre todo, por tu amistad. Cecilia, gracias por estar ahí y porque, como tú me dijiste hace unos días, «somos un equipo». Alba y Rosa, gracias por vuestra forma de ser y por vuestro tiempo. Nela, muchas gracias por apoyarme siempre. A todos los compañeros del Departamento de Optometría, empezando por Luis González, por su gran labor y ayuda. Hanan, ¡te echamos de menos! ¡Muchas gracias por recorrer conmigo parte del camino! A todos los compañeros que formáis parte del grupo control, vosotros o vuestros familiares. ¡No fue nada fácil conseguirlo con los criterios tan estrictos de apareamiento por sexo y edad! Antonio y Virginia, gracias por vuestra disponibilidad y amabilidad. ¡Gracias a todos los que vinisteis los sábados en vuestro tiempo libre!

A mis compañeros del Grupo de Trabajo de Neuroftalmología, por las experiencias compartidas.

Por supuesto, a todos los autores de los artículos.

A ASANOL, por acogerme en su gran familia y por toda la ayuda prestada.

Al Dr. Ricardo Casaroli, por su apoyo y estímulo.

A la Dra. Roser González, por creer en mí y haberse convertido en mi amiga.

A Montse Campos, por su escucha activa, su serenidad y sus sabios consejos.

A mi familia, por acompañarme incondicionalmente y por toda la paciencia y comprensión en los momentos duros que ha habido que sortear durante el recorrido. Monste, gracias por ese tiempo que has sacrificado tú para que lo tuviera yo. Tigist, hija, has tenido una paciencia infinita para ser una niña. A partir de ahora, ya no habrá más «No, mamá no puede, que se tiene que poner con el doctorado...». Gracias por todo, mi pequeña. Y a ti, Sergio... Me siento pequeña al mirarte. Has sido mi soporte, mi aliento, mi motor... Me has ayudado también en el plano profesional... ¿Cómo describirlo? No podía haber encontrado un compañero de viaje mejor. Esta tesis también es tuya.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	14	5. HIPÓTESIS	51
2. ENUMERACIÓN DE LOS ARTÍCULOS DE TESIS	16	6. OBJETIVOS	53
3. RESUMEN	18	7. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS	55
4. INTRODUCCIÓN	23	7.1. NATURAL HISTORY OF PATIENTS WITH LEBER HEREDITARY OPTIC NEUROPATHY—RESULTS FROM THE REALITY STUDY	55
4.1. VISIÓN GENERAL DE LA ENFERMEDAD	23	7.2. REAL-WORLD CLINICAL EXPERIENCE WITH IDEBENONE IN THE TREATMENT OF LEBER HEREDITARY OPTIC NEUROPATHY	66
4.1.1. Importancia	23	7.3. QUANTITATIVE ASSESSMENT OF MACULAR AND CIRCUMPAPILLARY RETINAL VESSEL DENSITY ACROSS ALL STAGES OF LEBER HEREDITARY OPTIC NEUROPATHY USING SWEEP SOURCE OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY ANGIOGRAPHY	75
4.1.2. Epidemiología	24	7.4. CHORIOCAPILLARIS AND CHOROIDDAL THICKNESS IN ALL LEBER HEREDITARY OPTIC NEUROPATHY STAGES USING SWEEP-SOURCE TECHNOLOGY	87
4.1.3. Fisiopatología	24	8. DISCUSIÓN	107
4.1.4. Fenotipo	30	8.1. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS Y COMPARACIÓN CON LA LITERATURA	108
4.1.5. Tratamiento	34	8.1.1. Factores pronósticos: estudio “REALITY”	108
4.2. FACTORES PRONÓSTICOS	39	8.1.2. Tratamiento con idebenona: programa de acceso expandido	108
4.3. TRATAMIENTO ACTUAL: IDEBENONA	40	8.1.3. Microvascularización retinocoroidea	110
4.4. MICROVASCULARIZACIÓN: BÚSQUEDA DE NUEVOS BIOMARCADORES	42	8.2. FORTALEZAS	116
4.4.1. Antecedentes	42	8.3. LIMITACIONES	116
4.4.2. Angiografía por OCT	44	8.4. APLICACIONES / PERSPECTIVAS FUTURAS	117
4.4.3. Plexos retinianos	46	9. CONCLUSIONES	119
4.4.4. Cambios coroideos	48	10. BIBLIOGRAFÍA	121

1. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ATP	Adenosín trifosfato
CRR	Recuperación clínicamente relevante
CRS	Estabilización clínicamente relevante
DCP	Plexo capilar profundo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAP	Programa de acceso expandido
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
ETDRS	Early treatment retinopathy study
GCL+	Capa de células ganglionares-plexiforme interna
GCL++	Complejo de células ganglionares
iPSC	Células madre pluripotenciales inducidas
JCR	Journal Citation Report
LHON	Neuropatía óptica hereditaria de Leber
logMAR	Logaritmo del ángulo mínimo de resolución
MACV	Mejor agudeza visual corregida
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
nDNA	Ácido desoxirribonucleico nuclear
OCT	Tomografía de coherencia óptica
OCTA	Angiografía por tomografía de coherencia óptica
RGC	Células ganglionares de retina

RNA	Ácido ribonucleico
RNFL	Capa de fibras nerviosas retinianas
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPCP	Plexo capilar radial peripapilar
SCP	Plexo capilar superficial
SD-OCT	Tomografía de coherencia óptica de dominio espectral
SS-OCT	Tomografía de coherencia óptica swept source
TD-OCT	Tomografía de coherencia óptica de dominio temporal

2. ENUMERACIÓN DE LOS ARTÍCULOS DE TESIS

Tesis en formato de compendio de publicaciones.

La tesis consta de 7 objetivos y de 4 artículos (3 indexados y 1 manuscrito enviado a publicar):

1. Yu-Wai-Man, P, Newman, NJ, Carelli, V, La Morgia, C, Biousse, V, Bandello, FM, Clermont, CV, **Castillo L**, Leruez, S, Moster, ML, Cestari, DM, Foroozan, R, Sadun, A, Karanjia, R, Jurkute, N, Blouin, L, Tanel, M, Sahel JA; LHON REALITY Study Group. Natural history of patients with Leber hereditary optic neuropathy-results from the REALITY study. Eye. 2022; 36(4), 818–826.

Factor de impacto 2021: 4.456, Journal Citation Report (JCR): Primer cuartil. Área de conocimiento: Oftalmología.

[Este artículo corresponde a la hipótesis 1 y responde al objetivo 1.](#)

2. Catarino CB, von Livonius B, Priglinger C, Banik R, Matloob S, Tamhankar MA, **Castillo L**, Friedburg C, Halfpenny CA, Lincoln JA, Traber GL, Acaroglu G, Black GCM, Doncel C, Fraser CL, Jakubaszko J, Landau K, Langenegger SJ, Muñoz-Negrete FJ, Newman NJ, Poulton J, Scoppettuolo E, Subramanian P, Toosy AT, Vidal M, Vincent AL, Votruba M, Zarowski M, Zermansky A, Lob F, Rudolph G, Mikazans O, Silva M, Llòria X, Metz G, Klopstock T. Real-World Clinical Experience With Idebenone in the Treatment of Leber Hereditary Optic Neuropathy. J Neuroophthalmol. 2020;40(4):558-565.

Factor de impacto 2020: 3.042, Journal Citation Report (JCR): Segundo cuartil. Área de conocimiento: Oftalmología.

[Este artículo corresponde a la hipótesis 2 y responde al objetivo 2.](#)

3. **Castillo L**, Berrozpe-Villabona C, Miserachs-García S, Haulani H, Gómez-Gutiérrez C, Díaz-García RS, González-Martínez A, Fernández-Sanz G, Morilla-Grasa A, García V, Arias L, Caminal JM, Casaroli-Marano R. Quantitative assessment of macular and circumpapillary retinal vessel density across all stages of Leber hereditary optic neuropathy using swept source optical coherence tomography angiography. Acta Ophthalmol. 2022;100(8):e1646-e1656.

Factor de impacto 2021: 3.988, Journal Citation Report (JCR): Segundo cuartil. Área de conocimiento: Oftalmología.

[Este artículo corresponde a la hipótesis 3 y responde a los objetivos 3, 4 y 5.](#)

4. **Castillo L**, Berrozpe-Villabona C, Miserachs-García S, Haulani H, Gómez-Gutiérrez C, González-Martínez A, Morilla-Grasa A, Arias L, Caminal JM, Casaroli-Marano R. Choriocapillaris and choroidal thickness in all Leber hereditary optic neuropathy stages using swept-source technology. Manuscrito enviado a publicar.

[Este manuscrito corresponde a la hipótesis 3 y responde a los objetivos 6 y 7.](#)

3. RESUMEN

Título

Neuropatía óptica hereditaria de Leber: factores pronósticos, tratamiento actual y estudio de la microvascularización retinocoroidea mediante tecnología “swept source”.

Introducción

La neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) constituye un modelo de disfunción mitocondrial, por lo que los avances en esta patología tienen implicaciones que van mucho más allá de la LHON en sí. Considerada, clásicamente, una enfermedad monogénica, cada vez hay más evidencia de que la LHON es, en realidad, una enfermedad compleja multifactorial. Así, probablemente, un abordaje terapéutico multidisciplinar pueda conseguir mejores resultados que los obtenidos en estudios de tratamientos individuales. En este sentido, es importante conocer los factores pronósticos de la enfermedad, ahondar en el potencial del único tratamiento disponible actualmente y buscar nuevos biomarcadores de la enfermedad.

Hipótesis

En los pacientes con LHON:

1. Cuando la pérdida visual se inicia en la edad adulta, los peores resultados visuales corresponden a la mutación m.11778G>A.
2. El tratamiento con idebenona durante un periodo de tiempo mínimo superior a un año, que fue el límite establecido en el consenso internacional de 2016, puede conseguir mayores tasas de recuperación visual.
3. Aparecen cambios microvasculares retinocoroideos a lo largo de la enfermedad.

Objetivos

1. Evaluar los factores pronósticos que influyen en el resultado visual de los pacientes con LHON.
2. Evaluar la eficacia y seguridad del tratamiento prolongado con idebenona en los pacientes con LHON.
3. Analizar, de manera cuantitativa, los plexos vasculares retinianos, la coriocapilar y el grosor coroideo en todos los estadios de la LHON utilizando tecnología “swept source”.

Métodos

Los factores pronósticos se evaluaron de manera retrospectiva mediante un registro internacional. Se recogieron datos demográficos y de la función visual de los historiales médicos de pacientes con LHON con pérdida visual con alguna de las tres mutaciones más frecuentes de LHON. Se incluyeron 44 pacientes.

El tratamiento con idebenona a largo plazo se estudió de manera retrospectiva en 111 pacientes que habían experimentado el inicio de los síntomas (en el ojo más reciente) durante el año previo al reclutamiento.

La microvascularización retinocoroidea se evaluó de forma prospectiva y transversal en 119 ojos de 60 pacientes con LHON confirmada molecularmente en todos los estadios de la enfermedad y en 120 ojos de 60 participantes sanos (controles). Se realizaron mapas de tomografía de coherencia óptica (OCTA) centrados en: 1) la fóvea, para medir las densidades vasculares en los plexos retinianos maculares capilar superficial (SCP) y profundo (DCP) y en la coriocapilar y 2) el disco óptico, para medir el plexo capilar radial peripapilar (RPCP). El grosor coroideo fue medido en las regiones macular y peripapilar.

Resultados

Los peores resultados visuales fueron obtenidos en los pacientes con la mutación 11778G>A que habían iniciado la pérdida visual después de los 15 años de edad.

En el momento del análisis del tratamiento con idebenona, se habían proporcionado datos de eficacia longitudinal en 87 pacientes. La duración media del tratamiento fue de 25.6 meses. La proporción de pacientes con recuperación visual y la magnitud de esta aumentaron con la duración del tratamiento.

Con respecto a las densidades vasculares retinianas, en los ojos asintomáticos, sólo el SCP mostró cambios significativos en la media o en los sectores correspondientes al haz papilomacular. Sin embargo, en los ojos en estadio crónico, la mayor magnitud de cambio se encontró en el sector temporal del RPCP. El RPCP mostró las correlaciones más fuertes con la agudeza visual y con los parámetros estructurales. La coriicapilar no se afectó significativamente de media ni en el análisis sectorial en ningún grupo, excepto por un ligero cambio en la región superior de los ojos en estadio crónico. El grosor coroideo no mostró cambios significativos en los sectores correspondientes al haz papilomacular excepto en el sector macular nasal interno de los ojos en estadio crónico. No se observó ninguna correlación significativa entre la agudeza visual y la coriicapilar o el grosor coroideo.

Conclusiones

En pacientes con alguna de las tres mutaciones más frecuentes de LHON que inician la pérdida visual en la edad adulta, los peores resultados visuales corresponden a aquellos con la mutación m.11778G>A.

El tratamiento prolongado con idebenona consigue mayores tasas de recuperación visual.

La densidad vascular en los plexos retinianos disminuye conforme la LHON progresa. En la región circumpapilar del haz papilomacular, estos cambios aparecen más tarde que en la mácula pero acaban siendo más profundos y se correlacionan mejor con la agudeza visual y con los parámetros estructurales. La coriicapilar permanece estable en todos los estadios de la LHON. La vascularización coroidea no parece jugar un papel en la fisiopatología de la enfermedad. El grosor coroideo no tiende a afectarse significativamente de media ni en los sectores correspondientes al haz papilomacular. Se necesitan más estudios para evaluar la utilidad clínica de las densidades vasculares retinianas como potenciales biomarcadores de la LHON.

4. INTRODUCCIÓN

4.1. VISIÓN GENERAL DE LA ENFERMEDAD

4.1.1. Importancia

La neuropatía óptica hereditaria de Leber (OMIM:535000, ORPHA:104; también conocida como LHON, por sus siglas en inglés) es una causa importante de ceguera, sobre todo en varones jóvenes, lo que conlleva un alto impacto psicológico, económico y social. Fue descrita inicialmente Von Graefe en 1858 (1) y caracterizada formalmente por Theodore Leber en 1871 (2). Es el prototipo de enfermedad mitocondrial por varios motivos. En primer lugar, es la primera enfermedad en la que se demostró una asociación con mutaciones puntuales del DNA mitocondrial (mtDNA) (3). En segundo lugar, y a pesar de entrar en la denominación de enfermedades raras, es la enfermedad mitocondrial primaria más frecuente (4). En tercer lugar, es la primera enfermedad mitocondrial para la cual la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) aprobó un fármaco (idebenona-Raxone®, en 2015). En cuarto lugar, su característica fisiopatológica principal es una disfunción del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (5). Este es el hallazgo bioquímico más comúnmente encontrado en la disfunción mitocondrial y está ampliamente implicado en el cáncer, la diabetes mellitus, el parkinsonismo e incluso el envejecimiento celular (6). Sin embargo, por razones que no han sido del todo aclaradas, la LHON presenta una predilección selectiva por una única línea celular: las células ganglionares de la retina (RGC), particularmente las del haz papilomacular (7). Esto la convierte en un modelo de estudio de la disfunción mitocondrial y hace que los avances en el conocimiento de esta enfermedad o la aparición de nuevas dianas terapéuticas tengan potenciales implicaciones mucho más allá de la LHON en sí (5-7).

4.1.2. Epidemiología

Establecer la prevalencia de la LHON resulta difícil. Por un lado, un sesgo inherente a las neuropatías ópticas hereditarias es la falta de homogeneidad entre los diferentes sistemas de salud tanto en cuanto al patrón para referir a los pacientes a estudio genético como en cuanto a los paneles genéticos utilizados (8). Por otro lado, en el caso particular de la LHON se añade la complejidad de que existe un alto porcentaje de individuos asintomáticos. En España, no se han realizado estudios de prevalencia. En el noreste de Inglaterra, se ha estimado la prevalencia de individuos sintomáticos en 1:31054 y la de individuos portadores de mutaciones patogénicas de LHON en 1:8500 (9). En Países Bajos y en Finlandia se ha encontrado una prevalencia de pacientes sintomáticos de 1:39000 y 1:50000 respectivamente (10, 11). Los síntomas aparecen mayoritariamente en varones (80-90 % de los casos) (8). El pico de inicio de la pérdida visual está entre los 15 y los 30 años (12), con un rango de 1 a 87 años (8). La edad media de aparición de los síntomas es ligeramente menor en varones (25 años) que en mujeres (30 años) (8). En el 95 % de los casos, los síntomas se inician antes de los 50 años de edad (12). Aunque las mutaciones de novo son raras, hasta en un 40 % de los casos no hay evidencia de antecedentes familiares (12).

4.1.3. Fisiopatología

Actualmente, hay evidencia de que la LHON es, en realidad, una enfermedad compleja multifactorial (5).

4.1.3.1. Mutaciones patogénicas

En la inmensa mayoría de los casos, la causa primaria es una mutación puntual en el mtDNA. En >90 % de los casos, se encuentra una de las tres siguientes: m.11778G>A m.3460G>A o m.14484T>C (7). La más frecuente es la m.11778G>A, responsable de un 70-75 % de los casos globalmente y de aproximadamente un 90 % de los casos en Asia (7, 12, 13). Estas tres mutaciones implican a genes que codifican para diferentes subunidades del complejo I. Otras mutaciones mitocondriales más raras se representan en la figura 1 (8).

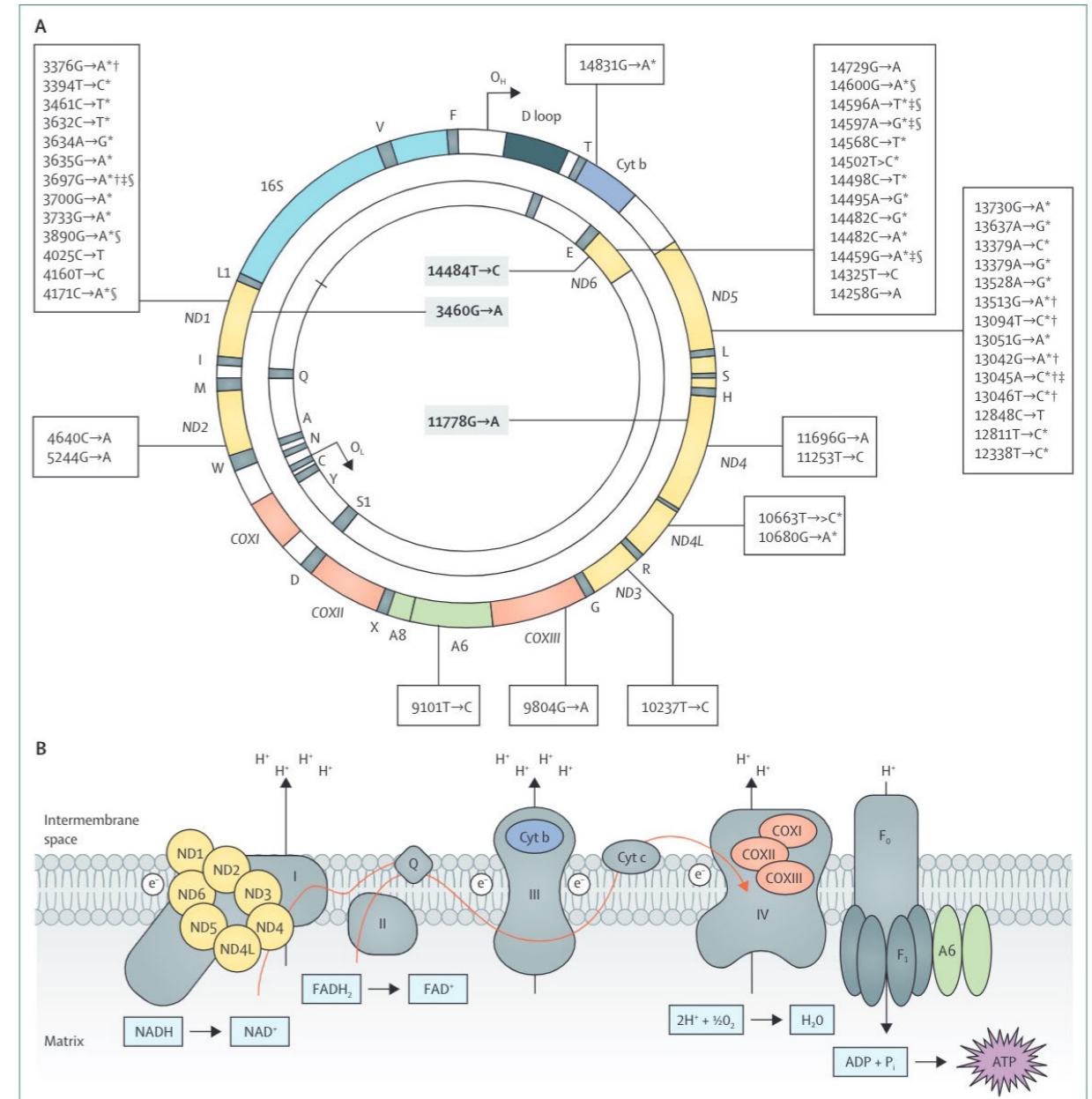


Figura 1. Variantes del mtDNA asociadas a la LHON. (A) Genoma mitocondrial, donde se indica la localización de las variantes asociadas a la LHON. Nótese que casi todas las variantes están localizadas en genes que codifican para subunidades del complejo I de la cadena respiratoria. (B) Representación esquemática de la cadena respiratoria mitocondrial. Las subunidades de los complejos tienen el mismo código de color que los genes mitocondriales donde están codificadas (8).

Las mitocondrias del espermatozoide se destruyen si pasan al cigoto (14), por lo que, clásicamente, se ha considerado que la herencia de la LHON era exclusivamente materna. Sin embargo, este dogma se ha roto recientemente con el hallazgo de mutaciones en el DNA nuclear (nDNA) que pueden causar LHON autosómica recesiva: NDUFS2, DNAJC30 y MCAT (6, 15–17). El gen NDUFS2 codifica para una subunidad del complejo I. El gen DNAJC30 codifica para una proteína chaperona necesaria para un adecuado ensamblaje de diferentes subunidades del complejo I. El gen MCAT codifica para una proteína mitocondrial implicada en la biogénesis de ácidos grasos.

De esta manera, en la práctica totalidad de los casos de LHON, la mutación responsable codifica para una proteína implicada en la formación del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, con lo que el resultado es un complejo I disfuncional. Esto conduce a una alteración en el flujo de electrones, lo que tiene dos consecuencias. Por un lado, se traduce en un menor gradiente electroquímico de protones a ambos lados de la membrana mitocondrial interna y esto, a su vez, en descenso en la producción de ATP (déficit energético). Por otro, los electrones que no siguen la cadena de transporte provocan un incremento en las especies reactivas de oxígeno (ROS; estrés oxidativo). Este hecho parece tener una mayor importancia en la patogenia de la enfermedad, ya que, si alcanzan unos niveles críticos, acaban dando a la célula la señal para entrar en apoptosis (figura 2) (5, 7, 8).

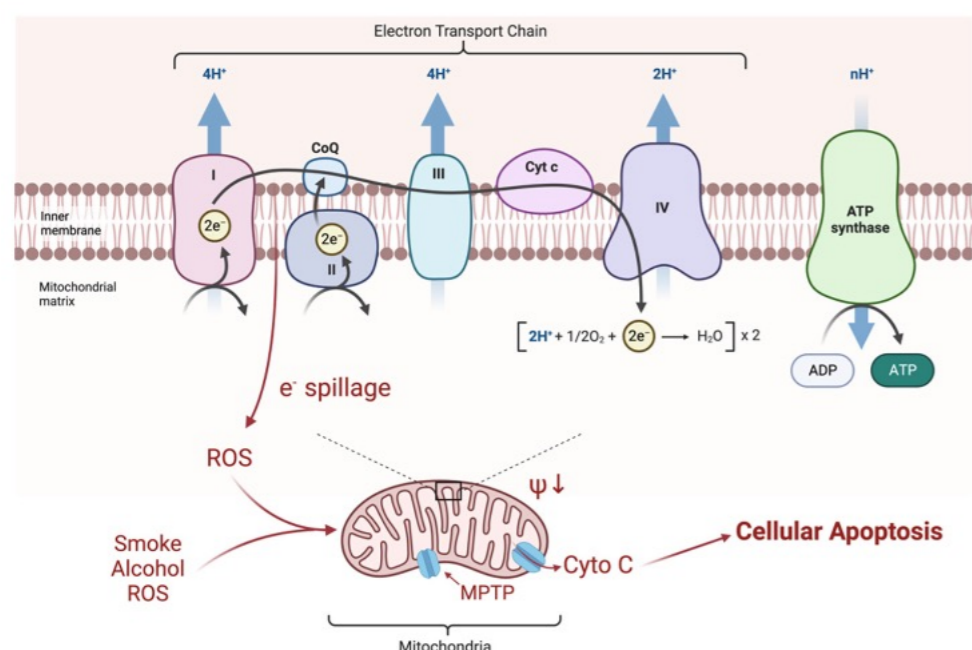


Figura 2. Los electrones se transfieren a lo largo de los complejos. La energía liberada se almacena en forma de gradiente de protones y luego se utiliza para formar ATP. Cuando hay mutaciones en el complejo I, como ocurre en la LHON, se produce un descenso en la producción de ATP pero, en mayor medida, un aumento en la producción de ROS. Si los niveles de ROS alcanzan unos niveles críticos, pueden iniciar la apoptosis de las RGC (7).

4.1.3.2. Otros factores

La LHON se caracteriza por una penetrancia incompleta, con una mayoría de pacientes que no va a presentar ningún síntoma a lo largo de su vida como consecuencia de ser portador de alguna de estas mutaciones (8). De este hecho se deduce que, necesariamente, ha de haber otros factores implicados en la fisiopatología de la enfermedad, que juegan un papel tan importante como la mutación primaria. La formación de supercomplejos en la cadena respiratoria mitocondrial podría mejorar el flujo de electrones y tener un efecto compensador, más o menos

eficiente dependiendo de la mutación en sí (5). Una mitofagia alterada podría conducir a la acumulación de mitocondrias defectuosas e inclinar la balanza negativamente (5). A grandes rasgos, los otros factores implicados en la LHON se pueden dividir en genéticos y ambientales.

4.1.3.2.1. Genéticos

Del mtDNA:

Se considera que el umbral de heteroplasmia para que la enfermedad se vuelva sintomática es del 60 % (12). El 85-90 % de los casos sintomáticos presenta la mutación en homoplasmia (18), de lo que se deduce que estas mutaciones, per se, son poco patógenas. El haplogrupo (conjunto de polimorfismos mitocondriales estables que se encuentra en individuos descendientes de un ancestro común vía materna) modifica la penetrancia de la enfermedad (5, 14). Incluso se ha descrito que combinaciones peculiares de polimorfismos (ninguno de ellos patológico por sí mismo) pueden ser suficientes para causar LHON sintomática (19). También se ha propuesto que un elevado número de moléculas de DNA mitocondrial (que podría alcanzarse con un aumento de la biogénesis) podría tener un papel protector, aunque este hallazgo es controvertido (5).

Del nDNA:

El nDNA también parece tener un papel regulador, puesto que contiene genes que codifican proteínas reguladoras de la función mitocondrial (5). Además, el sexo contribuye a la expresión de estrógenos, los cuales parecen tener un papel protector y explicar la causa de la predilección de afectación en varones (5,7).

4.1.3.2.2. Ambientales

Ciertos factores ambientales pueden modificar la penetrancia de la enfermedad incrementando el estrés oxidativo en las RGC o, en menor medida, aumentando sus necesidades energéticas. Se ha demostrado el papel perjudicial del tabaco y de las dosis altas de alcohol. Los fármacos con toxicidad mitocondrial también pueden actuar como precipitantes de la enfermedad. Se ha propuesto que también pueden jugar un papel otras drogas recreativas, el envejecimiento, la luz azul, el traumatismo cerebral, la hipertensión ocular, la cirugía intraocular, la inflamación y el estrés. La dieta también parece estar implicada (por ejemplo, el efecto negativo de un déficit de vitamina B12) (5). Por otro lado, a los estrógenos, que modulan la expresión de genes mitocondriales y parecen aumentar la biogénesis, se les ha atribuido un papel neuroprotector (20).

4.1.3.3. Vulnerabilidad selectiva de las células ganglionares de retina

Uno de los enigmas de la LHON es por qué, aunque la mutación primaria se encuentre en todas las células del organismo, si se producen síntomas, estos suelen consistir únicamente en pérdida visual. Tradicionalmente, se ha atribuido la vulnerabilidad selectiva de las RGC a sus altas demandas energéticas. Sin embargo, debe de haber otros factores añadidos, puesto que otras células del organismo pueden tener las mismas demandas energéticas (como otras neuronas del sistema nervioso central o incluso los fotorreceptores). Actualmente, se cree que el factor más importante es la anatomía única de las RGC (figura 3) (5,7,8).

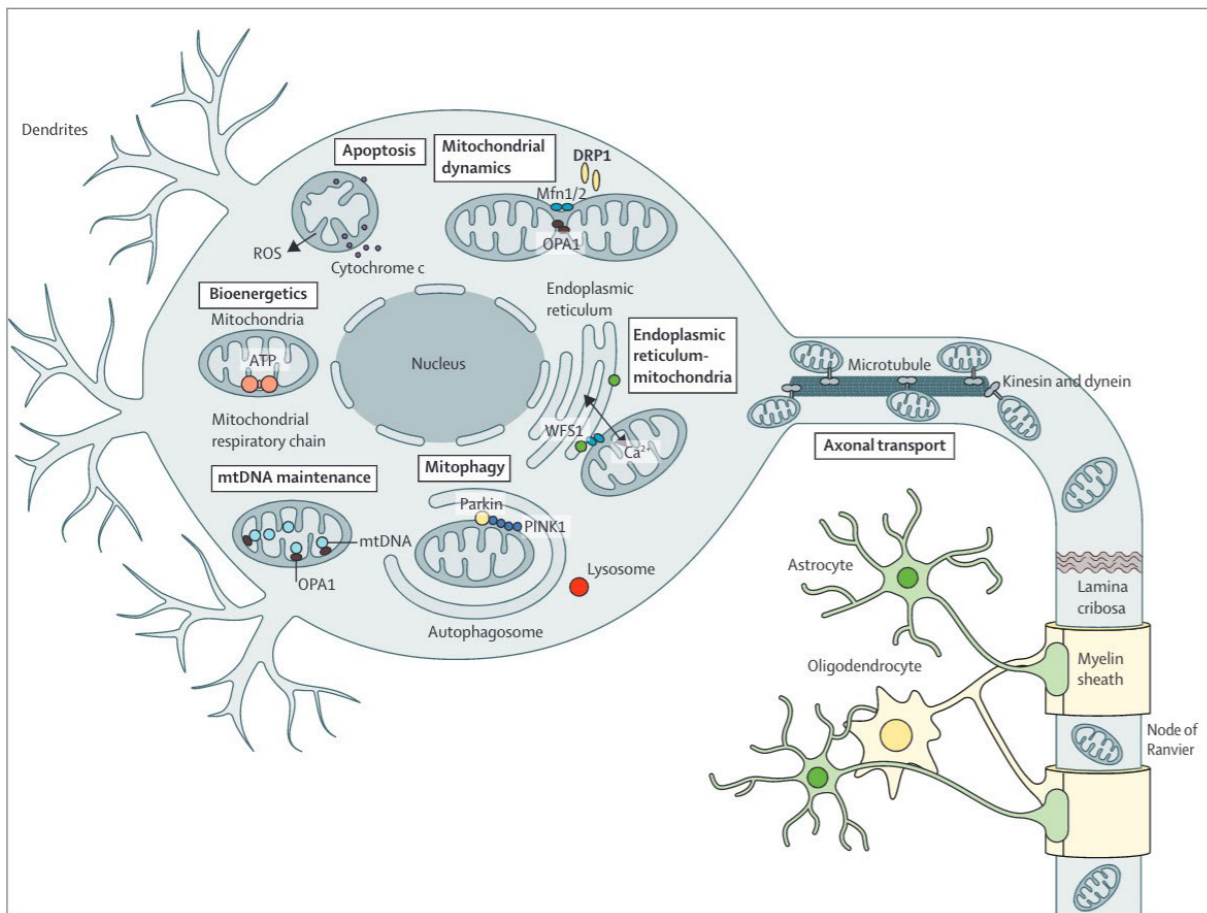


Figura 3. Representación esquemática de una RGC que ilustra su anatomía única y la particular vulnerabilidad de este tipo de neurona. La porción prelamina de sus axones no está mielinizada y precisa una alta concentración de mitocondrias (8).

En los axones mielinizados, la conducción es saltatoria entre los nódulos de Ranvier. Las RGC tienen un largo trayecto del axón (el prelamina) que no está mielinizado. Esto les permite mantener la transparencia de la retina (necesaria para una buena visión) pero, a cambio, mantener una velocidad adecuada de transmisión de los impulsos nerviosos conlleva un coste energético extra. Para conseguirlo, necesitan contener una alta concentración

de mitocondrias en la porción prelamina, lo cual las predispone a la disfunción mitocondrial, especialmente en el contexto de una biogénesis alterada. Los axones del haz papilomacular, con su pequeño calibre, contienen menos mitocondrias y tienen un índice área/membrana seis veces superior a las fibras del lado nasal al disco óptico, lo que explica que sean las primeras en morir (figura 4) (7).

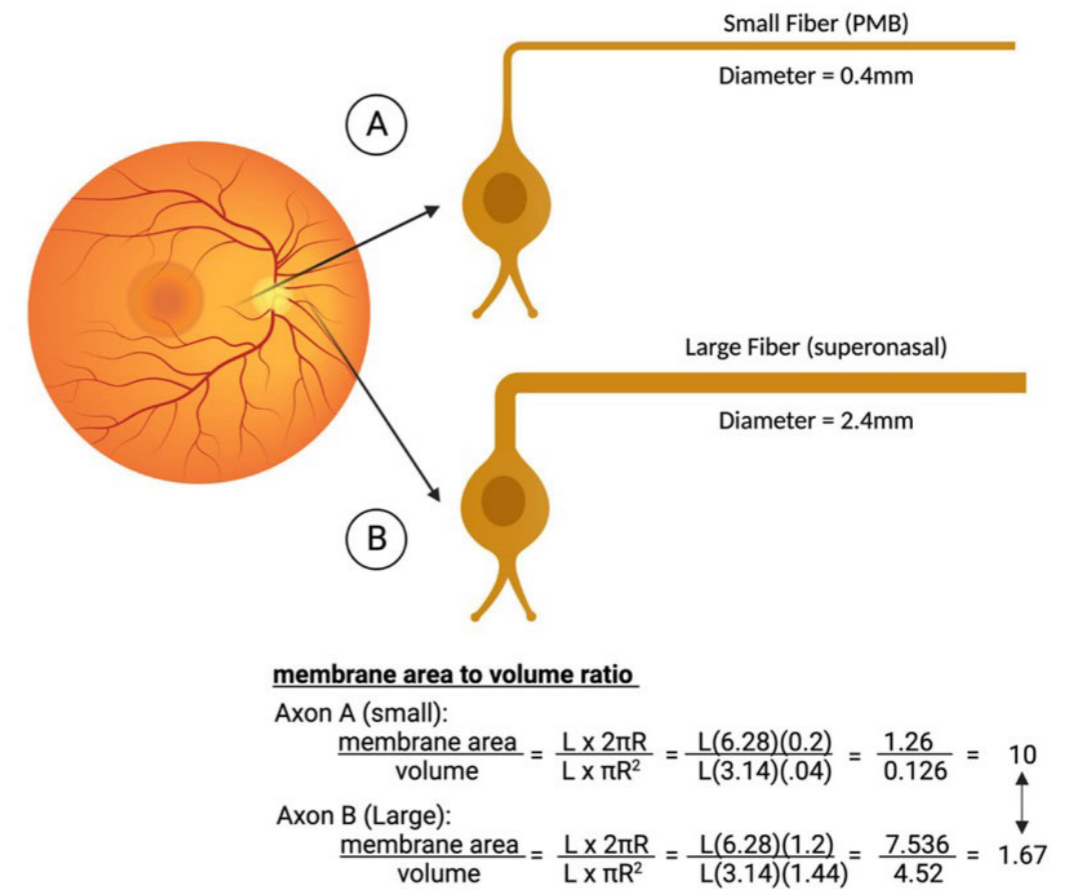


Figura 4. Comparación de la tensión metabólica entre los axones de las RGC, según su calibre. (A) Los pequeños axones que están concentrados en el haz papilomacular tienen un diámetro de sólo 0.4 mm. Comparado con los axones más grandes de la retina nasal (B), el haz papilomacular tiene un volumen mucho más reducido y, por tanto, menos mitocondrias. Aunque su superficie es también algo menor, el índice área/membrana es seis veces superior en las fibras pequeñas, lo que explica que sean las primeras en morir en la LHON (7).

Por otro lado, la acumulación de mitocondrias disfuncionales en una célula puede desencadenar la apoptosis. El único mecanismo del que disponen las células para degradar y reciclar las mitocondrias dañadas y mantener, así, una población mitocondrial sana es la mitofagia. Una mitofagia defectuosa se ha asociado a algunas enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis lateral amiotrófica, el glaucoma normotensivo y la demencia (5). Estudios en híbridos sugieren que la mitofagia también está implicada en la LHON (21). La transmitofagia (también llamada mitofagia transcelular) es un mecanismo único de degradación mitocondrial cuya

existencia, por ahora, sólo se ha descrito en las RGC (figura 5) (5). Sorprendentemente, el número de mitocondrias degradadas por astrocitos a través de esta vía es aproximadamente el mismo que el que se degrada en el soma de las RGC, lo que permite especular que la transmitofagia podría jugar un papel en la LHON.

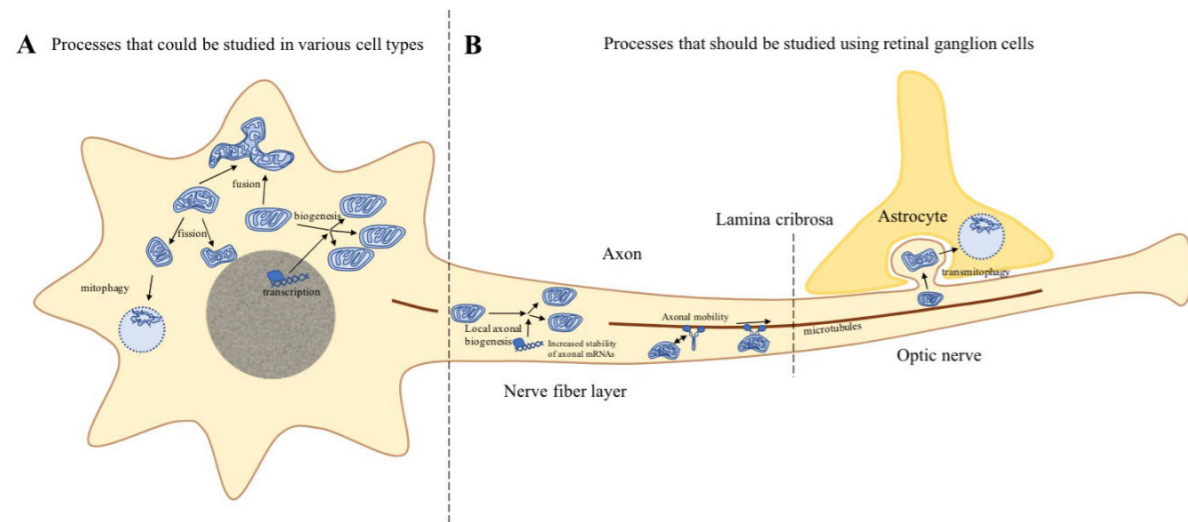


Figura 5. Regulación mitocondrial en la LHON. La producción, control de calidad y degradación de las mitocondrias dañadas en las RGC implican varios procesos. Algunos de estos, como la biogénesis, fisión, fusión y mitofagia, son comunes a otros tipos de células (A). Sin embargo, otros, como la transmitofagia (o mitofagia transcelular) sólo se ha identificado, por ahora, en las RGC (B) (5).

4.1.4. Fenotipo

4.1.4.1. Presentación clásica

Pérdida visual

La mayoría de los individuos portadores de alguna de las mutaciones patogénicas de LHON no va a experimentar ningún síntoma a lo largo de su vida como consecuencia de ello. En aproximadamente un 10 % de las mujeres y un 50 % de los varones portadores (18) (descrito entre 4-32 % y 18-51 % respectivamente) (8) aparece pérdida visual. La presentación clínica habitual es una pérdida de visión central, indolora, bilateral secuencial en un varón joven previamente sano. Típicamente, comienza de manera aguda o subaguda en un ojo y se sigue de un patrón similar en el ojo contralateral en semanas o meses (mediana: 6-8 semanas) (8, 12). Sin embargo, un 25-50 % de los pacientes percibe el inicio de los síntomas en ambos ojos de manera simultánea (13). Pasado un año desde el inicio, ambos ojos están afectados en >97 % de los casos (8, 13, 14). La agudeza visual sufre un deterioro progresivo durante semanas o meses (típicamente, 4-6 meses, aunque puede tardar hasta 8 meses), en que se alcanza el llamado "nadir" (4, 8, 22). La mayoría de las veces, la agudeza visual disminuye hasta ≤ 0.1 en

la escala decimal (ceguera legal) en ambos ojos de manera permanente y se acompaña de densos escotomas centrales o centrocecales (8, 14, 23, 24).

Actualmente, la LHON se clasifica en 4 estadios: asintomático (portadores que no han experimentado pérdida visual), subagudo (<6 meses desde el inicio de la pérdida visual), dinámico (6-12 meses desde el inicio de la pérdida visual) y crónico (>12 meses desde el inicio de la pérdida visual) (4) (figura 6). Hay que tener en cuenta que la conversión (paso de asintomático a sintomático) se define como el momento en que el paciente nota la pérdida visual (22). En ocasiones, en el estadio asintomático se pueden encontrar hallazgos clínicos sutiles, como escotomas paracentrales o arciformes, alteraciones en la visión cromática o en la sensibilidad al contraste o respuestas electrofisiológicas deprimidas (7, 14).

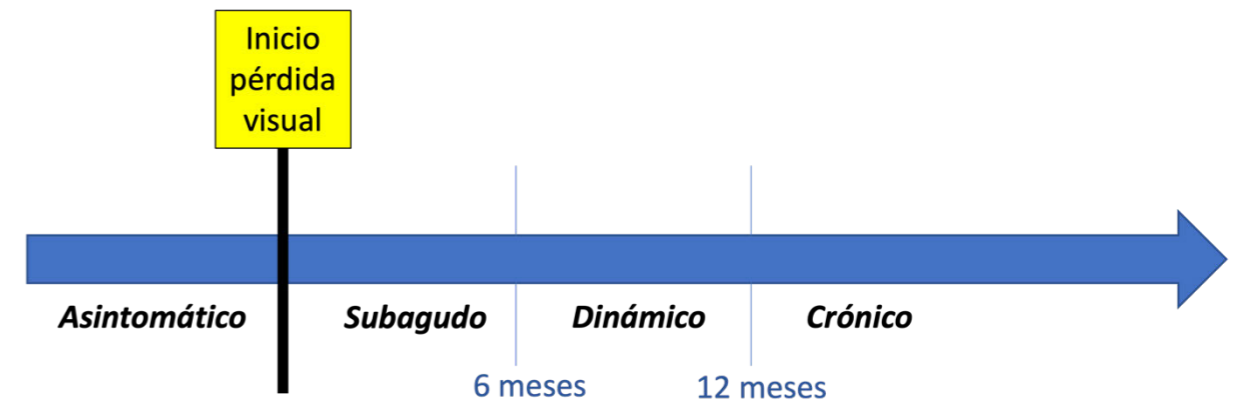


Figura 6. Clasificación actual de la LHON en 4 estadios, tomando como referencia el inicio de la pérdida visual (figura original de la persona doctoranda).

Ausencia de DPAR

Generalmente, en la LHON no se encuentra defecto pupilar aferente, incluso en casos de pérdida visual severa unilateral. Este hecho se explica porque el subtipo de RGC implicadas en el reflejo pupilar (RGC melanopsínicas o intrínsecamente fotosensibles) son, de algún modo, más resistentes a la disfunción mitocondrial y, por tanto, suelen estar preservadas en la LHON (5).

Hallazgos funduscópicos.

Al inicio de los síntomas (estadio subagudo) puede haber microangiopatía, con telangiectasias peripapilares, y elevación de la capa de fibras nerviosas retinianas (RNFL) peripapilares (pseudodema, ya que no fuga en la angiografía fluoresceínica) (7, 14). Es importante resaltar dos aspectos de estos llamados signos clásicos. Por un lado, es posible observarlos en el estadio asintomático, sin que tengan valor pronóstico (en algunos de estos pacientes nunca se llega a producir pérdida visual) y pueden permanecer o desvanecerse y desaparecer con el tiempo.

Por otro lado, hasta en el 50 % de los casos no se detecta ninguno de estos cambios cuando el paciente nota la pérdida visual y el fondo de ojo es completamente normal (12, 14, 25). En el caso de detectarse estas alteraciones fundoscópicas al inicio de los síntomas, desaparecen a las 6-8 semanas y dan paso a palidez papilar, sobre todo temporal, lo que refleja la afectación preferencial del haz papilomacular. A los 6-12 meses desde el inicio (es decir, en los estadios dinámico o crónico), la atrofia óptica difusa es el hallazgo más común (figura 7) (8, 12).

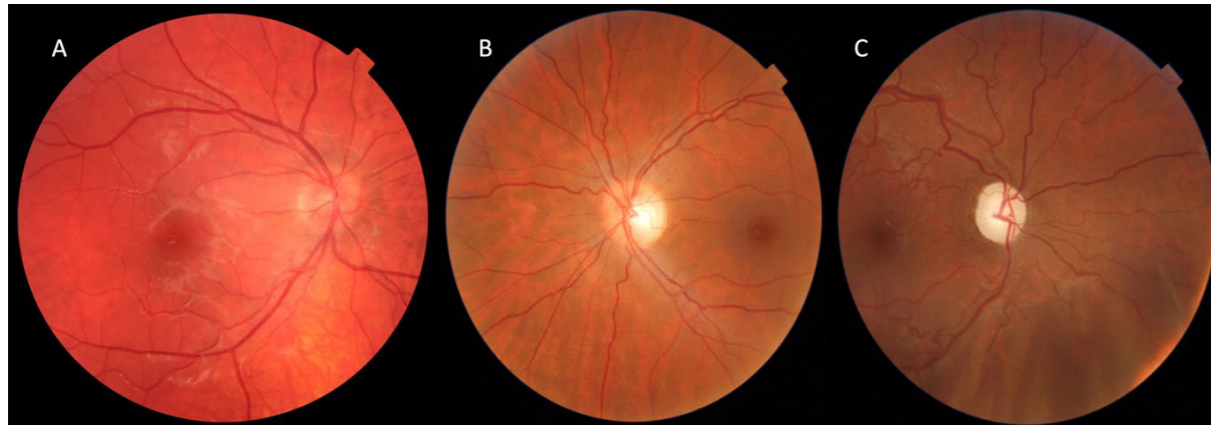


Figura 7. (A) Ligera elevación de la RNFL y telangiectasias peripapilares inferiores visibles 3 semanas después del inicio de los síntomas. (B) Palidez papilar temporal en el ojo izquierdo de un paciente que había iniciado la pérdida visual 3 meses antes. (C) En el estadio crónico, la atrofia óptica difusa es el hallazgo más común (figura original de la persona doctoranda).

Cambios en la tomografía de coherencia óptica (OCT)

En el estadio asintomático, puede haber elevación de la RNFL peripapilar en el sector temporal (y, en menor medida, en el inferior) (4,26), probablemente debido a un aumento compensatorio en la biogénesis y/o a estasis axonal (27). Se ha comprobado que la disminución de grosor de la capa de células ganglionares-plexiforme interna (GCL+) macular empieza alrededor de 6 semanas antes del inicio de la pérdida visual en individuos en que ya se había afectado el ojo contralateral, y comienza en la porción interna del sector nasal (27). La pérdida de GCL+ va progresando en un patrón centrífugo en espiral, hasta hacerse completa en 4-6 meses (4, 27). Durante este estadio subagudo, la RNFL peripapilar presenta un patrón de superposición de pseudoedema y atrofia que se desarrolla de manera asincrónica: el pseudoedema comienza en los sectores temporal e inferior y se puede detectar al inicio de la pérdida visual, mientras que aparece más tarde en los sectores superior y nasal, donde es máxima a los 3 meses del inicio; el orden de la atrofia es temporal, inferior, superior y nasal (26). Durante el estadio dinámico, la GCL+ macular no sufre una mayor reducción significativa, mientras que la RNFL peripapilar continúa adelgazándose en los sectores nasal y temporal y se suele estabilizar al año, momento en el que se alcanza el estadio crónico (figuras 8 y 9) (4).

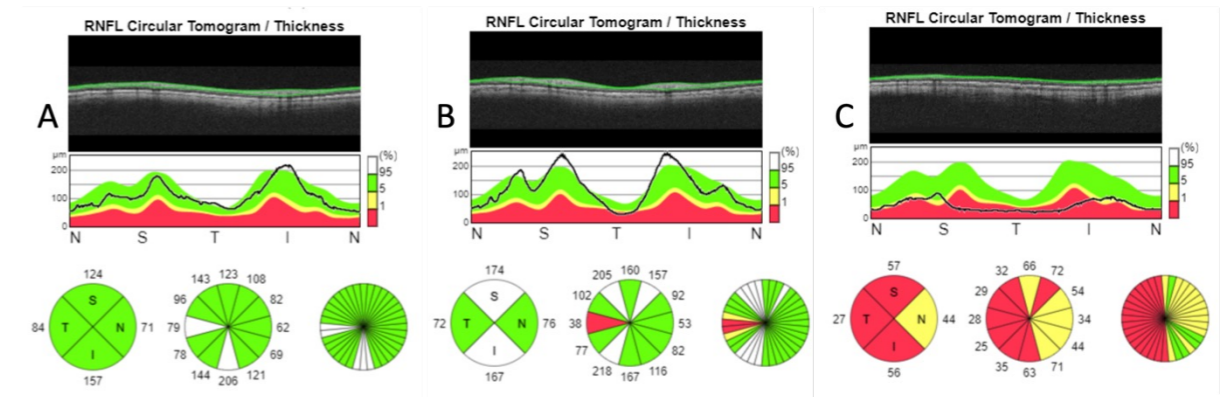


Figura 8. Evolución de la RNFL peripapilar en la LHON. (A) En el estadio asintomático, puede haber elevación de los sectores temporal e inferior. (B) En el estadio subagudo, se superpone un patrón de elevación y atrofia (la atrofia comienza en el sector temporal). (C) La atrofia va empeorando durante el estadio dinámico y suele estabilizarse al año (figura original de la persona doctoranda).

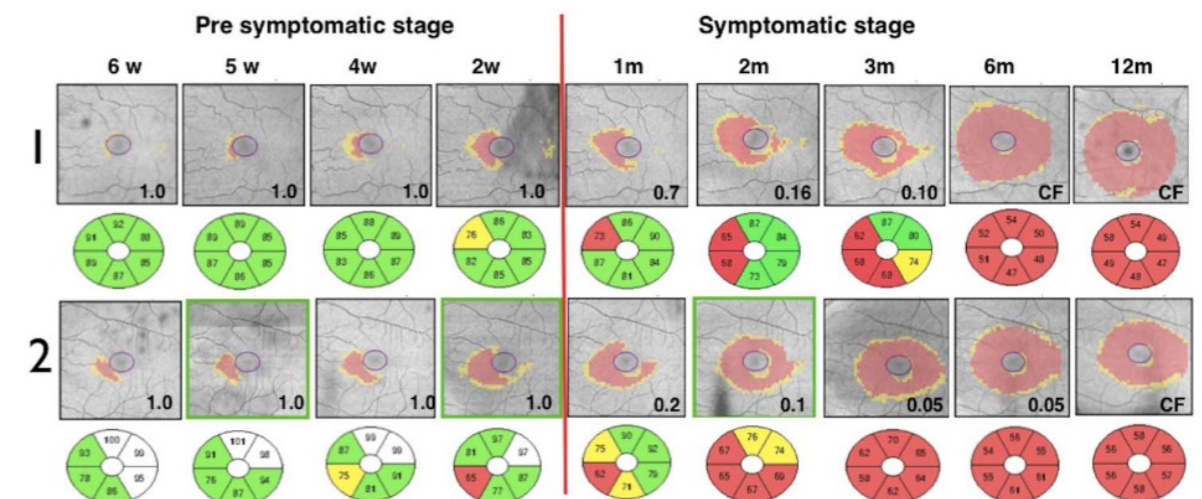


Figura 9. Mapas de desviación y sectoriales de la GCL+ macular en los ojos de dos pacientes que se examinaron antes de que iniciaran los síntomas en el segundo ojo. Se detectó un adelgazamiento nasal, inicialmente en el mapa de desviación, que fue progresando en un patrón espiral centrífugo (27).

Neuroimagen

La resonancia magnética suele ser normal en la LHON. En el primer año tras el inicio de los síntomas, se ha descrito hiperintensidad en T2 en la zona posterior de los nervios ópticos y agrandamiento del quiasma (28). También se han encontrado casos de aumento de señal del nervio óptico sin realce y de distensión de la vaina, secundarios a edema leve y gliosis en la fase atrofica (12).

4.1.4.2. Otras manifestaciones

Aunque, típicamente, la pérdida visual es la única manifestación de la LHON, en ocasiones puede haber otras manifestaciones. En algunos pedigrís, se han encontrado alteraciones de

la conducción cardíaca, como síndromes preexcitatorios, pero no se ha demostrado que exista una relación causal (8). También se han descrito leves alteraciones neurológicas y musculoesqueléticas. Raramente, la LHON se puede asociar a alteraciones neurológicas mayores, como degeneración de ganglios basales con distonía de inicio precoz, espasticidad, trastornos psiquiátricos o encefalopatía. Para estos casos, se ha acuñado el término de “LHON-plus” (8, 12). Una minoría de los pacientes de LHON (predominantemente, mujeres de raza caucásica con la mutación m.11778G>A) presentan un cuadro clínico-radiológico indistinguible de la esclerosis múltiple y a esto se le ha llamado “síndrome de Harding” (12). Parece ser, sin embargo, que la concurrencia de LHON y esclerosis múltiple se debe al azar (29), aunque la coexistencia de las dos enfermedades sí podría ejercer una influencia mutua (coincidencia con influencia).

4.1.5. Tratamiento

Hasta la fecha, no existe ningún tratamiento curativo para la LHON y el manejo debe ser holístico (8). Se debe desaconsejar el consumo de tóxicos. Sin embargo, no hay suficiente evidencia para desaconsejar de manera sistemática el consumo de fármacos con potencial toxicidad mitocondrial y debe valorarse individualmente el riesgo/beneficio en cada caso (30). Son importantes las ayudas para baja visión y los grupos de trabajo/asociaciones de pacientes. A este respecto, en España, tenemos la suerte de contar con la Asociación de Atrofia del Nervio Óptico de Leber (ASANOL), una entidad sin ánimo de lucro creada en 2010 y que, desde el año 2017, cuenta con la declaración de utilidad pública. Se han propuesto algunos tratamientos para los que se requiere más investigación, como gafas que filtren la luz azul, restricción calórica, dieta cetogénica, ayuno intermitente o ejercicio físico (5). Conforme vamos avanzando en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad, va habiendo un número creciente de potenciales vías terapéuticas. Sin embargo, de todos los tratamientos propuestos, sólo dos han alcanzado el nivel de ensayos clínicos a gran escala: la idebenona y la terapia génica.

4.1.5.1. Antioxidantes / antiapoptóticos / neuroprotectores

La idebenona es el único tratamiento disponible actualmente y se comentará en detalle más adelante, en apartado específico.

Los suplementos nutricionales (con vitaminas B2, B3, B12, C, E, ácido fólico, ácido alfa-lipoico, carnitina, creatina, L-arginina, glutatión y dicloroacetato) no han demostrado beneficio clínico. Tampoco han demostrado eficacia la brimonidina, la ciclosporina A ni el elamipretide (MTP-131) (31). Un estudio ha reportado que el SkQ1 (Visomitin®) podría mejorar la agudeza visual en los pacientes con LHON (32), pero dicho estudio no describe aspectos clínicos clave, como

la duración de la pérdida visual, la edad de los pacientes o la agudeza visual basal. La vatiquinona (EPI-743), una quinona derivada de la hidrólisis de vitamina E que atraviesa la barrera hematoencefálica y tiene un alto poder antioxidante, ha demostrado beneficio en una pequeña serie de casos (33), pero serían necesarios ensayos clínicos para determinar su eficacia.

4.1.5.2. Terapia génica

El ojo es un compartimento inmunológicamente privilegiado. Además, las células diana de la LHON (RGC) se localizan en la superficie interna de la retina, lo que hace que, al menos en teoría, sean fácilmente accesibles mediante una inyección intravítrea. Así, la LHON sería, en principio, una candidata ideal para la terapia génica local. El desafío, sin embargo, es introducir un gen en la matriz mitocondrial, que está protegida por una doble membrana altamente impermeable. Por esta razón, los abordajes actuales se basan en la técnica de expresión alotópica (7, 13, 28, 31).

Expresión alotópica

Este proceso consiste en introducir una versión del gen mitocondrial en el núcleo junto con una secuencia señal para conseguir que la proteína resultante se importe a la mitocondria. De esta manera, se reestablecería la función mitocondrial. Se han utilizado vectores virales basados en virus adenoasociados de tipo 2, que no son patogénicos y tienen la capacidad de transfectar células humana que no se están dividiendo. El DNA del vector permanece en el núcleo de la célula huésped como un episoma, sin insertarse en ninguno de los cromosomas, lo que previene la oncogénesis (13). La versión sana del gen ND4 se transcribe en el núcleo a RNA mensajero (mRNA) junto con la secuencia señal, que lo dirige hacia la superficie de la mitocondria. Allí se encuentran unos ribosomas que sintetizan la proteína sana. La secuencia señal hace, entonces, de lanzadera para insertar la proteína en la matriz mitocondrial. Posteriormente, dicha proteína deberá insertarse en el complejo I de la cadena respiratoria, en la membrana mitocondrial interna (7, 8, 13, 31) (figura 10A).

Los ensayos clínicos que se han llevado a cabo con esta técnica en la LHON son para la mutación m.11778G>A en el gen MT-ND4 (5, 7, 13, 28). Estos ensayos han demostrado un alto perfil de seguridad, con una excelente tolerabilidad sistémica y efectos secundarios oculares mayoritariamente leves (los más frecuentes, inflamación intraocular e hipertensión ocular), que han respondido a tratamientos oftalmológicos convencionales en todos los casos (13, 28). Inicialmente, los ensayos se diseñaron como una inyección unilateral, utilizando el otro ojo como control. El hecho inesperado fue que, en los tres grupos de investigación (China,

Bascom Palmer y GenSight Biologics) hubo una mejoría bilateral mayor de la esperada por la historia natural de la enfermedad (8, 13). Con el objetivo de explicar este hecho, se llevó a cabo un estudio en primates no humanos (34). En este, tras inyección unilateral, se evidenció DNA del vector viral no sólo en el ojo inyectado, sino también en tejidos del ojo no inyectado. Se ha hipotetizado que la ruta anatómica tomada por el DNA del vector viral para viajar al ojo no tratado sería a través del nervio óptico y del quiasma. No se puede excluir que sea vía sistémica pero es poco probable, puesto que estudios de biodiseminación han demostrado que la presencia sérica de DNA del vector viral es limitada y transitoria (13). Un único estudio ha evaluado la inyección bilateral. En este, se demostró que la agudeza visual final media era mejor en los pacientes tratados bilateralmente, lo que sugiere un efecto dosis-dependiente (35). Los ensayos clínicos más robustos (tres de ellos en fase III: «REVERSE», «RESCUE» y «REFLECT») los ha llevado a cabo GenSight Biologics (35–37). Tras los resultados obtenidos, la compañía solicitó a la EMA autorización de su producto (GS010) en septiembre de 2020 (31).

La técnica de expresión alotópica se está investigando en fase preclínica para la mutación m.3460G>A (31).

Otras estrategias

Otros abordajes potenciales de terapia génica para la LHON, como vectores virales adeno-asociados dirigidos a la mitocondria o edición genética, se encuentran, actualmente, en fase preclínica (31).

4.1.5.3. Reemplazo mitocondrial

No se trata de un tratamiento para los pacientes, sino de una estrategia para prevenir la transmisión de la enfermedad a la descendencia biológica. Consiste en un procedimiento de fecundación in vitro modificado, en el que se reemplaza el citoplasma del ovocito materno o del cigoto por el citoplasma de un ovocito donante cuyas mitocondrias contienen DNA silvestre (figura 10B) (5, 8). Una limitación de esta técnica es que es difícil obtener embriones cuyo mtDNA provenga 100 % del ovocito donante. Generalmente, contienen niveles bajos del mtDNA materno original. Estudios recientes han demostrado que puede darse una pérdida gradual del mtDNA donante y que el genotipo mitocondrial revierta al materno (5). Esta modalidad de tratamiento no está disponible en España por el momento.

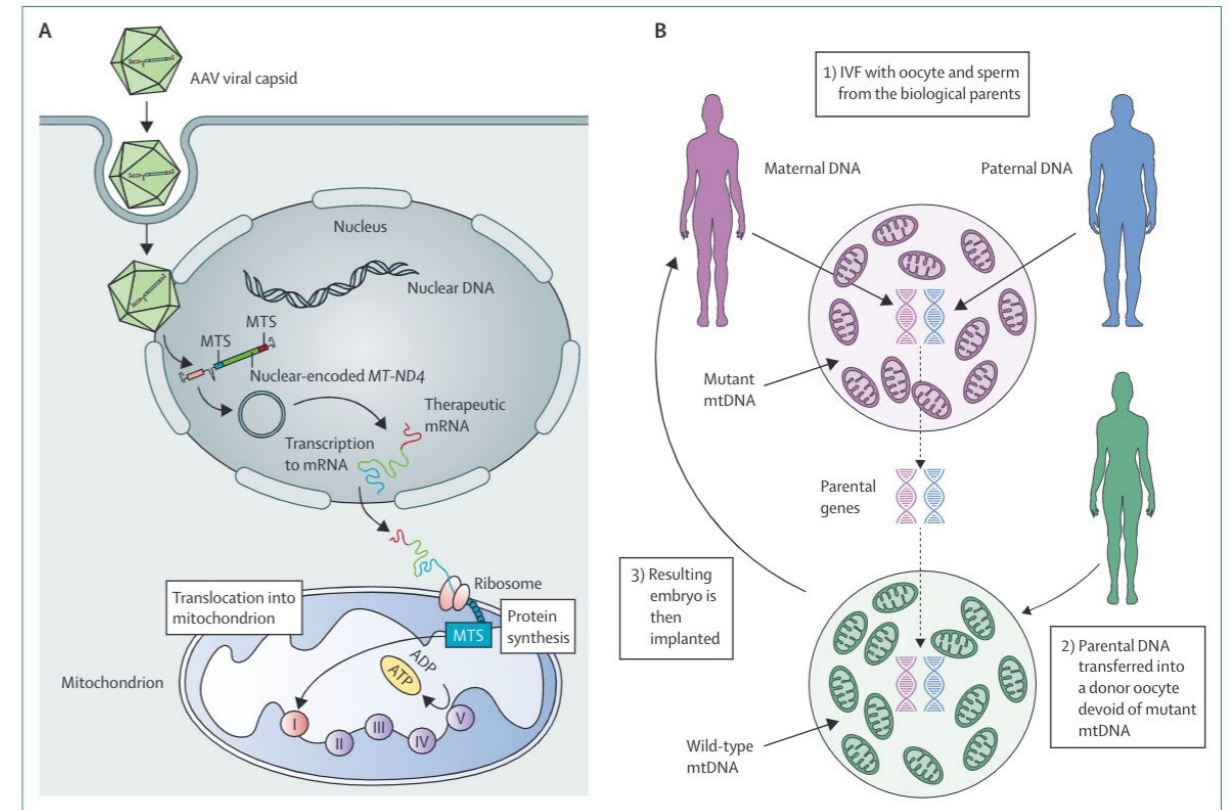


Figura 10. (A) Técnica de expresión alotópica. Se utiliza un virus adenoasociado para insertar una versión silvestre del gen MT-ND4 en el núcleo. El mRNA incluye una secuencia señal que lo dirige a la superficie mitocondrial, donde se encuentran unos ribosomas que sintetizan la proteína sana. Después, esta es importada al interior de la mitocondria e incorporada al complejo I. (B) La técnica de reemplazo mitocondrial es un procedimiento de fecundación in vitro modificado para prevenir la transmisión de la enfermedad a la descendencia biológica de mujeres con mutaciones en el mtDNA (8).

4.1.5.4. Células madre pluripotenciales inducidas

En 2006, se desarrolló una tecnología para reprogramar células somáticas de pacientes humanos y obtener células madre pluripotenciales inducidas (iPSC) (38). Esta tecnología, que ha supuesto una revolución en el campo de la Medicina, ha permitido la diferenciación de iPSC en RGC. Avances en la ingeniería de tejidos y cultivos en tres dimensiones han permitido la obtención de organoides retinianos a partir de iPSC (figura 11). Estos modelos hacen posible estudiar las interacciones entre diferentes tipos celulares (5, 39).

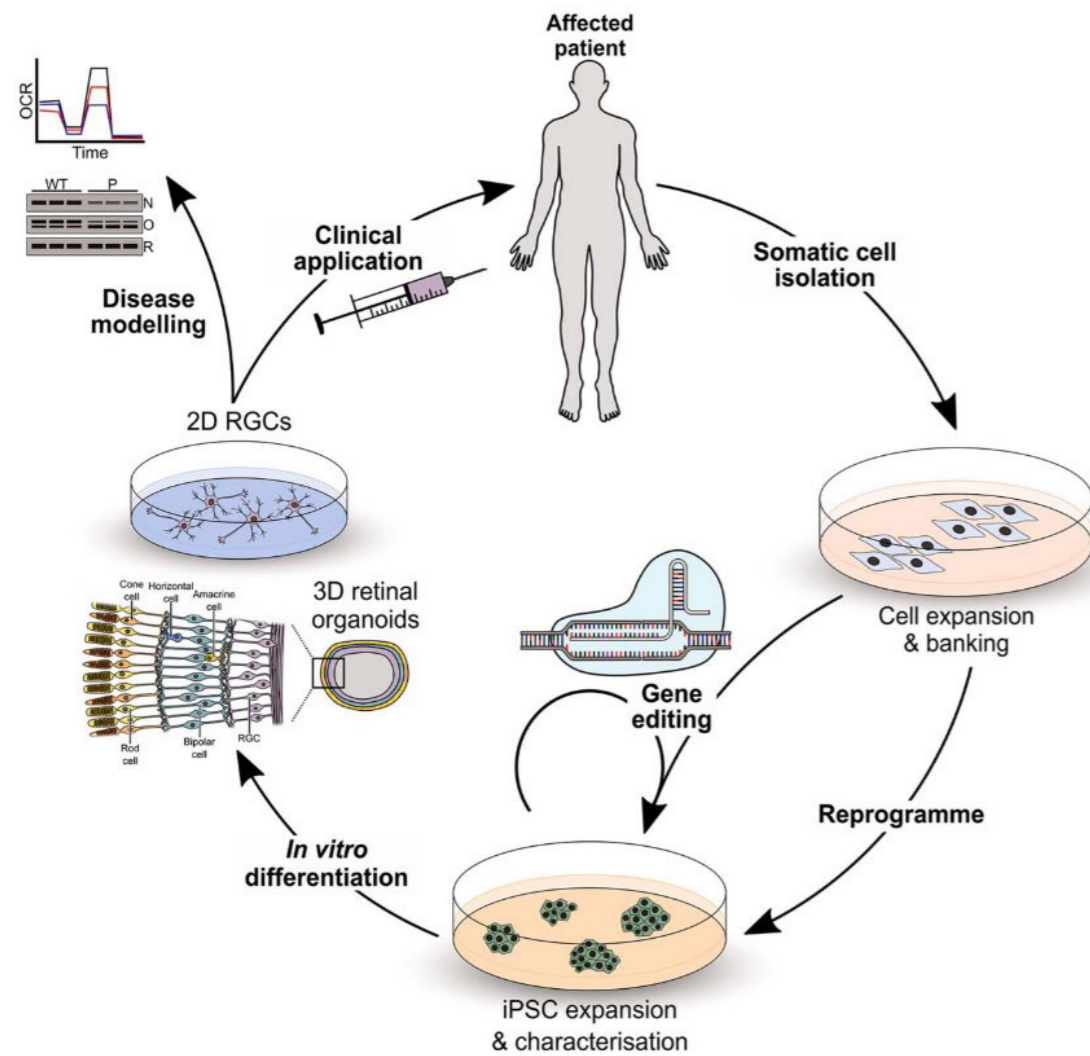


Figura 11. Obtención de RGC a partir de células somáticas de un paciente con neuropatía óptica hereditaria. Las células somáticas se reprograman a iPSC, que se pueden diferenciar a organoides retinianos con protocolos en 3 dimensiones o a RGC con protocolos en 2 dimensiones. Esta tecnología proporciona modelos de estudio de la enfermedad y, corrigiendo el defecto genético e implantando las células en la retina del paciente, también tendría potencial terapéutico (39).

En teoría, el implante de RGC derivadas de iPSC podría ser un método para restaurar la visión en pacientes con pérdida visual irreversible debido a atrofia óptica (figura 12). En la práctica, sin embargo, esto es problemático. Por un lado, para que el tratamiento fuera efectivo, sería fundamental una adecuada diferenciación y supervivencia de las RGC una vez implantadas en el ojo del paciente. Por otro lado, aunque eso se consiguiera, quedarían todavía otras cuestiones por resolver: las RGC implantadas deberían formar las conexiones adecuadas con otras células retinianas, sus axones deberían recorrer el nervio óptico, decusarse en el quiasma, viajar hasta el cuerpo geniculado lateral y establecer allí también las conexiones adecuadas (7). Aunque todavía en fase preclínica inicial, para lo que la tecnología basada en iPSC sí ofrece un enorme potencial es para creación de modelos de enfermedad que permitan

un mejor estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la LHON y la investigación de nuevas estrategias terapéuticas.

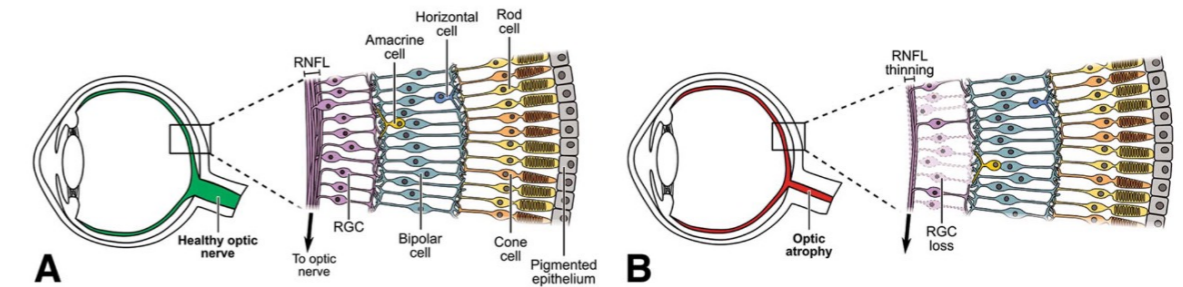


Figura 12. Patrón de degeneración en las neuropatías ópticas hereditarias. (A) Los axones de las RGC convergen y forman el nervio óptico. (B) En pacientes con neuropatías ópticas hereditarias, la degeneración de las RGC resulta en adelgazamiento de la RNFL y atrofia óptica, con pérdida visual irreversible (39).

4.1.5.5. Otros posibles tratamientos futuros

Activación de los receptores de estrógenos

Estudios in vitro han demostrado que la activación del receptor estrogénico β puede reducir la apoptosis y revertir el fenotipo patológico en la LHON (20, 40). Estas observaciones apoyan la hipótesis de que la administración de sustancias "estrógenos-like" podrían tener un papel protector en la LHON.

Mejora de la dinámica mitocondrial

Un mejor conocimiento de la dinámica mitocondrial en la LHON y de la transmitofagia podría conducir al desarrollo de nuevas vías terapéuticas.

4.2. FACTORES PRONÓSTICOS

Como se ha comentado más arriba, el pronóstico visual de la LHON en los pacientes sintomáticos es malo. En la mayoría de los casos, la agudeza visual final es ≤ 0.1 en la escala decimal (lo que confiere ceguera legal) en ambos ojos (8, 14, 23, 24). Raramente, puede existir una mejoría espontánea, que, de darse, suele ser incompleta (reducción del escotoma central, desarrollo de islas de visión normal dentro del escotoma...) (7, 12). Esta mejoría puede observarse incluso años después del inicio de la pérdida visual (12). Aunque el tamaño grande del disco y el inicio subagudo se han asociado a un mejor resultado visual (12), los factores pronósticos más importantes son la edad del debut y la mutación patológica (4, 7, 8). Con respecto a la edad del debut, se ha demostrado mayor potencial de recuperación cuando la pérdida visual se inicia

en menores de 15 años, sobre todo cuando es antes de los 12 años (7, 8). Con respecto a la mutación patogénica, la m.14484T>C es la que conlleva el mayor potencial de recuperación visual (37-64 %) (18). Existe cierta controversia en la literatura, sin embargo, acerca de cuál es la mutación que acarrea el peor pronóstico. En general, se acepta que la m.11778G>A es la de peor pronóstico y, de hecho, las menores probabilidades de recuperación visual se han documentado con esta mutación (14 % a cualquier edad y 11 % en ≥ 15 años) (18). Respecto a la mutación m.3460G>A, se han descrito tasas de recuperación del 15-25 %. Sin embargo, algunos autores opinan que, en realidad, la m.3460G>A es la de peor pronóstico (18,41).

4.3. TRATAMIENTO ACTUAL: IDEBENONA

La coenzima Q10 (también llamada ubiquinona) juega un papel importante en la cadena respiratoria mitocondrial transportando electrones desde los complejos I y II hasta el III. Su forma reducida también tiene propiedades antioxidantes, lo que disminuye la concentración de ROS. Además, puede ceder electrones directamente al complejo III en casos necesarios, lo que reestablecería la producción energética (7). Su administración oral no ha demostrado beneficio en la LHON. Este hecho podría explicarse porque su larga cadena hidrofóbica no le permite atravesar la barrera hematoencefálica ni las membranas celulares (7, 31). Con el objetivo de resolver este problema, se desarrolló el fármaco idebenona.

La idebenona es un análogo sintético hidrosoluble de la coenzima Q10, con propiedades similares a esta en cuanto a la capacidad de mejorar la producción de ATP y disminuir la producción de ROS. Estas características se han demostrado en estudios preclínicos utilizando fibroblastos de pacientes con LHON y modelos animales (7, 31).

Tras algunas comunicaciones de casos clínicos desde 1992, en 2011 se publicó el primer ensayo clínico con idebenona: "Rescue of hereditary optic disease outpatient study" ("RHODOS") (42). El estudio, aleatorizado (2:1) y a doble ciego, incluyó 85 pacientes con LHON de hasta 5 años de evolución desde el inicio de la pérdida visual. Los pacientes recibieron idebenona vía oral a dosis de 900 mg/d o placebo durante 24 semanas. El objetivo principal del estudio (encontrar diferencias significativas en la mejor recuperación de agudeza visual) no se alcanzó. Sin embargo, un subanálisis sugirió que los pacientes que tenían agudezas visuales discordantes al inicio del ensayo (y, por tanto, que era más probable que estuvieran en fases iniciales desde el inicio de los síntomas en el primer ojo) tenían mejores agudezas visuales finales que los pacientes que tenían agudezas visuales similares en ambos ojos en la visita

basal. La exclusión de los pacientes con la mutación m.14484T>C (la de mejor pronóstico) resultó en mejores resultados visuales.

El "RHODOS-OFU" (43) fue un estudio observacional de seguimiento de los pacientes en el ensayo RHODOS. Se incluyeron 58 pacientes en el análisis, con unas características demográficas y de genética molecular comparables al RHODOS, lo que constituyó una muestra representativa de dicho ensayo. La visita de estudio, realizada de media a los 30.1 meses tras haber finalizado el tratamiento con idebenona en estudio RHODOS, demostró la persistencia del efecto beneficioso de la idebenona en la LHON.

Un estudio retrospectivo publicado también en 2011 analizó los resultados visuales de 103 pacientes con LHON tratados con idebenona a diferentes dosis iniciada durante el primer año desde el debut en el segundo ojo y los comparó con los de 59 pacientes no tratados (44). Este estudio encontró una mayor proporción de recuperación visual en el grupo tratado.

Con los datos de estos estudios, la EMA autorizó en 2015 el uso de idebenona en los pacientes con LHON. Esto marcó un hito en la historia de la Medicina, puesto que fue la primera vez que la EMA aprobó un tratamiento para una enfermedad mitocondrial (4).

En 2016, se celebró un consenso internacional en Milán (Italia) con el objetivo de discutir el manejo en los pacientes con LHON basándose en la evidencia disponible en aquel momento. Los resultados se publicaron en 2017 (4). Se acordó la recomendación de no iniciar el fármaco en pacientes asintomáticos. Con respecto a los casos sintomáticos, se concluyó que, en pacientes que llevaran menos de 1 año de evolución desde el inicio de los síntomas en el segundo ojo, se debería iniciar tratamiento con idebenona, a dosis de 900 mg/d (repartidos en tres tomas) y mantener durante, al menos, 1 año. Pasado ese tiempo, debería discontinuarse si no se observaba recuperación clínicamente relevante, definida como la mejoría de, al menos, 2 líneas en el optotipo «Early treatment retinopathy study» (ETDRS) o el paso de "off-chart" (incapaz de ver ninguna letra del optotipo ETDRS) a "on-chart". En los casos en que sí hubiera recuperación clínicamente relevante, se debería mantener el tratamiento durante, al menos, 1 año desde la meseta de mejoría (figura 13). En pacientes de entre 1 y 5 años de evolución desde el inicio de la pérdida visual en el segundo ojo, no se encontró suficiente evidencia ni a favor ni en contra del tratamiento con idebenona. En pacientes de más de 5 años de evolución, no se encontró ninguna evidencia para recomendar el tratamiento con idebenona.

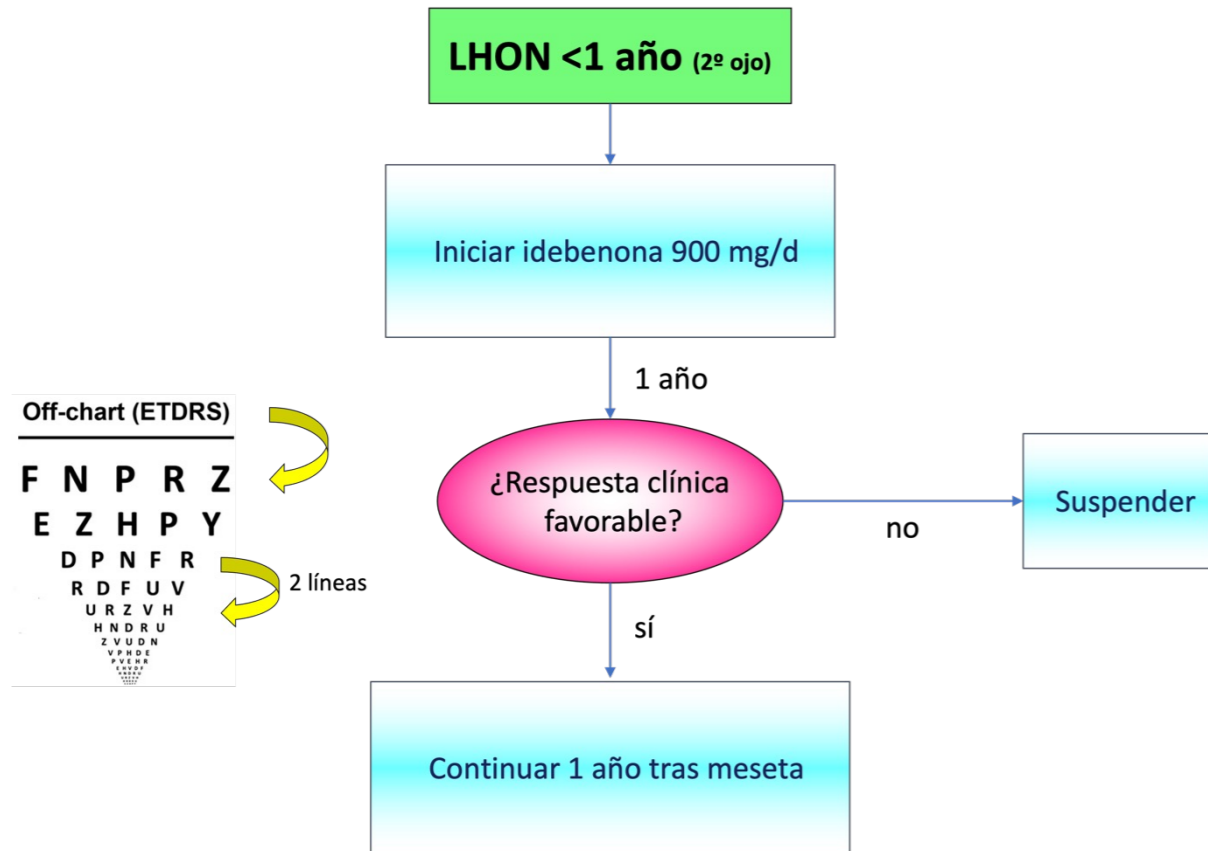


Figura 13. Algoritmo que representa la conclusión del consenso internacional de 2016 sobre el tratamiento con idebenona en pacientes que llevarán <1 año de evolución desde el inicio de los síntomas en el segundo ojo (*figura original de la persona doctoranda*).

Con la guía de la EMA, se diseñó un ensayo clínico en fase IV, “External Natural History Controlled, Open-Label Intervention Study to Assess the Efficacy and Safety of Long-Term Treatment With Raxone® in Leber’s Hereditary Optic Neuropathy (LHON)” (“LEROS”) para valorar la eficacia y seguridad a largo plazo en los pacientes con LHON, cuyos resultados aún no han sido publicados.

Hasta la fecha, la idebenona es el único tratamiento que se ha comercializado para la LHON.

4.4. MICROVASCULARIZACIÓN: BÚSQUEDA DE NUEVOS BIOMARCADORES

4.4.1. Antecedentes

Clásicamente, se han descrito cambios microvasculares en el fondo de ojo de los pacientes con LHON en fases precoces de la enfermedad (45, 46). Sin embargo, su papel en la patogenia

de la enfermedad no es bien conocido. De manera más reciente, estudios histopatológicos han revelado la existencia de proliferación de mitocondrias en el endotelio y músculo liso de las paredes de los vasos de la cabeza del nervio óptico en pacientes con LHON (figura 14) (47).

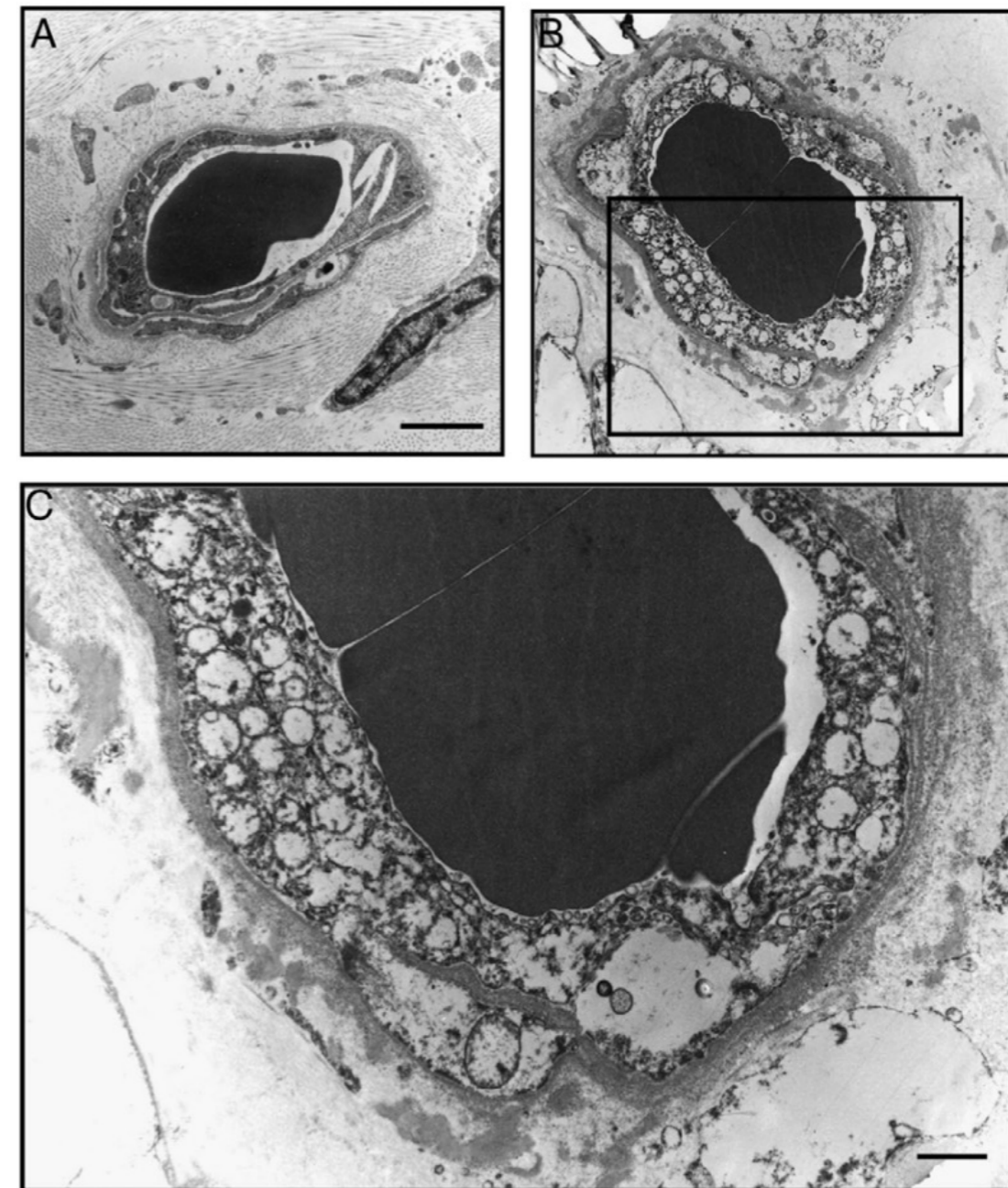


Figura 14. Capilares humanos de la cabeza del nervio óptico en tejido post-mortem; microscopía electrónica de transmisión. (A) Capilar de un control sano apareado por edad. (B) y (C) Capilar de un paciente con LHON, donde se observa acumulación anormal de mitocondrias en el citoplasma endotelial (47).

Actualmente, es posible estudiar la microvascularización retinocoroidea de manera no invasiva utilizando angiografía por OCT (OCTA).

4.4.2. Angiografía por OCT

La llegada de la OCT en 1991 (48) supuso una revolución en el campo de la Oftalmología, ya que permite obtener, de manera no invasiva, imágenes de diferentes tejidos oculares con alta resolución. La OCT mide la profundidad de una estructura dada dentro de un tejido basándose en cómo refleja o dispersa la luz. A esta medida se le ha llamado A-scan, por su analogía con los ultrasonidos. Escaneando el haz de luz en dirección transversal, se obtiene una gran cantidad de A-scans secuenciales, lo que genera una imagen transversal o B-scan. Adquiriendo secuencialmente múltiples B-scans, se genera una imagen volumétrica. Desde sus inicios, se han producido grandes avances en esta tecnología. Los primeros dispositivos (dominio temporal, TD-OCT) estaban limitados por la baja resolución axial (10-15 mm) y un número restringido de A-scans (400 por segundo). Posteriormente, se desarrolló la tecnología de dominio espectral (SD-OCT), con mejor resolución axial (3-5 mm) y un mayor número de A-scans (hasta 40000 por segundo). Esto permitió visualizar microestructuras retinianas con un nivel de detalle comparable a la histopatología. Una modalidad de adquisición de imágenes con SD-OCT, llamada “enhanced depth imaging” (EDI), consiguió que se pudieran visualizar estructuras más profundas, como la coroides. Más recientemente, se ha introducido en la práctica la tecnología de OCT “swept source” (SS-OCT). En lugar del láser diodo de banda ancha convencional que utiliza la SD-OCT, la SS-OCT utiliza un láser sintonizable de barrido y ofrece diversas ventajas con respecto a la SD-OCT. En primer lugar, la adquisición de imágenes es más rápida. En segundo lugar, utiliza mayores longitudes de onda (1040 a 1060 nm, frente a los aproximadamente 840 nm de la SD-OCT), lo que permite una mayor penetración y, por tanto, mejor visualización de tejidos oculares más profundos, como la coroides. En tercer lugar, no sufre de pérdida de sensibilidad en función de la profundidad, por lo que se pueden obtener imágenes simultáneas de alta resolución del vítreo, la retina y la coroides (49).

Basándose en los principios de la OCT, se ha desarrollado la OCTA. Esta tecnología permite obtener imágenes del flujo sanguíneo de las capas vasculares de la retina con una resolución sin precedentes de una manera rápida y no invasiva.

4.4.2.1. Funcionamiento de la OCTA

Se obtienen B-scans sucesivos de la misma posición de la retina. Estos serán muy similares entre ellos, puesto que la retina es un tejido estacionario excepto por el movimiento de la sangre dentro del tejido. Estas imágenes estructurales se comparan píxel a píxel con el objetivo de detectar cambios en la señal. Dado que el único movimiento esperado es el de los eritrocitos en los vasos sanguíneos, el resultado esperado es visualizar flujo sanguíneo. Obteniendo B-scans

repetidos de diferentes localizaciones, es posible generar datos volumétricos de OCTA. Segmentando estos datos en diferentes capas, se pueden obtener imágenes llamadas “en face”, en analogía a las que se obtienen por angiografía fluoresceínica o con verde de indocianina (figura 15) (50).

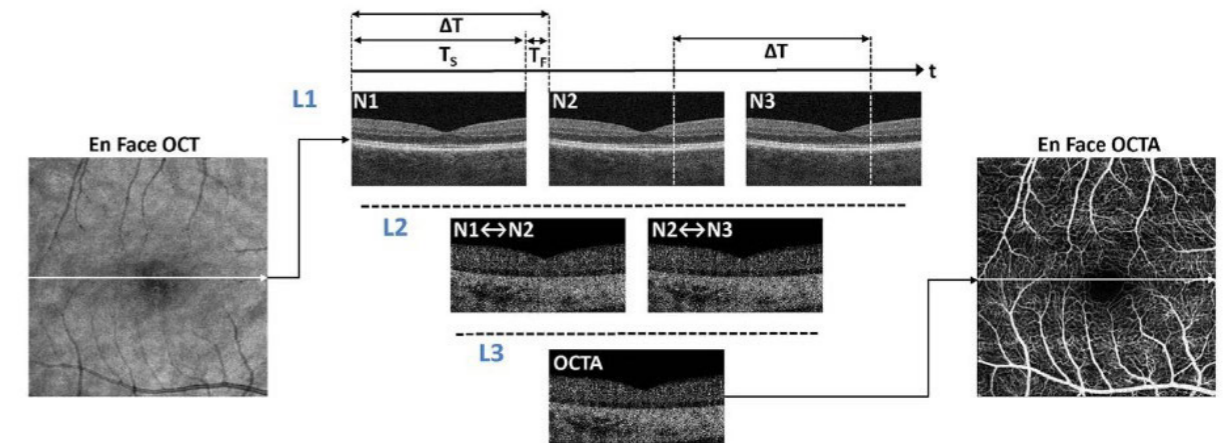


Figura 15. Esquema simplificado del funcionamiento de la OCTA. La OCTA visualiza la vasculatura mediante la detección del movimiento de las células sanguíneas. B-scans repetidos (N1, N2, N3) de la misma localización retiniana se comparan y se infiere el flujo sanguíneo. Repitiendo el procedimiento en localizaciones sucesivas, se obtienen datos volumétricos (50).

4.4.2.2. Ventajas de la OCTA

- Permite visualizar la microvascularización con alta resolución
- Los datos volumétricos pueden segmentarse y visualizar, de manera separada, los plexos retinianos y la coriocapilar
- No requiere la inyección de contraste
- Su obtención es más rápida que la de la angiografía fluoresceínica o con verde de indocianina

4.4.2.3. Limitaciones de la OCTA

- Al necesitar reescanear la misma posición retiniana varias veces, el tiempo de adquisición de las imágenes se alarga con respecto a la OCT estructural
- El rango de detección de flujo depende de la velocidad de flujo y del tiempo que transcurra entre los B-scans
- No permite un campo amplio de visualización
- Los algoritmos de análisis varían entre los diferentes instrumentos, lo que debe tenerse en cuenta al comparar los resultados
- Es más probable que aparezcan artefactos en la OCTA que en la OCT estructural, por lo que la interpretación de los hallazgos debe ser cuidadosa

4.4.3. Plexos retinianos

4.4.3.1. Generalidades

Estudios en primates describieron la existencia de cuatro redes vasculares retinianas en la mácula: plexo vascular superficial (localizado en la capa de células ganglionares), plexo capilar intermedio (por encima de la capa nuclear interna), plexo capilar profundo (por debajo de la capa nuclear interna) y plexo capilar radial peripapilar (que sigue un trayecto paralelo a los axones de la RNFL) (51).

Los diferentes instrumentos comerciales de OCTA utilizan diferentes protocolos de segmentación y las imágenes “en face” no necesariamente se corresponden con las imágenes anatómicas. Algunos dispositivos muestran de manera separada los plexos superficial, intermedio y profundo. Sin embargo, la mayoría utiliza protocolos simplificados que los visualizan como únicamente dos plexos (superficial y profundo), ya que el riesgo de error aumenta al segmentar capas adicionales (50). La figura 16 muestra la localización anatómica de los plexos vasculares retinianos en la mácula, un ejemplo de nomenclatura actual por SD-OCTA y una propuesta realizada por unos autores sobre una nueva nomenclatura (51). La figura 17 muestra las imágenes generadas por la OCT Triton (Topcon Corporation, Tokio, Japón), que utiliza tecnología “swept source”.

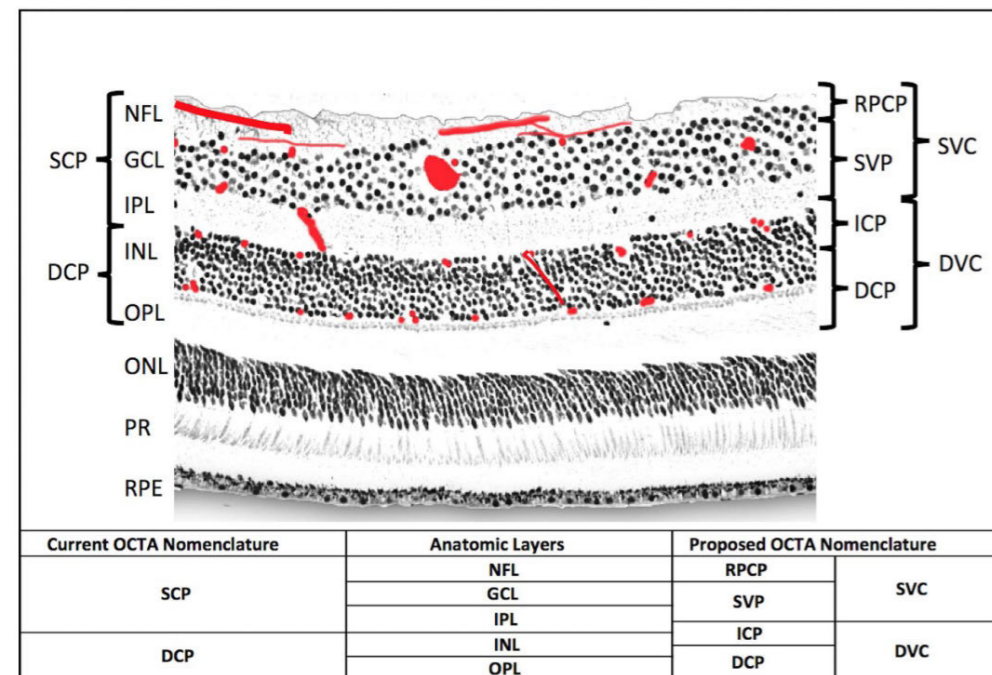


Figura 16. Localización anatómica de los plexos vasculares en la mácula humana, una nomenclatura actual de SD-OCTA y una propuesta de los bordes de segmentación por OCTA. SCP = plexo capilar superficial, DCP = plexo capilar profundo, NFL = capa de fibras nerviosas, GCL = capa de células ganglionares, IPL, capa plexiforme interna, INL = capa nuclear interna, OPL = capa plexiforme externa, ONL = capa nuclear externa, PR = capa de fotorreceptores, RPE = epitelio pigmentario de retina, RPCP = plexo capilar radial peripapilar, SVP = plexo vascular superficial, ICP = plexo capilar intermedio, SVC = complejo vascular superficial, DVC = complejo vascular profundo (51).

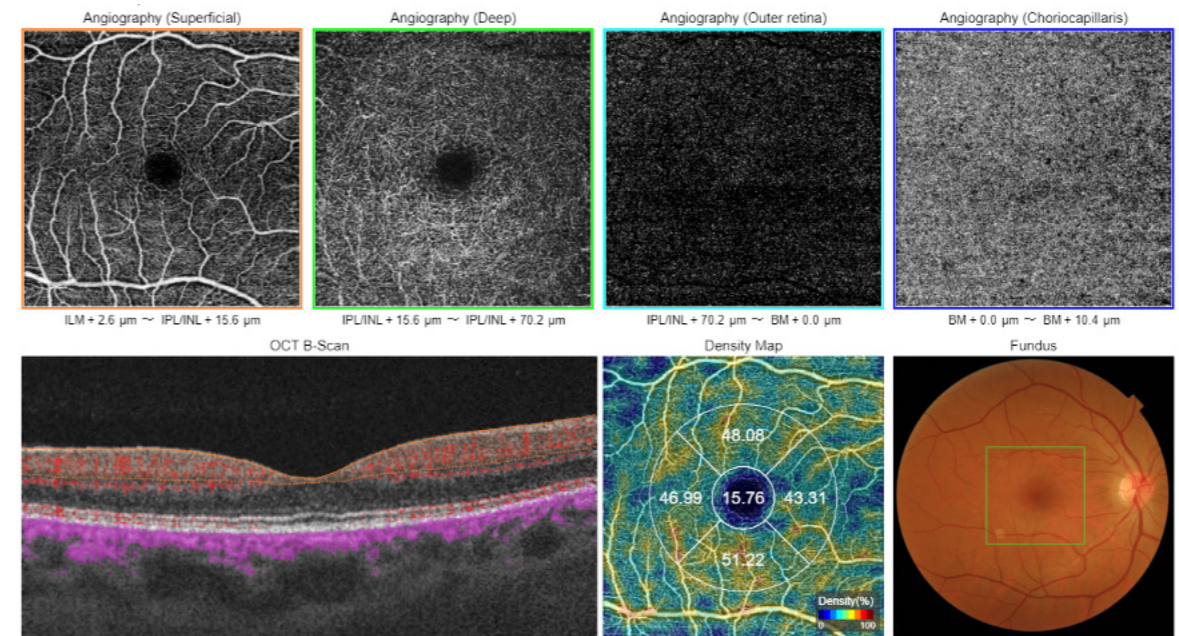


Figura 17. Imágenes de OCTA macular generadas por la OCT Triton (Topcon), que utiliza tecnología “swept source”. (Línea superior) El software integrado proporciona segmentación automática del plexo capilar superficial, plexo capilar profundo, retina externa (avascular) y coriocapilar. (Línea inferior) En el ejemplo, se muestra un B-scan y el mapa de densidad vascular del plexo capilar superficial, junto a la retinografía (figura original de la persona doctoranda).

4.4.3.2. Estudio de la microvascularización retiniana en la LHON

Los cambios vasculares retinianos visibles oftalmoscópicamente en los pacientes con LHON se han descrito, de manera clásica, en la región peripapilar (particularmente, en el haz papilomacular) (45, 46, 52). Reportes de casos aislados y series de casos han descrito cualitativamente cambios peripapilares en pacientes con LHON (53–57). Un estudio analizó cuantitativamente esta región en paciente varones y encontró una reducción progresiva en la densidad vascular (58). Los resultados de estos estudios con respecto a los hallazgos peripapilares en el estadio asintomático de la enfermedad son conflictivos. En la región macular, un estudio describió cambios al analizar cuantitativamente el estadio crónico (59) y se han descrito cambios cualitativos en un caso clínico en estadio subagudo (60), lo que plantea la cuestión de si deberíamos dirigir nuestra atención a la mácula. A este respecto, un estudio ha descrito cambios cuantitativos en las regiones macular y peripapilar en los estadios subagudo y crónico de la enfermedad (61).

Ninguno de estos estudios ha analizado con OCTA la región macular en el estadio asintomático de la LHON. Además, todos ellos han utilizado tecnología de dominio espectral. Como se ha comentado más arriba, la tecnología swept source ofrece diversas ventajas: el uso de mayores longitudes de onda, la mayor velocidad de escaneo y el hecho de que no experimente pérdida de sensibilidad en función de la profundidad permiten obtener áreas mayores con menos artefactos de movimiento (49).

4.4.4. Cambios coroideos

4.4.4.1. Generalidades

La coroides es una estructura densamente vascular localizada entre el complejo epitelio pigmentario de retina/membrana de Bruch y la esclera. Es una de las redes vasculares más complejas del cuerpo humano y juega un papel esencial en mantener la homeostasis retiniana. Aunque, primariamente, es una estructura vascular que supe la retina externa, contiene una variedad de tipos celulares. Así, se encuentran células endoteliales, melanocitos, fibroblastos, pericitos, células musculares lisas vasculares, células musculares lisas no vasculares, neuronas coroides intrínsecas y células inmunitarias (49, 62, 63). Esto hace que, en realidad, la coroides sea una estructura multifuncional, con funciones que incluyen la regulación de la respuesta inmune, la disipación del calor y, probablemente, incluso la modulación del crecimiento escleral durante la emetropización (62, 63).

El interés por estudiar la estructura y función de la coroides ha ido en aumento en los últimos años. Se ha empleado ultrasonografía y resonancia magnética, pero su uso ha sido limitado debido a falta de resolución. La angiografía con verde de indocianina revela información clínica útil pero presenta varias limitaciones, como la necesidad de inyectar contraste endovenoso, la insuficiente resolución para visualizar la microvascularización coroidea y la falta de imágenes transversales. El estudio de la coroides mediante OCT se ha visto dificultado porque el epitelio pigmentario de retina es hiperreflectivo y puede causar dispersión de la señal, lo que no permite que la imagen llegue a la vasculatura coroidea profunda (49). La introducción del protocolo EDI para SD-OCT (64) supuso un cambio importante, al permitir obtener *in vivo* imágenes transversales de la coroides. Sin embargo, las longitudes de onda utilizadas no son lo suficientemente grandes para determinar con fiabilidad la interfaz coroidoescleral en algunos casos. Además, la evaluación del grosor coroideo requiere segmentación manual, lo que limita las medidas de grosor a algunas localizaciones concretas. La llegada de la tecnología swept source marcó un hito en el estudio de la coroides *in vivo*. Las mayores longitudes de onda utilizadas permiten una mayor penetración y, por tanto, menor dispersión de la luz al llegar al epitelio pigmentario de retina, lo que permite una clara visualización de la interfaz coroidoescleral. Esto, junto con la mayor rapidez en la obtención de imágenes y la reconstrucción posterior en tres dimensiones, proporciona medidas altamente fiables del grosor coroideo (49). Además, un software integrado permite generar automáticamente mapas de grosor coroideo. La SS-OCT estructural, a pesar de los avances que ha supuesto en el estudio de la coroides, no permite distinguir la coriocalpilar de las otras capas vasculares (figura 18) (50). La SS-OCTA proporciona imágenes de la coriocalpilar con una resolución similar a la histológica (figura 17), pero la visualización de los

vasos coroideos medianos y grandes se ve también limitada por la dispersión de la luz que causan conjuntamente el epitelio pigmentario de retina y la coriocalpilar (49, 50).

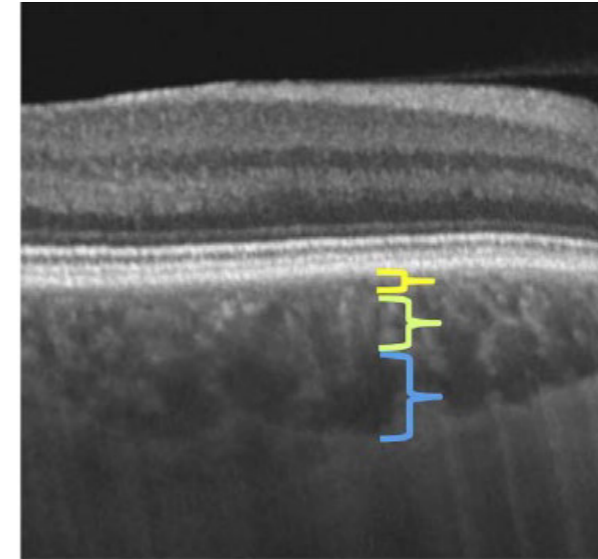


Figura 18. B-scan de la región paramacular de un ojo sano obtenida con SS-OCT (Triton, Topcon). Se muestran las dimensiones verticales aproximadas de las diferentes capas vasculares: coriocalpilar (amarillo), capa de Sattler (verde) y capa de Haller (azul). Nótese que no se puede discernir una clara demarcación entre las capas (50).

4.4.4.2. Estudio de la coroides en la LHON

El papel de la coroides en la fisiopatología de la LHON no ha sido aclarado y la literatura al respecto es escasa. La coriocalpilar se ha estudiado sólo en el estadio crónico de la enfermedad y utilizando SD-OCT (59). No se han encontrado cambios con respecto a los controles ni se ha descrito si existe una asociación con la agudeza visual. Con respecto al grosor coroideo, los resultados existentes en la literatura son conflictivos. Dos estudios encontraron disminución del grosor coroideo en pacientes crónicos (65, 66), mientras que otro estudio no encontró cambios en el mismo estadio de la enfermedad (67). Por otro lado, se ha descrito también una tendencia al grosor coroideo peripapilar aumentado en pacientes sintomáticos, estadísticamente significativo solamente en el sector nasal (68). El grosor coroideo en pacientes con LHON en estadios diferentes al crónico sólo se ha analizado con SD-OCT. Como ya se ha comentado, la tecnología swept source aporta ventajas considerables en el estudio de la coroides. Las mayores longitudes de onda utilizadas permiten una mejor visualización de la interfaz coroidoescleral y las mayores velocidades de escaneo ayudan a mitigar los artefactos de movimiento (49). Hay que resaltar, además, que ninguno de los estudios mencionados ha medido la longitud axial, y se ha demostrado que existe una correlación entre esta y los parámetros coroideos (tanto con el grosor coroideo como con los cambios vasculares coroideos) (49).

5. HIPÓTESIS

1. En los pacientes con neuropatía óptica hereditaria de Leber que inician la pérdida visual en la edad adulta, los peores resultados visuales corresponden a la mutación m.11778G>A.
2. El tratamiento con idebenona en los pacientes con neuropatía óptica hereditaria de Leber durante un periodo de tiempo mínimo superior a un año, que fue el límite establecido en el consenso internacional de 2016, puede conseguir mayores tasas de recuperación visual clínicamente relevante.
3. En la neuropatía óptica hereditaria de Leber, aparecen cambios microvasculares retinocoroideos a lo largo de la enfermedad.

6. OBJETIVOS

1. Evaluar los factores pronósticos que influyen en el resultado visual de los pacientes con neuropatía óptica hereditaria de Leber.
2. Evaluar la eficacia y seguridad del tratamiento prolongado con idebenona en los pacientes con neuropatía óptica hereditaria de Leber.
3. Analizar, de manera cuantitativa, los plexos vasculares retinianos en las regiones macular y circumpapilar en todos los estadios de la neuropatía óptica hereditaria de Leber utilizando angiografía por tomografía de coherencia óptica "swept source".
4. Determinar si existe asociación entre las densidades vasculares retinianas y la agudeza visual.
5. Determinar si existe asociación entre las densidades vasculares retinianas y el grosor de las estructuras anatómicas relacionadas.
6. Analizar, de manera cuantitativa, la densidad vascular coriocapilar y el grosor corioideo en todos los estadios de la neuropatía óptica hereditaria de Leber utilizando tecnología "swept source".
7. Determinar si existe asociación entre los parámetros corioideos y la agudeza visual.

7. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

7.1. Natural history of patients with Leber hereditary optic neuropathy—results from the REALITY study

Resumen

Antecedentes/objetivos: REALITY es un registro internacional observacional retrospectivo de pacientes con neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) que estudió la evolución y resultados visuales en la LHON.

Métodos: Se recogieron datos demográficos y de la función visual de los historiales médicos de pacientes con LHON con pérdida visual. El estudio se realizó en 11 centros de los Estados Unidos de América y de Europa. El período de recogida de datos se extendió desde el estadio asintomático de la enfermedad hasta, al menos, un año después del inicio de la pérdida visual (estadio crónico). Se utilizó un modelo de regresión local (LOWESS) para analizar la evolución de la mejor agudeza visual corregida (MAVC) a lo largo del tiempo.

Resultados: Se incluyeron 44 pacientes con LHON; 27 (61 %) eran portadores de la mutación m.11778G>A en el gen ND4, 8 (18 %) de la mutación m.3460G>A en el gen ND1 y 9 (20 %) de la mutación m.14484T>C en el gen ND6. Catorce (32 %) pacientes tenían menos de 18 años de edad al inicio de la pérdida visual y 5 (11 %) eran menores de 12 años. La duración media del seguimiento fue de 32.5 meses tras el inicio de los síntomas. En la última medida observada, la MAVC media fue de 1.46 escala del logaritmo del ángulo mínimo de resolución

(logMAR) en los pacientes ND4, 1.52 logMAR en los pacientes ND1 y 0.97 logMAR en los pacientes ND6. Los peores resultados visuales fueron obtenidos en los pacientes ND4 mayores de 15 años de edad al inicio de la pérdida visual, con una MAVC media de 1.55 logMAR y sin tendencia a una recuperación espontánea. La curva modelada LOWESS evidenció un deterioro permanente y grave de la MAVC.

Conclusiones: Entre los pacientes con LHON portadores de alguna de las tres mutaciones primarias del mtDNA, los pacientes adultos con la mutación m.11778G>A en el gen ND4 tuvieron los peores resultados visuales, de forma consistente con reportes previos.

Eye (2022) 36:818–826
<https://doi.org/10.1038/s41433-021-01535-9>



ARTICLE



Natural history of patients with Leber hereditary optic neuropathy—results from the REALITY study

Patrick Yu-Wai-Man^{1,2,3,4} · Nancy J. Newman⁵ · Valerio Carelli^{6,7} · Chiara La Morgia^{6,7} · Valérie Biousse⁵ · Francesco M. Bandello^{8,9} · Catherine Vignal Clermont^{10,11} · Lorena Castillo Campillo¹² · Stephanie Leruez¹³ · Mark L. Moster¹⁴ · Dean M. Cestari¹⁵ · Rod Foroozan¹⁶ · Alfredo Sadun¹⁷ · Rustum Karanjia^{17,18} · Neringa Jurkute^{3,4} · Laure Blouin¹⁹ · Magali Taiel¹⁹ · José-Alain Sahel^{20,21,22,23} · for the LHON REALITY Study Group

Received: 29 January 2021 / Revised: 24 March 2021 / Accepted: 1 April 2021 / Published online: 28 April 2021
 © The Author(s) 2021. This article is published with open access

Abstract

Background/objectives REALITY is an international observational retrospective registry of LHON patients evaluating the visual course and outcome in Leber hereditary optic neuropathy (LHON).

Subjects/methods Demographics and visual function data were collected from medical charts of LHON patients with visual loss. The study was conducted in 11 study centres in the United States of America and Europe. The collection period extended from the presymptomatic stage to at least more than one year after onset of vision loss (chronic stage). A Locally Weighted Scatterplot Smoothing (LOWESS) local regression model was used to analyse the evolution of best corrected visual acuity (BCVA) over time.

Results 44 LHON patients were included; 27 (61%) carried the m.11778G>A ND4 mutation, 8 (18%) carried the m.3460G>A ND1 mutation, and 9 (20%) carried the m.14484T>C ND6 mutation. Fourteen (32%) patients were under 18 years old at onset of vision loss and 5 (11%) were below the age of 12. The average duration of follow up was 32.5 months after onset of symptoms. At the last observed measure, mean BCVA was 1.46 LogMAR in ND4 patients, 1.52 LogMAR in ND1 patients, and 0.97 LogMAR in ND6 patients. The worst visual outcomes were reported in ND4 patients aged at least 15 years old at onset, with a mean BCVA of 1.55 LogMAR and no tendency for spontaneous recovery. The LOESS modelling curve depicted a severe and permanent deterioration of BCVA.

Conclusions Amongst LHON patients with the three primary mtDNA mutations, adult patients with the m.11778G>A ND4 mutation had the worst visual outcomes, consistent with prior reports.

Introduction

Leber hereditary optic neuropathy (LHON) is an inherited optic neuropathy caused by mitochondrial DNA (mtDNA)

mutations, which affect complex I subunits of the mitochondrial respiratory chain, impairing mitochondrial respiration and increasing production of reactive oxygen species [1–4]. Retinal ganglion cells (RGCs) are particularly vulnerable to mitochondrial dysfunction, which may lead to apoptotic cell death and axonal degeneration, ultimately resulting in optic atrophy [5, 6]. LHON affects ~1 in 30,000 to 1 in 50,000 people [4, 7, 8], with a peak age of onset between 15 and 35 years, and a large male predominance [3, 9–12]. LHON is characterised by bilateral painless central vision loss, typically sequential, with the fellow eye undergoing disease conversion weeks to a few months after onset in the first eye [13–15]. There is a well documented incomplete penetrance, implying that the mtDNA mutations are necessary, but not sufficient to precipitate visual loss. Although there is considerable interfamilial variability,

Members of the LHON REALITY Study Group are listed below acknowledgements.

Clinical Trial Number: NCT03295071 (ClinicalTrials.gov).

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41433-021-01535-9>.

✉ Patrick Yu Wai Man
 py237@cam.ac.uk

Extended author information available on the last page of the article

approximately 50% of men and 10% of women who carry one of the primary LHON mutations will experience visual loss during their lifetimes, highlighting also a higher male prevalence [8, 14, 16].

Three mtDNA point mutations account for about 90% of LHON cases: m.11778G>A in *ND4*, m.3460G>A in *ND1*, and m.14484T>C in *ND6* [3, 4]. The m.11778G>A mutation is the most common cause of LHON worldwide and it is known to be a severe mutation with less than 15% of patients experiencing some degree of visual recovery [17, 18]. Children have a better visual prognosis, especially when age of onset is before 12 years [10, 19]. Treatment options for LHON remain limited, with some improvement demonstrated in subgroups of LHON patients treated with idebenone [20–22], and some early promising results with intravitreal gene therapy [23–26].

The REALITY study is an international multicenter observational retrospective registry of LHON patients designed to evaluate the natural history of the three most common disease causing mtDNA mutations and the factors influencing the visual outcome.

Methods

Study design

Eleven study centres in the US and Europe (France, Italy, Spain, and the United Kingdom) participated in the REALITY registry. To qualify for study inclusion, patients had to have a diagnosis of LHON confirmed by genotyping for one of the three primary mutations (m.11778G>A in *ND4*, m.3460G>A in *ND1* and m.14484T>C in *ND6*). Furthermore, patients were included only if they had undergone at least two visual function assessments, performed at any time between Year 1 and Year 3 after onset of vision loss. There was no restriction on age, and patients could have received idebenone or any other treatment. The primary source of demographic and clinical data was the enrolled subjects' medical records.

The relevant local Independent Ethics Committees approved the study protocol before subjects were identified and data collected. For patients under 18 years old, permission from a legal guardian was required to participate in the study. This study was conducted in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki and Good Clinical Practice guidelines.

Best-corrected visual acuity (BCVA) analysis

On chart BCVA measures, expressed in decimal fraction or Snellen notation, were converted into LogMAR values. Off chart BCVA was assigned the following LogMAR values:

2.0 for count fingers; 2.3 for hand motion based on the Lange scale equivalence [27]; 4.0 for light perception; and 4.5 for no light perception.

Data analysis

The Full Analysis Set included all enrolled subjects whose eligibility was confirmed. Subgroup analyses were performed by LHON genotype (*ND4*, *ND1*, *ND6*), age at onset of vision loss (two cut offs were applied: 12 and 15 years old), and idebenone treatment status. Change in BCVA was evaluated from the presymptomatic phase to the last available clinic observation. Missing data for presymptomatic BCVA were imputed a LogMAR value of 0 (Snellen equivalent 20/20; decimal fraction equivalent 1) [28, 29]. No other data imputation were performed for missing data.

A Locally Weighted Scatterplot Smoothing (LOWESS), non parametric, local regression model was used on the individual BCVA data points of the LHON *ND4* patients who were at least 15 years old at onset. The resulting curve depicting the evolution of BCVA over time was based on a series of polynomial regressions around each data point. The regressions used a limited look back and look forward, giving distant points less weight. The starting point of the curve was set at the onset of vision loss and included presymptomatic values (missing presymptomatic data were imputed 0 LogMAR). All computations and generation of analysis datasets and tables were performed using SAS[®] software version 9.4 or higher (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Results

Study population characteristics and follow-up period

A total of 44 affected LHON patients were included in the REALITY study: 34/44 (77%) from European countries (France, Italy, Spain, and the United Kingdom) and 10/44 (23%) from the United States of America (Table 1). The majority of enrolled patients were male (33/44, 75%) and Caucasian (33/44, 75%) (Table 1). The mean age at onset of vision loss was 27.9 years (range: 4–71 years), with 30/44 (68%) patients ≥18 years old at the onset of vision loss. The proportion of patients who were at least 15 years old at onset was 82% (36/44). Five (11%) patients were 12 years old or younger at onset.

Three LHON patients had been diagnosed with an additional genetic syndrome: (i) the blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome; (ii) the Ehlers Danlos syndrome; (iii) and the Marcus Gunn syndrome. In addition, one woman was diagnosed with multiple sclerosis following the onset of visual loss from LHON.

Table 1 Demographics of LHON cohort.

	All patients (N 44)	ND4 patients (N 27)	ND1 patients (N 8)	ND6 patients (N 9)	ND4 patients aged ≥ 15 at onset (N 23)
Age at onset of vision loss ^a (years)					
Mean (SD)	27.9 (18.7)	30.2 (20.1)	24.9 (15.8)	23.6 (17.7)	34.2 (19.0)
Median	21.5	23.0	17.5	21.0	25.0
IQR	16.0, 32.0	16.0, 39.0	15.5, 29.0	14.0, 24.0	19.0, 57.0
Min, Max	4, 71	4, 71	14, 61	8, 68	16, 71
Categories of age at onset ^a					
≤12 years old	5/44 (11.4%)	3/27 (11.1%)	0/8 (0.0%)	2/9 (22.2%)	NA
13 to 14 years old	3/44 (6.8%)	1/27 (3.7%)	1/8 (12.5%)	1/9 (11.1%)	NA
15 to 17 years old	6/44 (13.6%)	3/27 (11.1%)	3/8 (37.5%)	0/9 (0.0%)	3/23 (13.0%)
18 and older	30/44 (68.2%)	20/27 (74.1%)	4/8 (50.0%)	6/9 (66.7%)	20/23 (87.0%)
Sex					
Male	33/44 (75.0%)	22/27 (81.5%)	5/8 (62.5%)	6/9 (66.7%)	18/23 (78.3%)
Female	11/44 (25.0%)	5/27 (18.5%)	3/8 (37.5%)	3/9 (33.3%)	5/23 (21.7%)
Ethnicity					
Caucasian/White	33/44 (75.0%)	20/27 (74.1%)	5/8 (62.5%)	8/9 (88.9%)	18/23 (78.3%)
Black	1/44 (2.3%)	1/27 (3.7%)	0/8 (0.0%)	0/9 (0.0%)	1/23 (4.3%)
Asian	1/44 (2.3%)	1/27 (3.7%)	0/8 (0.0%)	0/9 (0.0%)	0/23 (0.0%)
Unknown	9/44 (20.4%)	5/27 (18.5%)	3/8 (37.5%)	1/9 (11.1%)	4/23 (17.4%)
Country of origin					
France	9/44 (20.5%)	6/27 (22.2%)	3/8 (37.5%)	0/9 (0.0%)	5/23 (21.7%)
Italy	12/44 (27.3%)	6/27 (22.2%)	4/8 (50.0%)	2/9 (22.2%)	5/23 (21.7%)
Spain	5/44 (11.4%)	2/27 (7.4%)	1/8 (12.5%)	2/9 (22.2%)	2/23 (8.7%)
United Kingdom	8/44 (18.2%)	5/27 (18.5%)	0/8 (0.0%)	3/9 (33.3%)	4/23 (17.4%)
United States	10/44 (22.7%)	8/27 (29.6%)	0/8 (0.0%)	2/9 (22.2%)	7/23 (30.4%)

IQR inter quartile range, NA not applicable, SD standard deviation.

^aOnset in first affected eye.

Most patients (27/44, 61%) were seen by an ophthalmologist or a neuro ophthalmologist within the first 3 months of disease onset. The mean time from onset to the first visit was 5.7 months (range: 0–25.7 months), and the mean duration of follow up was 32.5 months (range: 14.1–178.3 months) (Table 2). Seven patients (7/44, 16%) had a follow up of more than 3 years, 6 of whom carried the m.11778G>A mutation and one the m.14484T>C mutation. The mean number of BCVA visits per patient was 7.9, with a range of 4–28 visits reported per patient.

LHON genotypes

Twenty seven patients (27/44, 61%) carried the m.11778G>A mutation in *ND4*, 8 patients (8/44, 18%) carried the m.3460G>A mutation in *ND1*, and 9 patients (9/44, 21%) carried the m.14484T>C mutation in *ND6*, with a mean age at onset of 30.2, 24.9, and 23.6 years, respectively (Table 1). Among the 36 patients who were at least 15 years old at onset, there were 23 *ND4* patients (64%), 7 *ND1* patients (19%) and 6 *ND6* patients (17%).

Idebenone status

Twenty five patients (25/44, 57%) had taken idebenone with a mean cumulative duration of treatment of 55.7 months (Supplementary Table S1). The treated group included 16/27 (59%) *ND4* patients, 5/8 (62%) *ND1* patients and 4/9 (44%) *ND6* patients. Treatment was started during the first year after disease onset in 21/25 (84%) patients.

BCVA evolution based on LHON genotypes and age of onset

For the entire study cohort, the mean (standard deviation (SD)) BCVA was 1.37 (0.78) LogMAR at last observed measure (mean of 32.2 months from onset of vision loss) (Table 3). Based on the LHON genotype, the mean (SD) BCVA was 1.46 (0.63) LogMAR in *ND4* patients, 1.52 (1.06) LogMAR in *ND1* patients, and 0.97 (0.83) LogMAR in *ND6* patients (Table 3).

At last observed measure, LHON patients ≤ 12 years old at onset had a mean (SD) BCVA of 0.65 (0.52) LogMAR,

Natural history of patients with Leber hereditary optic neuropathy results from the REALITY study

821

Table 2 BCVA data collection in REALITY.

	All patients (N 44)	ND4 patients (N 27)	ND1 patients (N 8)	ND6 patients (N 9)	ND4 patients aged ≥ 15 at onset (N 23)
Time from onset to first visit (months)					
Mean (SD)	5.7 (7.3)	6.9 (7.8)	3.0 (6.2)	4.5 (6.2)	6.8 (7.2)
Median	1.9	2.9	0.6	1.3	3.0
IQR	0.5, 11.2	0.8, 14.5	0.2, 2.0	1.1, 6.0	0.8, 14.5
Min, Max	0.0, 25.7	0.0, 25.7	0.0, 18.2	0.0, 17.8	0.0, 20.5
Time period of first visit post onset					
≤1 month	14/44 (31.8%)	7/27 (25.9%)	5/8 (62.5%)	2/9 (22.2%)	6/23 (26.1%)
>1 to 3 months	13/44 (29.5%)	7/27 (25.9%)	2/8 (25.0%)	4/9 (44.4%)	5/23 (21.7%)
>3 to 6 months	4/44 (9.1%)	3/27 (11.1%)	0/8 (0.0%)	1/9 (11.1%)	3/23 (13.0%)
>6 to 12 months	4/44 (9.1%)	3/27 (11.1%)	0/8 (0.0%)	1/9 (11.1%)	3/23 (13.0%)
>2 months	9/44 (20.5%)	7/27 (25.9%)	1/8 (12.5%)	1/9 (11.1%)	6/23 (26.1%)
Time from onset to last visit (months)					
Mean (SD)	32.5 (24.1)	36.3 (29.8)	26.0 (6.0)	26.7 (8.6)	36.8 (32.2)
Median	30.3	30.4	27.3	30.3	29.3
IQR	23.3, 34.5	25.0, 35.4	22.2, 31.1	18.7, 35.1	24.4, 35.3
Min, Max	14.1, 178.2	15.9, 178.2	15.3, 31.4	14.1, 36.0	15.9, 178.2
Time period of last visit post onset					
≤18 months	4/44 (9.1%)	1/27 (3.7%)	1/8 (12.5%)	2/9 (22.2%)	1/23 (4.3%)
>18 to 24 months	8/44 (18.2%)	4/27 (14.8%)	2/8 (25.0%)	2/9 (22.2%)	4/23 (17.4%)
>24 to 30 months	9/44 (20.5%)	8/27 (29.6%)	1/8 (12.5%)	0/9 (0.0%)	7/23 (30.4%)
>30 to 36 months	16/44 (36.4%)	8/27 (29.6%)	4/8 (50.0%)	4/9 (44.4%)	6/23 (26.1%)
>36 months	7/44 (15.9%)	6/27 (22.2%)	0/8 (0.0%)	1/9 (11.1%)	5/23 (21.7%)
Number of eyes with BCVA data available in time period					
Up to Year 1 after onset	59/88 (67.0%)	35/54 (64.8%)	10/16 (62.5%)	14/18 (77.8%)	31/46 (67.4%)
Year 1 to Year 2 after onset	76/88 (86.4%)	44/54 (81.5%)	16/16 (100.0%)	16/18 (88.9%)	39/46 (84.8%)
Year 2 to Year 3 after onset	59/88 (67.0%)	42/54 (77.8%)	10/16 (62.5%)	7/18 (38.9%)	34/46 (73.9%)
>Year 3 after onset	14/88 (15.9%)	12/54 (22.2%)	0/16 (0.0%)	2/18 (11.1%)	10/46 (21.7%)
Number of BCVA visits per patient					
Mean (SD)	7.9 (4.9)	7.2 (3.9)	8.0 (3.7)	9.9 (8.0)	7.3 (4.2)
Median	6.0	6.0	7.0	6.0	6.0
IQR	5.5, 8.0	5.0, 8.0	6.0, 9.0	6.0, 10.0	4.0, 8.0
Min, Max	4, 28	4, 22	4, 16	4, 28	4, 22

BCVA best corrected visual acuity, IQR interquartile range, SD standard deviation.

Date of onset of vision loss in the first eye to be affected was used to calculate times from onset for each patient.

compared with 1.46 (0.77) LogMAR in patients over 12 years old at onset ($p = 0.0193$) (Supplementary Table S2).

When considering LHON patients aged at least 15 years at onset, 55/72 (76%) of eyes had a BCVA of 1.0 LogMAR or worse at last observed measure: 39/46 (85%) for ND4 patients, 8/14 (57%) for ND1 patients and 8/12 (67%) for ND6 patients (Fig. 1). The proportion of eyes with off chart BCVA was comparable for the three LHON genotypes: 22/46 (48%) for ND4 patients, 6/14 (43%) for ND1 patients and 5/12 (42%) for ND6 patients. The proportion of patients

with a BCVA better than 1.0 LogMAR in at least one eye at the last observed measure was 5/23 (22%) for ND4 patients; 3/7 (43%) for ND1 patients and 2/6 (33%) for ND6 patients.

For LHON patients who were below 15 years of age at onset, 6/16 (37%) eyes had a BCVA of 1.0 LogMAR or worse at last observed measure: 4/8 (50%) of ND4 patients, 2/2 (100%) of ND1 patients and 0/6 (0%) of ND6 patients (Fig. 1). Of note, no eyes were off chart at the last observed measure in ND4 and ND6 patients who were less than 15 years old at onset (Fig. 1).

822

P. Yu Wai Man et al.

Table 3 BCVA outcomes according to LHON genotypes.

	All patients (N = 88 eyes)	ND4 patients (N = 54 eyes)	ND1 patients (N = 16 eyes)	ND6 patients (N = 18 eyes)	ND4 patients aged ≥ 15 at onset (N = 46 eyes)	ND4 patients aged ≥ 15 at onset and treated with idebenone (N = 30 eyes)
Time from onset to last visit (months)						
Mean (SD)	32.2 (24.0)	36.3 (29.5)	26.0 (5.8)	25.6 (8.6)	36.8 (31.8)	40.5 (38.0)
Presymptomatic BCVA (LogMAR) ^a	0	0	0	0	0	0
Last-observed BCVA (LogMAR)						
Mean (SD)	1.37 (0.78)	1.46 (0.63)	1.52 (1.06)	0.97 (0.83)	1.55 (0.62)	1.57 (0.62)
95% CI	1.15, 1.59	1.17, 1.74	1.00, 2.04	0.48, 1.46	0.96, 1.54	0.71, 1.52
Median	1.30	1.47	1.60	0.75	1.60	1.60
Minimum, maximum	0.00, 4.00	0.00, 2.30	0.10, 4.00	0.00, 2.30	0.00, 2.30	0.10, 2.30
Q1, Q3	0.80, 2.00	1.10, 2.00	0.00, 2.00	0.22, 2.00	1.20, 2.00	1.10, 2.00

BCVA best corrected visual acuity; SD standard deviation.

^aMissing presymptomatic BCVA were assigned a value of 0 LogMAR (normal visual acuity).

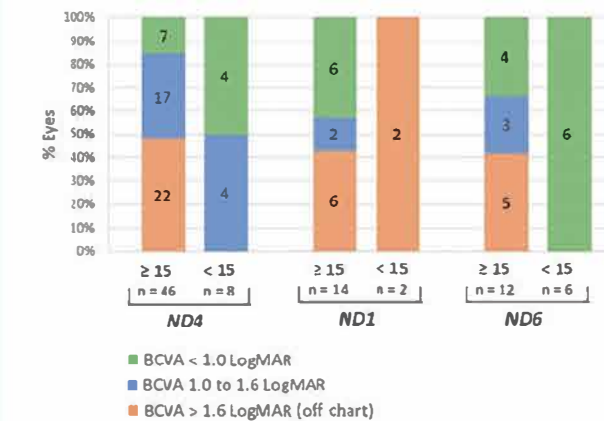


Fig. 1 BCVA data collection in REALITY. The distribution of BCVA data collected in the REALITY registry is presented according to LHON genotype and age at onset (below 15 or at least 15 years old). The number of eyes is displayed for each category.

Subgroup analysis of LHON ND4 patients aged ≥15 years at onset

Twenty three LHON patients carrying the m.11778G>A ND4 mutation were at least 15 years old at onset, with the majority being male (18/23, 78.3%). The mean (SD) age at onset was 34.2 (19.0) years and 3/23 (13%) patients were between 15 and 18 years old at onset of vision loss (Table 1). The mean (SD) time from onset to the first visit was 6.8 (7.2) months and the mean duration of follow up was 36.8 (32.2) months for this subgroup (Table 2).

The mean (SD) BCVA was 1.55 (0.62) LogMAR at the last observed measure (Table 3). Fifteen (15/23, 65%) ND4 patients aged at least 15 years at onset were treated with idebenone during the observational period (Supplementary Table S1). For nine of these patients, the mean (SD)

cumulative duration of treatment with idebenone was 70.0 (24.9) months. At the last observed measure, the mean (SD) BCVA for the idebenone treated group was 1.57 (0.62) LogMAR on average 40.5 (38.0) months after onset (Table 3).

The LOWESS curve depicting the evolution of BCVA over time showed a marked loss of visual acuity in the first 18 months after disease onset (Fig. 2). Following this initial drop of vision, the deterioration of BCVA continued at a slower rate and no trend of visual recovery was observed.

Discussion

The REALITY study cohort is representative of the general LHON patient population with regards to the age of onset (mean of 27.9 years) and gender distribution (75% males) [3, 12]. Prior studies have estimated the peak age of onset to be between 15 and 35 years old, although the reported range for age at onset in molecularly confirmed LHON patients varies from 2 to 87 years of age [3, 10, 11]. The proportion of patients in REALITY who were less than 15 years old at disease onset was 18% (8/44) and the predominant genotype among all included patients was the m.11778G>A ND4 mutation (61%), also in keeping with the literature. [5, 6, 15, 17, 30 32] Half of the patients enrolled in REALITY had received treatment with idebenone for a cumulative period of more than 4 years.

The genetic syndromes reported in three patients included in REALITY are unlikely to be related to the underlying LHON causative mtDNA mutation. One additional patient was diagnosed with multiple sclerosis. The co occurrence of visual loss due to LHON and central nervous system demyelination is often referred to as Harding's disease [33], and this overlap syndrome can occur with all three primary LHON mutations, predominantly in women [15, 33, 34].

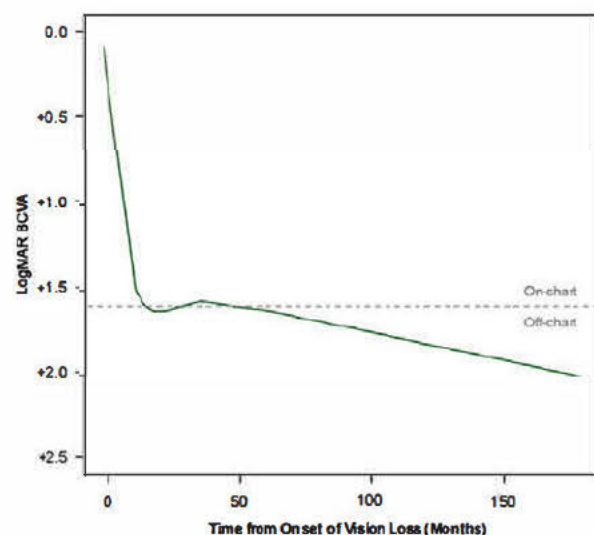


Fig. 2 BCVA evolution in *ND4* patients aged ≥ 15 at onset of vision loss. The LOWESS regression curve for *ND4* patients aged at least 15 at onset of vision loss ($n = 23$ patients, 213 individual BCVA measures) was based on fitting a series of linear regressions around each data point collected. The regressions used a limited look back and look forward, giving distant points less weight. The starting point of the curves was set at the onset of vision loss and included presymptomatic values (missing presymptomatic data were imputed a value of 0 LogMAR).

The two most important predictors of visual outcome in LHON are the underlying causative mtDNA mutation and the age at onset of vision loss. In the REALITY study, LHON patients carrying the m.14484T>C mutation achieved better final vision compared with those carrying the m.11778G>A and m.3460G>A mutations. The literature reports that children who become affected at the age of 12 years or younger achieve significantly better vision compared with adult onset LHON patients [13, 17, 19, 35]. Accordingly, in the REALITY registry we observed that patients ≤ 12 years old at onset had a mean final BCVA of 0.65 LogMAR, compared with 1.46 LogMAR for those over 12 years old at onset. Furthermore, the majority of eyes of LHON patients who were below the age of 15 at onset had a BCVA better than 1.0 LogMAR at the last observed measure, and all the *ND4* and *ND6* patients younger than 15 at onset had on chart visual acuity in both eyes, confirming the better visual prognosis in these younger groups.

In the LHON *ND4* subgroup of patients who were at least 15 years old at onset, the majority of eyes had a BCVA of 1.0 LogMAR or worse at the last observed measure. The m.11778G>A mutation is known to carry a poor prognosis, with <15% of patients experiencing spontaneous partial visual recovery, and few achieving visual acuities better than 20/200. [17] In REALITY, 84.8% (39/46) of eyes from LHON *ND4* patients who were at least 15 at onset had BCVA of 20/200 or worse, and 47.8% (22/46) were off chart at the last observed

measure. In this subgroup, a LOWESS model curve showed a decline in two phases: a rapid decline in the first 18 months, followed by a progressive slow decline. A prospective long term follow up study of untreated LHON *ND4* patients is needed to confirm the projection of this model, which has important implications for the treatment of chronic cases.

The REALITY registry bears a number of limitations due to the retrospective nature of its study design and the relatively small sample size of 44 LHON patients. Nevertheless, the findings of this study confirm the better visual outcome with childhood onset LHON and the poor visual prognosis for patients with the m.11778G>A mutation who were at least 15 years old at disease onset.

Summary

What was known before

- LHON is a rare mitochondrial blinding disease affecting mostly males between 15 and 35 years old.
- Three primary mtDNA mutations are responsible for 90% of the cases.
- Spontaneous partial visual recovery is scarcely reported in the literature.

What this study adds

- This international retrospective registry study provided a better understanding of the evolution of visual acuity in LHON patients, including clinical data from 44 subjects aged 4 to 71 years at onset of vision loss.
- LHON subjects carrying the *ND4* mutation did not show a trend for spontaneous improvement over time.
- LHON subjects aged 12 or less at onset showed the best visual prognosis.

Data and materials availability

All data associated with this study are available in the main text or the supplementary materials

Acknowledgements We are grateful to the study teams that contributed to the conduct of the REALITY registry in the various recruitment centres. We would also like to thank the patients who took part in this study. PYWM is supported by a Clinician Scientist Fellowship Award (G1002570) from the Medical Research Council (UK), and also receives funding from Fight for Sight (UK), the Isaac Newton Trust (UK), Moorfields Eye Charity, the Addenbrooke's Charitable Trust, the National Eye Research Centre (UK), the International Foundation for Optic Nerve Disease (IFOND), the UK National Institute of Health Research (NIHR) as part of the Rare Diseases Translational Research Collaboration, the NIHR Cambridge Biomedical Research Centre (BRC 1215 20014), and the NIHR Biomedical

Research Centre based at Moorfields Eye Hospital NHS Foundation Trust and UCL Institute of Ophthalmology. The views expressed are those of the author(s) and not necessarily those of the NHS, the NIHR or the Department of Health. NJN and VB are supported in part by an ophthalmology department core grant from the NIH/NEI (P30EY006360). VC is supported by grants from the Italian Ministry of Health (RF 2018 12366703), the Italian Ministry of Research (20172T2MHH), and Telethon Italy (GUP15016). VC is also supported by patients' organisations MITOCON and IFOND, and patients' donations. JAS is supported by the *Agence Nationale de la Recherche* within the *Programme Investissements d'Avenir, Institut Hospitalo Universitaire FORESIGHT* [ANR 18 IAHU 0001], LabEx LIFESENSES (ANR 10 LABX 65), and an unrestricted centre grant by Research to Prevent Blindness.

for the LHON REALITY Study Group Rima Hussain^{3,4}, Rasha Jorany^{3,4}, Priyansha Sheel^{3,4}, Lindreth DuBois²⁴, Michele Carbonelli^{6,7}, Lidia Di Vito^{6,7}, Martina Romagnoli^{6,7}, Adam A. DeBusk²⁵, Maria Massini²⁶, Rabih Hage^{10,11}, Gad Heilwei²⁶, Irena Tsui²⁶, Virginia Garcia²⁷, Antonio Morilla²⁷, Piero Barboni²⁸, Maria Lucia Cascavilla²⁸, Marco Battista²⁸, Francesca Calcagno²⁸, Adelaide Pina²⁸

²⁴Emory University School of Medicine, Atlanta, GA, USA; ²⁵Wills Eye Hospital and Sidney Kimmel Medical College of Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA; ²⁶Doheny Eye Institute/UCLA School of Medicine, Los Angeles, CA, USA; ²⁷Department of Ophthalmology, Institut Catala de Retina, Retina, Spain; ²⁸Department of Ophthalmology, University Vita Salute, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milan, Italy

Author contributions All authors participated in the conceptualisation, data collection, analysis, interpretation, writing, and critical review of the manuscript.

Funding GenSight Biologics (Paris, France) fully funded and sponsored the study.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest PYWM is a consultant for GenSight Biologics and Stealth BioTherapeutics and has received research support from GenSight Biologics and Santhera Pharmaceuticals. NJN is a consultant for GenSight Biologics, Santhera Pharmaceuticals and Stealth BioTherapeutics, has received research support from GenSight Biologics and Santhera Pharmaceuticals, served on the Data Safety Monitoring Board for the Quark NAION study and is a medical legal consultant. VC is a consultant for Santhera Pharmaceuticals, GenSight Biologics, and Stealth BioTherapeutics and has received research support from Santhera Pharmaceuticals and Stealth BioTherapeutics. CV C is a consultant for Santhera Pharmaceuticals and GenSight Biologics. VB is a consultant for GenSight Biologics. MM is a consultant for GenSight Biologics and has received research support from GenSight. AAS is a consultant for Stealth BioTherapeutics. LB and MT are GenSight Biologics employees. JAS is a co founder and shareholder of GenSight Biologics, and a patent co author on allotropic transport. Authors declare competing financial interests in relation with the work submitted (see "Acknowledgements" for details).

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing,

adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*. 1988;242:1427–30.
- Carelli V, La Morgia C, Valentino ML, Rizzo G, Carbonelli M, De Negri AM, et al. Idebenone Treatment in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Brain*. 2011;134:1–5.
- Newman NJ. Hereditary optic neuropathies: from the mitochondria to the optic nerve. *Am J Ophthalmol*. 2005;140:517–23.
- Yu Wai Man P, Griffiths PG, Chinnery PF. Mitochondrial optic neuropathies disease mechanisms and therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res*. 2011;30:81–14.
- Yu Wai Man P, Votruba M, Burté F, La Morgia C, Barboni P, Carelli V. A neurodegenerative perspective on mitochondrial optic neuropathies. *Acta Neuropathol*. 2016;132:789–806. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1625-2>
- Carelli V, Carbonelli M, De Co IF, Kawasaki A, Klopstock T, Lagrèze WA, et al. International consensus statement on the clinical and therapeutic management of Leber hereditary optic neuropathy. *J Neuro Ophthalmol*. 2017;37:371–81.
- Puomila A, Hämäläinen P, Kivioja S, Savontaus ML, Koivumäki S, Huoponen K, et al. Epidemiology and penetrance of Leber hereditary optic neuropathy in Finland. *Eur J Hum Genet*. 2007;15:1079–89.
- Sprijit L, Kolbach DN, De Co RF, Plomp AS, Bauer NJ, Smeets HJ, et al. Influence of mutation type on clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Ophthalmol*. 2006;141:676–82.
- Yu Wai Man P, Griffiths PG, Brown DT, Howell N, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *Am J Hum Genet*. 2003;72:333–9.
- Barboni P, Savini G, Valentino ML, La Morgia C, Bellusci C, De Negri AM, et al. Leber's hereditary optic neuropathy with childhood onset. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:5303–9.
- Yu Wai Man P, Griffiths PG, Hudson G, Chinnery PF. Inherited mitochondrial optic neuropathies. *J Med Genet*. 2009;46:145–58.
- Newman NJ, Biousse V. Hereditary optic neuropathies. *Eye*. 2004;18:1144–60.
- Riordan Eva P, Sanders MD, Govan GG, Sweeney MG, Da Costa J, Harding AE. The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation. *Brain*. 1995;118:319–37.
- Yu Wai Man P, Turnbull DM, Chinnery PF. Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Med Genet*. 2002;39:162–9.
- Newman NJ, Lott MT, Wallace DC. The clinical characteristics of pedigrees of Leber's hereditary optic neuropathy with the 11778 mutation. *Am J Ophthalmol*. 1991;111:750–62.
- Giordano C, Iommarini L, Giordano L, Maresca I, Pisano A, Valentino ML, et al. Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2014;137:335–53.

17. Newman NJ, Carelli V, Taiel M, Yu Wai Man P. Visual outcomes in Leber hereditary optic neuropathy patients with the m.11778G>A (MTND4) mitochondrial DNA mutation. *J Neuroophthalmol.* 2020;40:547–57.
18. Guo DY, Wang XW, Hong N, Gu YS. A Meta analysis of the association between different genotypes (G11778A, T14484C and G3460A) of Leber hereditary optic neuropathy and visual prognosis. *Int J Ophthalmol.* 2016;9:1493–8.
19. Majander A, Bowman R, Poulton J, Antcliff RJ, Reddy MA, Michaelides M, et al. Childhood onset Leber hereditary optic neuropathy. *Br J Ophthalmol.* 2017;101:1505–9.
20. Klopstock T, Yu Wai Man P, Dimitriadis K, Rouleau J, Heck S, Bailie M, et al. A randomized placebo controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain.* 2011;134:2677–86.
21. Carelli V, Ross Cisneros FN, Sadun AA. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog Retin Eye Res.* 2004;23:53–89.
22. Catarino CB, Von Livonius B, Priglinger C, Bönik R, Matloob S, Tamhankar MA, et al. Real world clinical experience with Idebenone in the treatment of Leber Hereditary Optic Neuropathy. *J Neuroophthalmol.* 2020;40:558–65.
23. Yu Wai Man P, Newman NJ, Carelli V, Moster ML, Biousse V, Sadun AA, et al. Bilateral visual improvement with unilateral gene therapy injection for Leber hereditary optic neuropathy. *Sci Transl Med.* 2020;12:eaa7423.
24. Newman NJ, Yu Wai Man P, Carelli V, Moster ML, Biousse V, Vignal Clermont C, et al. Efficacy and safety of intravitreal gene therapy for Leber hereditary optic neuropathy treated within 6 months of disease onset. *Ophthalmology.* 2021 In press. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2020.12.012>.
25. Guy J, Feuer WJ, Davis JL, Porciatti V, Gonzalez PJ, Koilkonda RD, et al. Gene therapy for Leber hereditary optic neuropathy: low and medium dose visual results. *Ophthalmology.* 2017;124:1621–34.
26. Yuan J, Zhang Y, Liu H, Wang D, Du Y, Tian Z, et al. Seven year follow up of gene therapy for Leber's hereditary optic neuropathy. *Ophthalmology.* 2020;127:1125–7.
27. Lange C, Feltgen N, Junker B, Schulze Bonsel K, Bach M. Resolving the clinical acuity categories "hand motion" and "counting fingers" using the Freiburg Visual Acuity Test (FrACT). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009;247:137–42.
28. Guy J, Feuer WJ, Porciatti V, Schiffman J, Abukhalil F, Van denbroucke R, et al. Retinal ganglion cell dysfunction in asymptomatic G11778A: Leber hereditary optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55:841–8.
29. Hwang TJ, Karanjia R, Moraes Filho MN, Gale J, Show Tran J, Chu ER, et al. Natural History of Conversion of Leber's Hereditary Optic Neuropathy: A Prospective Case Series. *Ophthalmology.* 2017;124:843–50.
30. Hotta Y, Fujiki K, Hayakawa M, Nakajima A, Kanai A, Mashima Y, et al. Clinical features of Japanese Leber's hereditary optic neuropathy with 11778 mutation of mitochondrial DNA. *Jpn J Ophthalmol.* 1995;39:96–108.
31. Van Senu AH. Leber's disease in the Netherlands. *Doc Ophthalmol.* 1963;17:1162.
32. Rosenberg T, Nørby S, Schwartz M, Saillard J, Magalhães PJ, Leory D, et al. Prevalence and genetics of Leber hereditary optic neuropathy in the Danish population. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57:1370–5.
33. Harding AE, Riordan Eva P, Govan GG. Mitochondrial DNA diseases: genotype and phenotype in Leber's hereditary optic neuropathy. *Muscle Nerve Suppl.* 1995;3:S82–84.
34. Bargiela D, Chinnery PF. Mitochondria in neuroinflammation multiple sclerosis (MS), Leber hereditary optic neuropathy (LHON) and LHON MS. *Neurosci Lett.* 2019;710:132932.
35. Nikoskelainen EK, Huoponen K, Juvonen V, Lamminen T, Nummelin K, Savontaus ML. Ophthalmologic findings in Leber hereditary optic neuropathy, with special reference to mtDNA mutations [published correction appears in. *Ophthalmology* 1996 Jul;103(7):998]. *Ophthalmology.* 1996;103:504–14.

Affiliations

Patrick Yu-Wai-Man^{1,2,3,4} · Nancy J. Newman⁵ · Valerio Carelli^{6,7} · Chiara La Morgia^{6,7} · Valérie Biousse⁵ · Francesco M. Bandello^{8,9} · Catherine Vignal Clermont^{10,11} · Lorena Castillo Campillo¹² · Stephanie Leruez¹³ · Mark L. Moster¹⁴ · Dean M. Cestari¹⁵ · Rod Foroozan¹⁶ · Alfredo Sadun¹⁷ · Rustum Karanjia^{17,18} · Neringa Jurkute^{3,4} · Laure Blouin¹⁹ · Magali Taiel¹⁹ · José-Alain Sahel^{20,21,22,23} · for the LHON REALITY Study Group

¹ Cambridge Centre for Brain Repair and MRC Mitochondrial Biology Unit, Department of Clinical Neurosciences, University of Cambridge, Cambridge, UK

² Cambridge Eye Unit, Addenbrooke's Hospital, Cambridge University Hospitals, Cambridge, UK

³ Moorfields Eye Hospital, London, UK

⁴ UCL Institute of Ophthalmology, University College London, London, UK

⁵ Departments of Ophthalmology, Neurology and Neurological Surgery, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA, USA

⁶ IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna, UOC Clinica Neurologica, Bologna, Italy

⁷ Unit of Neurology, Department of Biomedical and Neuromotor Sciences (DIBINEM), University of Bologna, Bologna, Italy

⁸ Department of Ophthalmology, Vita Salute San Raffaele University, Milan, Italy

⁹ IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy

¹⁰ Department of Neuro Ophthalmology and Emergencies, Rothschild Foundation Hospital, Paris, France

¹¹ Centre Hospitalier National d'Ophthalmologie des Quinze Vingts, Paris, France

¹² Institut Catala de Retina, Barcelona, Spain

¹³ CHU Angers Hôpital Hôtel Dieu, Angers, France

- ¹⁴ Departments of Neurology and Ophthalmology, Wills Eye Hospital and Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA
- ¹⁵ Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, MA, USA
- ¹⁶ Alkek Eye Center, Houston, TX, USA
- ¹⁷ Doheny Eye Center UCLA, Department of Ophthalmology David Geffen School of Medicine at UCLA, Doheny Eye Institute, Los Angeles, CA, USA
- ¹⁸ Department of Ophthalmology, University of Ottawa Eye, Ottawa, ON, Canada
- ¹⁹ GenSight Biologics, Paris, France
- ²⁰ Université de la Sorbonne, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 75012 Paris, France
- ²¹ Fondation Ophthalmologique A. de Rothschild, 25–29 rue Manin, 75019 Paris, France
- ²² Department of Ophthalmology, The University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA
- ²³ CHNO des Quinze Vingts, Institut Hospitalo Universitaire FOReSIGHT, INSERM DGOS CIC, 1423 Paris, France

7.2. Real-world clinical experience with idebenone in the treatment of Leber hereditary optic neuropathy

Resumen

Introducción: La LHON causa pérdida de visión central bilateral. En un ensayo clínico, la idebenona demostró ser segura y aportar una tendencia hacia la mejoría de la agudeza visual, pero la evidencia de su efectividad a largo plazo en la práctica clínica es escasa.

Métodos: Realizamos un análisis abierto no controlado, retrospectivo y multicéntrico de la seguridad y la agudeza visual a largo plazo en 111 pacientes tratados con idebenona (900 mg/día) en un programa de acceso expandido. Los pacientes candidatos tenían una mutación confirmada del mtDNA y habían experimentado el inicio de los síntomas (en el ojo más reciente) durante el año previo al reclutamiento. Los datos sobre la agudeza visual y los efectos adversos fueron obtenidos mediante una visita ordinaria de la práctica clínica. La eficacia fue valorada mediante la proporción de pacientes con una recuperación clínicamente relevante (CRR) o una estabilización clínicamente relevante (CRS) de la agudeza visual. En el caso de la CRR, también fueron estudiados el tiempo hasta la recuperación y su magnitud a lo largo del tiempo.

Resultados: En el momento del análisis, se habían proporcionado datos de eficacia longitudinal en 87 pacientes. La duración media del tratamiento fue de 25.6 meses. Se observó una CRR en un 46.0 % de los pacientes. El análisis del efecto del tratamiento en cuanto a su duración mostró que la proporción de pacientes con recuperación y la magnitud de esta aumentaron con la duración del tratamiento. Un 50 % de los pacientes que tenían una agudeza visual por debajo de 1.0 logMAR en, al menos, un ojo al inicio del tratamiento consiguieron mantener su visión por debajo de ese umbral hasta la última observación. La idebenona fue bien tolerada.

Conclusiones: Estos datos demuestran los efectos beneficiosos del tratamiento con idebenona en cuanto a la recuperación de la pérdida visual y al mantenimiento de una buena visión residual en la práctica clínica. En conjunto, estos hallazgos indican que el tratamiento con idebenona debería iniciarse pronto y mantenerse durante más de 24 meses para maximizar su eficacia. Los resultados de seguridad fueron consistentes con el perfil de seguridad conocido de la idebenona.

Clinical Research: Epidemiology Meets Neuro-Ophthalmology

OPEN

Section Editors: Heather E. Moss, MD, PhD
Stacy L. Pineles, MD

Real-World Clinical Experience With Idebenone in the Treatment of Leber Hereditary Optic Neuropathy

Claudia B. Catarino, MD, PhD, Bettina von Livonius, MD, Claudia Priglinger, MD, Rudrani Banik, MD, Selma Matloob, MBChB, MRCOphth, Madhura A. Tamhankar, MD, Lorena Castillo, MD, Christoph Friedburg, MD, FEBO, Christopher A. Halfpenny, MBBS, PhD, John A. Lincoln, MD, PhD, Ghislaine L. Traber, MD, Gölge Acaroglu, MD, Graeme C. M. Black, DPhil, FRCOphth, Carlos Doncel, MD, Clare L. Fraser, MBBS, MMed, Joanna Jakubaszko, MD, PhD, Klara Landau, MD, FEBO, Stefan J. Langenegger, MD, FEBO, Francisco J. Muñoz Negrete, MD, PhD, Nancy J. Newman, MD, Joanna Poulton, DM, MRCPCH, Elisabetta Scoppettuolo, MBBS, FRCOphth, Prem Subramanian, MD, PhD, Ahmed T. Toosy, MBBS, FRCP, Mariona Vidal, MD, Andrea L. Vincent, MBChB, MD, Marcela Votruba, BM BCh, FRCOphth, Marcin Zarowski, MD, PhD, Adam Zermansky, MBChB, FRCP, Felice Lob, MD, Günther Rudolph, MD, Oskars Mikazans, MA, Magda Silva, Xavier Liòria, MD, Günther Metz, PhD, Thomas Klopstock, MD

Background: Leber hereditary optic neuropathy (LHON) leads to bilateral central vision loss. In a clinical trial setting, idebenone has been shown to be safe and to provide a trend toward improved visual acuity, but long-term evidence of effectiveness in real-world clinical practice is sparse.

Methods: Open-label, multicenter, retrospective, non-controlled analysis of long-term visual acuity and safety in 111 LHON patients treated with idebenone (900 mg/day) in an expanded access program. Eligible patients had a confirmed mitochondrial DNA mutation and had experienced the onset of symptoms (most recent eye) within 1 year before enrollment. Data on visual acuity and adverse events were collected as per normal clinical practice. Efficacy was assessed as the proportion of patients with either a clinically relevant recovery (CRR) or a clinically relevant stabilization (CRS) of visual acuity. In the case of CRR, time to and magnitude of recovery over the course of time were also assessed.

Results: At time of analysis, 87 patients had provided longitudinal efficacy data. Average treatment duration was 25.6 months. CRR was observed in 46.0% of patients. Analysis of treatment effect by duration showed that the proportion of patients with recovery and the magnitude of recovery increased with treatment duration. Average gain in best-corrected visual acuity for responders was 0.72 logarithm of the minimal angle of resolution (logMAR), equivalent to more than 7 lines on the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) chart. Furthermore, 50% of pa-

tients who had a visual acuity below 1.0 logMAR in at least one eye at initiation of treatment successfully maintained their vision below this threshold by last observation. Idebenone was well tolerated, with most adverse events classified as minor.

Conclusions: These data demonstrate the benefit of idebenone treatment in recovering lost vision and maintaining good residual vision in a real-world setting. Together, these findings indicate that idebenone treatment should be initiated early and be maintained more than 24 months to maximize efficacy. Safety results were consistent with the known safety profile of idebenone.

Journal of Neuro Ophthalmology 2020;40:558-565

doi: 10.1097/WNO.0000000000001023

© 2020 The Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the North American Neuro Ophthalmology Society.

Leber hereditary optic neuropathy (LHON) is a form of blindness due to retinal ganglion cell dysfunction (1), caused by mutations in mitochondrial DNA (mtDNA), which affect complex I (NADH ubiquinone oxidoreductase) of the mitochondrial respiratory chain (2,3). Although rare (estimated prevalence of 1 in 27,000-45,000), it affects all ages and gender, causing rapid and severe, bilateral (usually sequential), painless loss of central vision (4-7). Spon-

Clinical Research: Epidemiology Meets Neuro-Ophthalmology

taneous recovery is rare (8/11). Idebenone is a synthetic short chain benzoquinone that bypasses the dysfunctional complex I and restores mitochondrial function, thus increasing ATP production and reducing lipid peroxidation and oxidative stress (12-14).

The first randomized double blind placebo controlled trial of idebenone in LHON patients (Rescue of Hereditary Optic Disease Outpatient Study [RHODOS]) demonstrated a trend toward an improved best corrected visual acuity (BCVA) in the idebenone treated intent to treat population compared with placebo (15). Idebenone (Raxone, idebenone 150 mg tablets, Santhera Pharmaceuticals, Pratteln, Switzerland) is since 2015 the first and currently the only approved treatment (European Medicines Agency (EMA) approval in the European Union and some other countries) for adults and adolescents with LHON.

In 2011, the manufacturer setup an international Expanded Access Program (EAP) to provide special access to idebenone, within local regulations, provided they had a genetically confirmed LHON and disease duration of less than 12 months since the onset of vision loss (most recently affected eye). All requests for access to idebenone were unsolicited, and the manufacturer was not involved in any clinical decision. Here, we describe the EAP patient population and report on clinical outcomes and safety, after ongoing long term treatment with idebenone in clinical practice.

METHODS

The idebenone dose and duration of therapy were entirely at the discretion of the treating physician. Patient follow up was in accordance with routine clinical practice, typically at 3 month intervals.

For each participant, data on visual acuity (VA) and adverse events (AEs) were collected. The BCVA was generally assessed using Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) charts with logarithm of the minimal angle of resolution (logMAR) values or converted from standard Snellen notation to logMAR for analysis purposes (16). Efficacy was evaluated by outcome criteria. Clinically relevant stabilization (CRS) of BCVA was defined as a patient having a logMAR of <1.0 at baseline (above the threshold of severe vision loss/legal blindness in the United States (17)) in at least one eye that was maintained in this eye at their last observation visit (LV). A clinically relevant recovery (CRR) of BCVA was defined as an improvement from off chart (i.e., unable to read any letters on an ETDRS chart from 1 m; >1.68 logMAR) to on chart by at least one full line (5 letters), or an improvement in an on chart BCVA by at least 2 lines (10 letters; 0.2 logMAR). The time to initial observation of a CRR was taken as the criterion for an event based analysis, and the magnitude of recovery is reported as the best recovery observed for

Department of Neurology (CBC, OM, TK), Friedrich Baur Institute, University Hospital of the Ludwig Maximilians University, Munich, Germany; German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE) (CBC, TK), Munich, Germany; Department of Ophthalmology (BL, CP, FL, GR), University Hospital of the Ludwig Maximilians University Munich, Germany; New York Eye and Ear Infirmary of Mount Sinai (RB), New York, New York; Ophthalmology Department (SM), Waikato Hospital, Hamilton, New Zealand; Scheie Eye Institute (MAT), University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania; Institut Català de Retina (LC), Barcelona, Spain; Augenklinik (CF), Universitätsklinikum Giessen, Giessen, Germany; University Hospital Southampton (CAH), Southampton, United Kingdom; McGovern Medical School (JAL), UTH Health, Houston, Texas; Department of Ophthalmology (GLT, KL, SJL), University Hospital and University of Zurich, Zurich, Switzerland; Neuro ophthalmology Associates (GA), Ankara, Turkey; Manchester Centre for Genomic Medicine (GCMB), Central Manchester University Hospitals NHS Foundation Trust, Manchester Academic Health Sciences Centre, St Mary's Hospital, Manchester, United Kingdom; Division of Evolution and Genomic Sciences (GCMB), Neuroscience and Mental Health Domain, School of Health Sciences, Faculty of Biology, Medicines and Health, University of Manchester, Manchester Academic Health Science Centre, Manchester, United Kingdom; Ophthalmology Unit (CD), Hospital de Poniente, El Ejido, Almería, Spain; SaveSight Institute (CLF), University of Sydney, Sydney, Australia; Department of Pediatric Traumatology and Emergency Medicine (JJ), Wrocław Medical University, Poland; Poland SPEKTRUM Ophthalmology Clinic (JJ), Wrocław, Poland; University Hospital Ramon y Cajal (FJM N), IRYCIS, Madrid, Spain; Emory University School of Medicine (NJJN), Atlanta Georgia; Nuffield Dept Obstetrics and Gynaecology (JP), University of Oxford, The Women's Centre, Oxford, United Kingdom; Department of Ophthalmology (ES), East Kent Hospitals University Foundation Trust, United Kingdom; Neuro Ophthalmology Division (PS), University of Colorado School of Medicine, Aurora, Colorado; Department of Neuroinflammation (ATT), Queen Square MS Centre, UCL Institute of Neurology, University College London, London, United Kingdom; Hospital Sant Joan de Déu Barcelona (MV), Barcelona, Spain; Eye Department (ALV), Greenlane Clinical Centre, Auckland, New Zealand; School of Optometry and Vision Sciences (MV), Cardiff University, Cardiff, United Kingdom; Department of Developmental Neurology (MZ), Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland; Manchester Centre for Clinical Neuroscience (AZ), Salford Royal NHS Foundation Trust, Salford, United Kingdom; Neuro ophthalmology Unit (MS, XL, GM) Santhera Pharmaceuticals, Pratteln, Switzerland; and Munich Cluster for Systems Neurology (SyNergy) (TK), Munich, Germany.

M. Silva, G. Metz, and X. Lloba are regular employees of Santhera. T. Klopstock has received research support, consultancy fees, speaker honoraria, and travel funds from GenSight Biologics and Santhera Pharmaceuticals, unrelated to this paper. The remaining authors report no conflicts of interest.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.jneuroophthalmology.com).

Neither physicians nor authors received funding for managing patients, collecting data, or write the paper. Statistical analysis was funded by Santhera Pharmaceuticals.

Address correspondence to Thomas Klopstock, MD, Department of Neurology, Friedrich Baur Institute, University Hospital of the Ludwig Maximilians Universität Ziemssenstr. 1a, 80336 Munich, Germany; E mail: thomas.klopstock@med.uni-muenchen.de

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial No Derivatives License 4.0 (CCBY NC ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

Clinical Research: Epidemiology Meets Neuro-Ophthalmology

a patient. Safety and pregnancy information was collected according to the applicable pharmacovigilance (PV) requirements (see Supplemental Digital Content, Data E1, <http://links.lww.com/WNO/A407>).

Ethics approval was obtained by the Ethical Committee of the Ludwig Maximilian University of Munich in accordance with the Declaration of Helsinki.

RESULTS

At the time of data cut off (June 2018), 111 patients from 38 sites in 10 countries had received at least one dose of idebenone and were included in the safety population (SP). Of those, all 87 patients, who carried one of the 3 major LHON mtDNA mutations, had a symptom onset within the 12 months previous to the start of treatment and who had baseline data and at least one follow up visit with BCVA data after baseline were included in the efficacy population (EP). A flowchart of patients qualifying for safety and efficacy populations or nonqualifying is shown in Supplemental Digital Content, Figure E1, <http://links.lww.com/WNO/A407>. The mean treatment duration was 25.6 months (2.4-70.4) (Table 1).

Patient demographics were generally representative of the known disease characteristics of LHON. Three patients, all G11778A carriers, reportedly had one eye declared unaffected at baseline, namely, a 14 year old boy, a 16 year old boy and a 21 year old woman.

Clinically Relevant Stabilization of BCVA

In the EP, 24 of the 87 subjects had a BCVA at baseline better than <1.0 logMAR in at least one eye, 50% (12/24) of whom experienced CRS (Table 1 and 2). For patients with CRS, the mean BCVA improved from 0.47 logMAR at baseline to 0.29 logMAR at the LV.

Of the 3 patients with one unaffected eye at baseline, the 16 year old patient deteriorated to an off chart BCVA in both eyes after 6 months of therapy, with no recovery at the LV. However, both the 14 year old male patient and the 21 year old female patient still had a normal BCVA at the LV after 12 months' follow up. These 2 patients also had a CRR in the fellow eye, which had presented with a BCVA worse than 1.0 logMAR at start of treatment.

Clinically Relevant Recovery of BCVA from Nadir

Of the 87 patients, 40 patients (46.0%) (by eyes, 67/173; 38.7%) had a CRR from nadir to the LV (Table 3). The proportion of eyes with a CRR is lower than the proportion of patients with a CRR because not all patients experienced recovery in both eyes. Time to initial observation in patients with a CRR varied between 2.5 and 26.5 months, with a mean of 9.5 months (Fig. 1). The magnitude of recovery of patient's best recovering eye averaged 0.45 logMAR at

initial observation of CRR and increased to 0.72 logMAR by the LV. This increase of the magnitude of response with longer treatment duration is confirmed when the magnitude of CRR was analyzed specifically in 22 eyes that had demonstrated a CRR by 6 months and for which follow up data of 12 month or longer were available (Fig. 2, right). Eyes that eventually achieve a CRR and important VA improvement can, nevertheless, show some degree of transient deterioration into a nadir, despite the start of treatment (Fig. 2, left and Supplemental Digital Content, Data E2, <http://links.lww.com/WNO/A408>). Eyes can show a CRR regardless of VA category achieved at nadir. For 173 eyes in 87 patients (one patient's eye had vision loss attributed to another ocular pathology), at nadir 86 (49.7%) were off chart; 76 (43.9%) had a BCVA 1.0-1.68 logMAR; and 11 (6.4%) had a BCVA below 1.0 logMAR. For eyes that at nadir were off chart, 24.4% had a CRR, compared with 53.9% from those between 1.0-1.68 logMAR and 45.5% of those better than 1.0 logMAR at nadir (Supplemental Digital Content, Data E2, <http://links.lww.com/WNO/A408>).

The overall outcome resulting from the shift of patients across BCVA categories is visualized in Figure 3.

Safety

The cumulative exposure to idebenone in the SP was 1,981 patient months. Although patient adherence data are not available, idebenone (150 mg tablets) was prescribed at a daily dose of 900 mg (300 mg three times a day).

In the 111 patients treated with idebenone, 65 AEs (60.7% mild; 4.5% moderate; 4.5% severe) were reported in 32 patients. The most common AEs were gastrointestinal (n = 17), with diarrhea the most frequent (n = 5). Nine serious AEs were reported in 7 patients (all considered "not related" to treatment). Three cases with a fatal outcome, unrelated to idebenone use, were reported. Nine patients discontinued treatment because of AEs.

DISCUSSION

The data from this EAP provide unique and novel insights into the efficacy and safety of idebenone treatment in LHON in a real world setting. Patients with LHON experience rapid vision loss, thus 2 therapeutic goals may be defined depending on the stage of progression. For patients who have suffered a relevant degree of vision loss, the aim is to improve the BCVA as much as possible, at least to a CRR. For patients with relevant residual vision, stabilization of BCVA is important, particularly if 'severe vision loss' has not yet been reached. Achieving either goal, CRR or CRS, may be considered a clinically relevant benefit for patients.

Clinically Relevant Stabilization

Vision loss in untreated patients is rapid (5), with more than 70% of eyes progressing to a BCVA worse than 1.0

Clinical Research: Epidemiology Meets Neuro-Ophthalmology

TABLE 1. Patient demographics and baseline (BL) values*. Efficacy population (EP) by mutation†

	All	G11778A	G3460A	T14484C
Patients in the EP	87/87 (100%)	54/87 (62.1%)	17/87 (19.5%)	16/87 (18.4%)
Treatment duration (mo)‡	25.6 ± 16.9 (2.4 70.4)	24.9 ± 17.4 (3.2 70.4)	27.7 ± 16.7 (4.4 61.0)	25.5 ± 16.0 (2.4 53.8)
Gender male	71/87 (82%)	45/54 (83%)	13/17 (77%)	13/16 (81%)
Age at onset (y)	31.4 ± 17.3 (6.6 78.9)	33.3 ± 17.5 (12.1 78.9)	28.4 ± 16.8 (6.6 64.5)	28.1 ± 16.9 (8.5 56.2)
Adolescent at onset (age 12-17 y)	22/87 (25.3%)	11/54 (20.4%)	6/17 (35.3%)	5/16 (31.3%)
Childhood onset (<12 y of age)	3/87 (3.4%)	0/54 (0%)	1/17 (5.9%)	2/16 (12.5%)
Time since onset at baseline§ (mo)	4.6 ± 3.0 (0.3 11.5)	4.3 ± 2.7 (0.4 11.4)	5.9 ± 3.7 (0.3 11.5)	4.4 ± 2.8 (0.9 9.3)
Interval of onset between eyes¶# (mo)	1.7 ± 2.5 (0.0 12.6)	1.8 ± 2.5 (0.0 10.0)	1.9 ± 3.1 (0.0 12.6)	0.9 ± 1.3 (0.0 4.7)
BCVA at baseline [logMAR]§	1.23 ± 0.52 (-0.18 1.8)	1.22 ± 0.59 (-0.18 1.8)	1.37 ± 0.38 (0.40 1.80)	1.12 ± 0.39 (0.28 1.80)
Baseline BCVA off chart**	17/87 (20%)	13/54 (24%)	3/17 (18%)	1/16 (6%)
Baseline BCVA from 1.0 to 1.68 logMAR	46/87 (53%)	25/54 (46%)	11/17 (65%)	10/16 (63%)
Baseline BCVA <1.0 logMAR	24/87 (28%)	16/54 (30%)	3/17 (18%)	5/16 (31%)

Values are given as n (%) or mean ± SD and minimum maximum (in parentheses); percentages may not total to 100% due to rounding.
 *Data cut off: June 2018.
 †For information on EP flow see **Supplemental Digital Content**, Supplemental Data A, <http://links.lww.com/WNO/A407>.
 ‡Treatment duration was not predetermined and was decided by the treating physician according to his/her criteria as per routine clinical practice.
 §BCVA off chart values are imputed to 1.8 logMAR see **Supplemental Digital Content**, Supplemental Data A, <http://links.lww.com/WNO/A407>.
 ¶Time since onset: time from symptoms onset to start of treatment (baseline) in the most recently affected eye.
 #Three patients were reported by the treating physician to have one asymptomatic eye at baseline.
 Off chart values: not reading any letter on the ETDRS chart at 1 m (i.e., >1.68 logMAR) (Supplemental Digital Content**, Supplemental Data A, <http://links.lww.com/WNO/A407>).
 §BCVA, best corrected visual acuity; CRR, clinically relevant recovery; CRS, clinically relevant stabilization; logMAR, logarithm of the minimal angle of resolution; mo, months; y, years.

TABLE 2. Clinically relevant stabilization (CRS) for the subset of patients with a BCVA at baseline <1.0 logMAR. Efficacy population (EP)*† by mutation

	All	G11778A	G3460A	T14484C
BCVA stabilization: Patients with CRS‡	12/24 (50%)	7/16 (44%)	1/3 (33%)	4/5 (80%)
BCVA at baseline [logMAR]	0.47 ± 0.36 (0.18-0.96)	0.31 ± 0.34 (0.18-0.88)	0.94	0.62 ± 0.28 (0.28-0.96)
BCVA at last observation [logMAR]	0.29 ± 0.29 (0.16-0.8)	0.35 ± 0.34 (0.16-0.8)	0.34	0.17 ± 0.29 (0.14-0.42)
Treatment duration [months]§	30.1 ± 19 (9.9-67.8)	25.5 ± 20.6 (10.7-67.8)	40.0	35.8 ± 18.6 (9.9-53.8)

Values are given as n (%) or mean ± SD and minimum maximum (in parentheses); Percentages may not total to 100% due to rounding.
 *Data cut off: June 2018.
 †For information on EP flow see **Supplemental Digital Content**, Supplemental Data A, <http://links.lww.com/WNO/A409>.
 ‡CRS: BCVA had to be maintained in an eye with BCVA <1.0 logMAR at start of the treatment.
 §Calculations only consider patients with CRS (12 patients).
 §BCVA, best corrected visual acuity; CRS, clinically relevant stabilization; logMAR, logarithm of the minimal angle of resolution.

Clinical Research: Epidemiology Meets Neuro-Ophthalmology

TABLE 3. Clinically relevant recovery (CRR) by patient. Efficacy population (EP)*† by mutation

	All	G11778A	G3460A	T14484C
BCVA recovery: Patients with a CRR †	40/87 (46.0%)	21/54 (39%)	7/17 (41%)	12/16 (75%)
Time to an initial CRR [months]	9.5 ± 7.0 (2.5-26.5)	11.2 ± 7.8 (2.5-26.5)	7.3 ± 3.4 (2.5-12.9)	7.8 ± 6.8 (3.0-25.6)
Magnitude of recovery at initial CRR				
logMAR	0.45 ± 0.31 (0.20-1.62)	0.39 ± 0.32 (0.20-1.62)	0.39 ± 0.20 (0.22-0.76)	0.60 ± 0.30 (0.22-1.20)
No. of letters ETDRS	22 ± 15 (10-81)	19 ± 16 (10-81)	19 ± 10 (11-38)	30 ± 15 (11-60)
Magnitude of recovery at last observation				
logMAR	0.72 ± 0.46 (0.20-1.80)	0.52 ± 0.39 (0.20-1.76)	0.61 ± 0.31 (0.24-1.10)	1.12 ± 0.40 (0.46-1.80)
No. of letters ETDRS	36 ± 23 (10-90)	26 ± 19 (10-88)	30 ± 15 (12-55)	56 ± 20 (23-90)

Values are given as n (%) or mean ± SD and minimum maximum (in parentheses); percentages may not total to 100% due to rounding.
 *Data cut off June 2018.
 †For information on EP flow see **Supplemental Digital Content**, Supplemental Data A, <http://links.lww.com/WNO/A407>.
 ‡CRR is improvement from an off chart BCVA to on chart by the equivalent of at least one full line on an ETDRS chart (5 letters) or an improvement in an on chart BCVA by the equivalent of at least 2 lines (10 letters).
 §BCVA, best corrected visual acuity; CRR, clinically relevant recovery; ETDRS, Early Treatment Diabetic Retinopathy Study; logMAR, logarithm of the minimal angle of resolution.

logMAR (20/200 Snellen) within 3 months (4,18). Accordingly, only 27.6% patients had a BCVA better than 1.0 logMAR at baseline (mean 4.6 months after a symptom onset) (Table 1). Although it is to be expected that most patients would further progress if untreated, with treatment, half of them (12/24, 50.0%) maintained a BCVA below this threshold after an average follow up time of 24.3 months. One key limitation of CRS is that it does not take into account the fact that the BCVA could still have deteriorated significantly, but not enough to cross the 1.0 logMAR threshold, so it would still qualify as CRS

despite having deteriorated. Interestingly, the mean BCVA for these patients improved from 0.47 to 0.29 logMAR, corresponding to 9 letters on the ETDRS chart. Compared with the natural disease course, early idebenone treatment provides an opportunity to prevent severe vision loss over a timespan when further BCVA deterioration would be expected for most patients (19).

In most cases, the journey to LHON diagnosis after a symptom onset takes weeks or months, usually not allowing for treatment initiation until the second eye becomes affected. Notably, in the EAP, only 3 patients

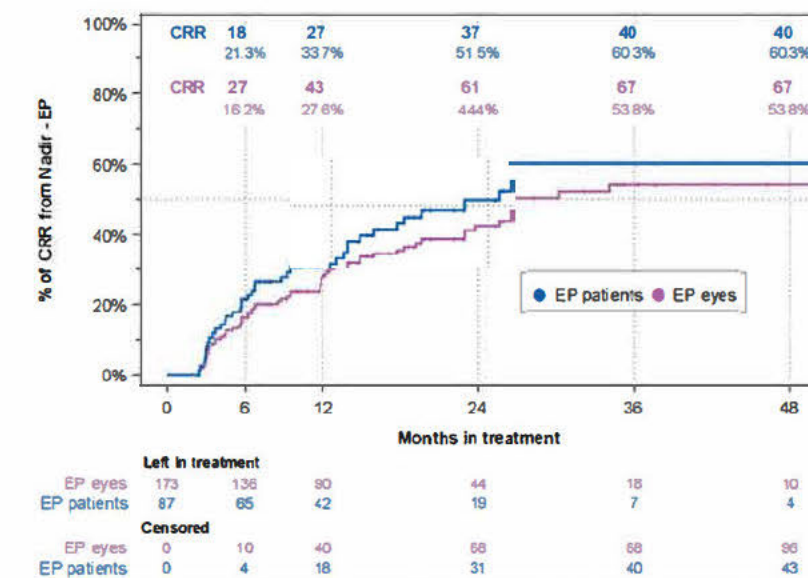


FIG. 1. Kaplan-Meier curves of clinically relevant recovery (CRR). Cumulative percentage of total number of patients and eyes, respectively, with a CRR, as a function of treatment duration, in the efficacy population (EP).

Clinical Research: Epidemiology Meets Neuro-Ophthalmology

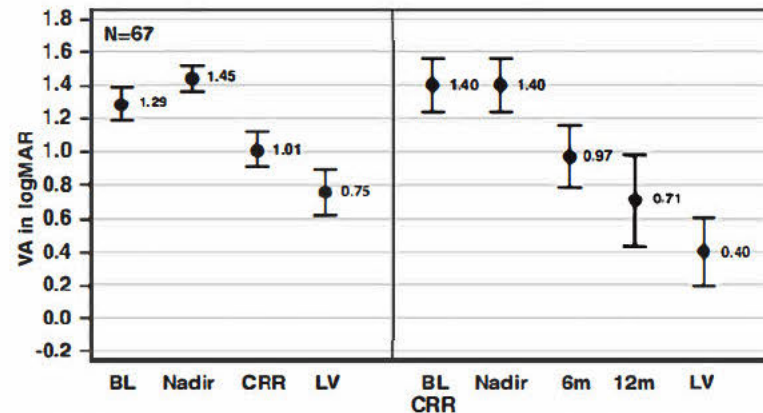


FIG. 2. Magnitude of mean BCVA recovery over the course of time in eyes with a CRR. Magnitude of best-corrected visual acuity (BCVA) recovery in eyes with a clinically relevant recovery (CRR). Left: Average BCVA observed at baseline (BL), nadir, initial observation of CRR, and at the last observation visit (LV) for all eyes that experienced a CRR (n = 67). Right: Improvement of BCVA over the course of time, at given treatment durations, in those eyes that experienced a CRR within 6 months of treatment initiation and where follow-up data were available (n = 22). All mutations. All off-chart VA values were imputed to 1.8 logMAR. Error bars indicate the 95% CI.

Best VA - EP

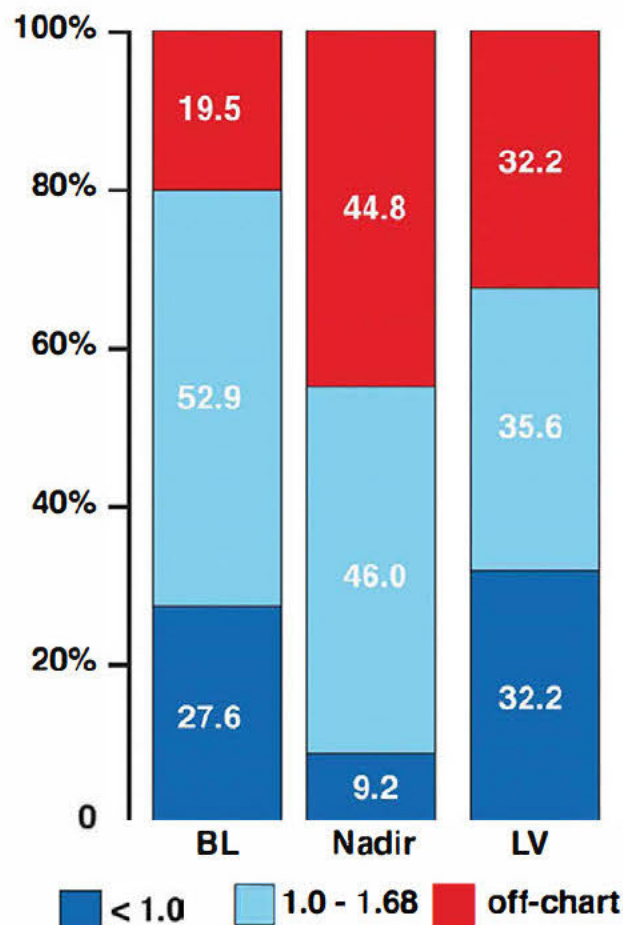


FIG. 3. Shift of patients, over the course of treatment time, across categories of BCVA (efficacy population, n= 87). Bar chart for distribution of patients based on categories for the best-corrected visual acuity (BCVA) at baseline (BL), at nadir, and at the last observation visit (LV) mutations. EP, efficacy population.

had one unaffected eye at the start of treatment, 2 of which maintained this status at the LV. Although the numbers are low, this contrasts with a previous case series, in which all 6 patients starting idebenone treatment with an unaffected eye subsequently experienced a BCVA decrease in these eyes (8). Although this is a good indication of a favorable effect, the small numbers mean it remains to be seen whether idebenone can indeed prevent the onset of symptoms, that is, in patients starting treatment “in between” onset in the eyes. This can be further explored once better referral and earlier diagnosis result in widespread early treatment of the disease.

Clinically Relevant Recovery

Vision loss in patients with LHON is mostly permanent (19). However, in the EAP, almost one in 2 patients (40/87, 46.0%) treated with idebenone experienced a CRR after a mean treatment duration of 9.48 months. This is comparable with the 45.5% (20/44) responder rate for idebenone treated patients in a case series using similar criteria to define recovery (8), and of 42.9% (6/14) reported for a smaller patient cohort treated with idebenone and vitamin B2 (9). Both of these retrospective studies reported lower rates of recovery, 32.2% (8) and 28.6% (9), for the untreated, in study control groups. Although the EAP did not have a control group, a recently conducted, large retrospective case record survey provided rates of CRR using identical criteria as in the EAP (20,21). In this study, 31.1% of untreated patients (23/74) experienced a CRR, a proportion again in line with the untreated groups of the 2 cohort studies (8,9).

Rate of Recovery as a Function of Treatment Duration

This EAP provides a large data set in patients treated for an average of more than 2 years (in RHODOS was 6 months).

Clinical Research: Epidemiology Meets Neuro-Ophthalmology

TABLE 4. Clinically relevant recovery (CRR) by individual eyes as a function of BCVA at nadir. Efficacy population (EP)*†

VA Category at Nadir	Eyes	Eyes With a CRR† Within Category	Eyes With a CRR and BCVA [logMAR] at the Last Observation		
			BCVA > 1.0	>0.5 BCVA <1.0	BCVA ≤ 0.5
Off chart	86/173 (49.7%)	21/86 (24%)	14	2	5
From 1.0 to 1.68 logMAR	76/173 (44%)	41/76 (54%)	12	13	16
Below 1.0 logMAR	11/173 (6%)	5/11 (46%)	na	0	5
All§	173/173 (100%)	67/173 (39%)	26	15	26

Values are given as n (%); Percentages may not total to 100% due to rounding.
 *Data cut off June 2018.
 †For information on EP flow see Supplemental Digital Content, Supplemental Data A, <http://links.lww.com/WNO/A407>.
 ‡CRR is improvement from an off chart BCVA to on chart by the equivalent of at least one full line on an ETDRS chart (5 letters) or an improvement in an on chart BCVA by the equivalent of at least 2 lines (10 letters) at LV.
 §One patient had vision loss in one eye not related to LHON.
 ¶BCVA, best-corrected visual acuity; CRR, clinically relevant recovery; logMAR, logarithm of the minimal angle of resolution; na, not applicable.

In the EAP, time from start of therapy to initial observation of CRR varies from 2.5 to 26.5 months (Table 3). This provides evidence for a benefit of longer idebenone treatment in LHON because only 45.0% of the total responders had experienced their first recovery by 6 months. The responder rate increased with treatment duration up to 12 months, but 33% patients experienced a CRR later, with some only showing initial improvement after 24 months of treatment (Fig. 1).

Magnitude of Recovery as a Function of Treatment Duration

Evaluating the impact of continued therapy after an initial CRR has been observed is very relevant. At the initial CRR, the average magnitude of best recovery by subject was 23 letters, which increased to 36 letters (7 lines ETDRS) by the LV. This effect was also observed for individual eyes with a CRR (n = 67) where after first worsening to a nadir, later improved at initial observation of CRR and further at the LV (mean recovery of 35 letters from nadir) (Fig. 2, left). Finally, in a subset of eyes demonstrating an early CRR (within 6 months), the magnitude of CRR continued to increase with prolonged treatment, from 21 letters after 6 months to 50 letters by the LV (average treatment duration of 35 months).

Rate of Recovery and Outcome as a Function of Vision Loss During Therapy

An interesting question to address is whether the results of therapy are dependent on the degree of BCVA loss, both in terms of responder rate and to a change in categorical BCVA outcomes, as defined by BCVA thresholds related to quality of life (17). At the start of treatment, 27.6% patients presented with a BCVA <1.0 logMAR and 19.5% were already off chart, highlighting the rapid vision loss described elsewhere (11,19,22). Visual outcomes showed some further worsening after treatment initiation, reaching a nadir.

At the final available assessment, however, visual outcomes were markedly improved compared to nadir, with more than a tripling of patients with a BCVA <1.0 logMAR from nadir (9.2%) to the LV (32.2%) and a reduction in off chart patients (44.8% 32.2%) (Fig. 3). Although a CRR can be achieved both in on chart and off chart eyes, the proportion of CRR was higher for eyes being on chart at nadir (53.9%) than for eyes being off chart at nadir (24.4%) (Table 4 and Supplemental Digital Content, Data E2, <http://links.lww.com/WNO/A408>).

Also, for responders, the magnitude of improvement can be very marked, regardless of the severity at nadir.

Impact of Leber Hereditary Optic Neuropathy Mutation on the Reported Analyses

The most frequent mitochondrial gene variant causing LHON, G11778A, is considered to correlate with the most severe prognosis, whereas the T14484C mutation is typically associated with a milder phenotype, and the G3460A mutation has an intermediate prognosis (2,10,22). The largest subgroup of patients in the EAP were G11778A. They experienced a slightly lower rate of CRS than the entire cohort, a lower rate of CRR, a smaller magnitude of recovery by the LV, and longer treatment duration to recovery. As expected, although with a small number of patients, T14484C patients had the highest rate of CRS and CRR, the largest magnitude of recovery, and the shortest treatment duration before a CRR, whereas the corresponding rates for patients with the G3460A mutation mostly fell in between the other 2 mutations (Tables 1-3).

With the obvious limitations resulting from varying observation duration and definitions of treatment response (10,15,23-27), rates of spontaneous recovery of VA have been documented in several studies and can be as low as 4% for the G11778A mutation (23-27). In the RHODOS placebo group, spontaneous recovery across all mutations

Clinical Research: Epidemiology Meets Neuro-Ophthalmology

occurred in 10.3% of patients over 6 months (15). Overall, the CRR rate observed in our data exceeds the reported rates of spontaneous recovery.

Idebenone was well tolerated, with a good safety profile, in line with results from the RHODOS trial (15). No new safety signals have been observed.

Although our analysis has the inherent limitations from the retrospective nature of the data and a lack of control group, it provides, however, an important view of long term response and tolerability of idebenone in patients within the first year of disease onset in the second eye in a real world setting.

CONCLUSIONS

Our results suggest that the overall outcome of idebenone treatment indicates a better long term prognosis than expected from limited natural history data. Although treatment response is observed despite severity of visual impairment, early treatment initiation improves the chances of response.

A treatment duration of at least 18-24 months is needed to maximize the probability of CRR because a certain degree of transient deterioration to a nadir may occur despite therapy initiation and continued treatment after an initial CRR provides further benefit. The risk balance of idebenone 900 mg/day is in line with the previously published randomized placebo controlled clinical trial.

REFERENCES

- Gueven N. Optic neurodegeneration: time to act. *Biol Med*. 2014;01.
- Fraser JA, Bioussé V, Newman NJ. The neuro ophthalmology of mitochondrial disease. *Surv Ophthalmol*. 2010;55:299-334.
- Mackey DA, Oostra RJ, Rosenberg T, Nikoskelainen E, Bronte Stewart J, Poulton J, Harding AE, Govan G, Bolhuis PA, Norby S. Primary pathogenic mtDNA mutations in multigeneration pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Hum Genet*. 1996;59:481-485.
- Carelli V, Carbonelli M, de Coo IF, Kawasaki A, Klopstock T, Lagrèze WA, La Morgia C, Newman NJ, Orsaud C, Pott JWR, Sadun AA, van Everdingen J, Vignat Clermont C, Votruba M, Yu Wai Man P, Barboni P. International consensus statement on the clinical and therapeutic management of Leber hereditary optic neuropathy. *J Neuroophthalmol*. 2017;37:371-381.
- Yu Wai Man P, Griffiths PG, Chinnery PF. Mitochondrial optic neuropathies: disease mechanisms and therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res*. 2011;30:81-114.
- Barboni P, Savini G, Valentino ML, La Morgia C, Bellusci C, De Negri AM, Sadun F, Carta A, Carbonelli M, Sadun AA, Carelli V. Leber's hereditary optic neuropathy with childhood onset. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:5303-5309.
- Newman NJ. Treatment of hereditary optic neuropathies. *Nat Rev Neurol*. 2012;8:545-556.
- Carelli V, La Morgia C, Valentino ML, Rizzo G, Carbonelli M, De Negri AM, Sadun F, Carta A, Guerriero S, Simonelli F, Sadun AA, Aggarwal D, Liguori R, Avoni P, Baruzzi A, Zeviani M, Montagna P, Barboni P. Idebenone treatment in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2011;134:e188.
- Mashima Y, Kigasawa K, Wakakura M, Oguchi Y. Do idebenone and vitamin therapy shorten the time to achieve visual recovery in Leber hereditary optic neuropathy? *J Neuroophthalmol*. 2000;20:166-170.
- Spuijdt L, Kolbach DN, de Coo RF, Plomp AS, Bauer NJ, Smeets HJ, de Die Smulders CE. Influence of mutation type on clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Ophthalmol*. 2006;141:676-682.
- Yu Wai Man P, Votruba M, Moore AT, Chinnery PF. Treatment strategies for inherited optic neuropathies: past, present and future. *Eye (Lond)*. 2014;28:521-537.
- Giorgio V, Petronilli V, Ghelli A, Carelli V, Rugolo M, Lenaz G, Bernardi P. The effects of idebenone on mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1817:363-369.
- Haefeli RH, Erb M, Gemperli AC, Robay D, Courdier Fruh I, Anklin C, Dallmann R, Gueven N. NQO1 dependent redox cycling of idebenone: effects on cellular redox potential and energy levels. *PLoS One*. 2011;6:e17963.
- Heitz FD, Erb M, Anklin C, Robay D, Pernet V, Gueven N. Idebenone protects against retinal damage and loss of vision in a mouse model of Leber's hereditary optic neuropathy. *PLoS One*. 2012;7:e45182.
- Klopstock T, Yu Wai Man P, Dimitriadis K, Rouleau J, Heck S, Baillie M, Atawan A, Chattopadhyay S, Schubert M, Garip A, Kemt M, Petraki D, Rummey C, Leinonen M, Metz G, Griffiths PG, Meier T, Chinnery PF. A randomized placebo controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2011;134:2677-2686.
- Kriestedt C, Stamper RL. Visual acuity and its measurement. *Ophthalmol Clin North Am*. 2003;16:155-170, v.
- Colenbrander A. Visual Standards: aspects and ranges of vision loss with emphasis on population surveys. 2002. In Presented 29th International Congress of Ophthalmology.
- Metz G, Coppard N, Petraki D, Meier T, Klopstock T, Sahel J. A case report survey (CRS) on the natural history of visual acuity in Leber's hereditary optic neuropathy (LHON). *Acta Ophthalmol*. 2014;92. Poster presented at: 2014 European Association for Vision and Eye Research Conference, Nice (France) September 2014.
- Newman NJ, Bioussé V, Newman SA, Bhatti MT, Hamilton SR, Farris BK, Lesser RL, Turbin RE. Progression of visual field defects in Leber hereditary optic neuropathy: experience of the LHON treatment trial. *Am J Ophthalmol*. 2006;141:1061-1067.
- Silva M, Lloria X, Catarino C, Klopstock T. Natural history findings from a large cohort of patients with Leber's hereditary optic neuropathy (LHON): new insights into the natural disease course. *Acta Ophthalmologica*. 2018;96, S261.
- Raxone®. Summary of Product Characteristics (SmPC). Amsterdam, The Netherlands: European Medicines Agency; 2015.
- Yu Wai Man P, Griffiths PG, Hudson G, Chinnery PF. Inherited mitochondrial optic neuropathies. *J Med Genet*. 2009;46:145-158.
- Johns DR, Heher KL, Miller NR, Smith KH. Leber's hereditary optic neuropathy. Clinical manifestations of the 14484 mutation. *Arch Ophthalmol*. 1993;111:495-498.
- Johns DR, Smith KH, Miller NR. Leber's hereditary optic neuropathy. Clinical manifestations of the 3460 mutation. *Arch Ophthalmol*. 1992;110:1577-1581.
- Riordan-Eva P, Sanders MD, Govan GG, Sweeney MG, Da Costa J, Harding AE. The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation. *Brain*. 1995;118:319-337.
- Stone EM, Newman NJ, Miller NR, Johns DR, Lott MT, Wallace DC. Visual recovery in patients with Leber's hereditary optic neuropathy and the 11778 mutation. *J Clin Neuroophthalmol*. 1992;12:10-14.
- Macmillan C, Kirkham T, Fu K, Allison V, Andermann E, Chitayat D, Fortier D, Gans M, Hare H, Quercia N, Zackon D, Shoubbridge EA. Pedigree analysis of French Canadian families with T14484C Leber's hereditary optic neuropathy. *Neurology*. 1998;50:417-422.

7.3. Quantitative assessment of macular and circumpapillary retinal vessel density across all stages of Leber hereditary optic neuropathy using swept source optical coherence tomography angiography

Resumen:

Objetivo: Evaluar la microvascularización retiniana macular y circumpapilar en todos los estadios de la LHON utilizando OCTA.

Métodos: Este estudio prospectivo observacional, transversal y multicéntrico analizó un total de 119 ojos de 60 pacientes con LHON confirmada molecularmente en todos los estadios de la enfermedad y 120 ojos de 60 participantes sanos (controles). Se realizaron mapas de OCTA centrados en la fovea y el disco óptico para medir las densidades vasculares en los plexos maculares capilar superficial (SCP) y profundo (DCP), y en el plexo capilar radial peripapilar (RPCP) respectivamente.

Resultados: En los ojos asintomáticos, sólo el SCP mostró cambios significativos en la media (coeficiente B = -0.72, IC 95 % = -1.34 a -0.10, P = 0.022) o en los sectores correspondientes al haz papilomacular (coeficiente B = -1.17, IC 95 % = -2.23 a -0.11, P = 0.031). Sin embargo, en los ojos en estadio crónico, la mayor magnitud de cambio se encontró en el sector temporal del RPCP (coeficiente B = -12.36, IC 95 % = -14.49 a -10.23, P < 0.001). El RPCP mostró las correlaciones más fuertes con la agudeza visual (logMAR; R = -0.677, P < 0.001) y con los parámetros estructurales (R = 0.747, P < 0.001).

Conclusiones: Los cambios en la densidad vascular retiniana en la región circumpapilar del haz papilomacular aparecen más tarde que en la mácula pero acaban siendo más profundos y se correlacionan mejor con la agudeza visual y con los parámetros estructurales. Se necesitan más estudios para evaluar la utilidad clínica de las densidades vasculares retinianas como potenciales biomarcadores de la LHON.

Quantitative assessment of macular and circumpapillary retinal vessel density across all stages of Leber hereditary optic neuropathy using swept source optical coherence tomography angiography

Lorena Castillo,¹ Clara Berrozpe-Villabona,^{2,3,4} Sergio Miserachs-García,⁵ Hanan Haulani,¹ Cecilia Gómez-Gutiérrez,¹ Rosa S. Díaz-García,¹ Alba González-Martínez,¹ Guillermo Fernández-Sanz,^{2,4} Antonio Morilla-Grasa,¹ Virginia García,¹ Luis Arias,^{6,7} José M. Caminal^{6,7} and Ricardo Casaroli-Marano⁸

¹Catalan Institute of Retina (ICR), Barcelona, Spain

²Department of Ophthalmology, University Clinic of Navarra, Madrid, Spain

³Department of Ophthalmology, University Clinic of Navarra, Pamplona, Spain

⁴Thematic Network of Cooperative Health Research in Eye Diseases (Oftared), Health Institute Carlos III, Madrid, Spain

⁵Clinical Institute of Ophthalmology (ICOF) Plató Centre, Clinic Hospital of Barcelona, Barcelona, Spain

⁶Department of Ophthalmology, Bellvitge University Hospital, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

⁷Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

⁸Department of Surgery, School of Medicine and Health Sciences, Clinic Hospital of Barcelona, University of Barcelona, Barcelona, Spain

ABSTRACT.

Purpose: To investigate the macular and circumpapillary retinal microvasculature across all stages of Leber hereditary optic neuropathy (LHON) using swept source optical coherence tomography angiography (OCTA).

Methods: This prospective, multicentre, cross-sectional, observational study analysed a total of 119 eyes of 60 patients with molecularly confirmed LHON across all stages and 120 eyes of 60 control subjects. Optical coherence tomography angiography maps centred on the fovea and optic disc were obtained to measure vessel densities (VDs) in the macular superficial (SCP) and deep (DCP) capillary plexuses, and the radial peripapillary capillary plexus (RPCP) respectively.

Results: In asymptomatic eyes, only the SCP showed significant changes on average (B coefficient = -0.72, 95% CI = -1.34 to -0.10, $p = 0.022$) or in sectors representing the papillomacular bundle (PMB) (B coefficient = -1.17, 95% CI = -2.23 to -0.11, $p = 0.031$). However, in chronic eyes, the greatest magnitude of change was found in the temporal sector of the RPCP (B coefficient = -12.36, 95% CI = -14.49 to -10.23, $p < 0.001$). The RPCP showed the strongest correlations with visual acuity (VA, logarithm of the minimum angle of resolution; $R = -0.677$, $p < 0.001$) and structural parameters ($R = 0.747$, $p < 0.001$).

Conclusions: Retinal VD changes in the circumpapillary region of the PMB appear later than in the macula but end up being more profound and correlate better with VA and structural parameters. Further studies are needed to assess the clinical utility of retinal VDs as potential LHON biomarkers.

Key words: Leber hereditary optic neuropathy, optical coherence tomography angiography, retinal plexuses, retinal vessel density, swept source

The authors are grateful to the Spanish Society for Leber Hereditary Optic Neuropathy (ASANOL) for paying patient's travel expenses and accommodation. Neither the authors nor our institutions received any payment from ASANOL.

The authors are also grateful to Daniel Cuadras (Servei d'Assessorament Metodològic i Estadístic a la Recerca, Parc Sanitari Sant Joan de Déu, Sant Boi de Llobregat, Barcelona, Spain) for conducting the statistical analysis.

Acta Ophthalmol. 2022; 100: e1646–e1656

© 2022 Acta Ophthalmologica Scandinavica Foundation. Published by John Wiley & Sons Ltd.

doi: 10.1111/aos.15169

Introduction

Leber hereditary optic neuropathy (LHON) is a rare disease primarily caused by mitochondrial DNA point mutations affecting different complex I subunits of the mitochondrial respiratory chain. The consequent disturbed flux of electrons results in impaired oxidative phosphorylation, which leads to decreased ATP synthesis and increasing levels of reactive oxygen species (Carelli et al. 2004; Yu Wai Man et al. 2011). The defining neuropathological feature is the preferential loss of retinal ganglion cells (RGC). Rather strikingly, the small calibre RGCs that constitute the papillomacular bundle (PMB) are particularly vulnerable (Yu Wai Man et al. 2016). Patients harbouring these mutations may remain asymptomatic. However, presumably precipitated by other genetic and/or environmental factors, they may suffer subacute, rapidly progressive visual loss in the form of a central scotoma. Typically, this begins in one eye, followed by similar involvement of the contralateral eye within weeks or months. As the disease advances, apoptotic RGC death results in the development of optic atrophy, and visual acuity usually deteriorates to $\leq 20/200$ bilaterally (Carelli et al. 2004; Yu Wai Man et al. 2011).

Retinal microvascular changes have long been described ophthalmoscopically in the early stages of LHON and are considered to be a hallmark of the disease (Nikoskelainen et al. 1982; Nikoskelainen et al. 1983). They consist of circumpapillary telangiectatic capillaries, mainly in the temporal side, which corresponds to the PMB (Nikoskelainen et al. 1982; Nikoskelainen et al. 1983; Sadun et al. 2004). More recently, histopathological studies of postmortem human capillaries in the optic nerve head of eyes with LHON have revealed mitochondrial proliferation affecting both the endothelial and smooth muscle components of blood vessel walls (Carelli et al. 2009). Optical coherence tomography (OCT) angiography (OCTA) is a novel technique that can produce images of blood flow with unprecedented resolution of all the vascular layers of the retina. Moreover, the technique is rapid and non-invasive (Spaide et al. 2018). To date, only a few studies have evaluated the retinal microvascular alterations in LHON

using OCTA. Single case reports and a case series have qualitatively described peripapillary changes (De Rojas et al. 2016; Gaier et al. 2016; Takayama et al. 2017; Matsuzaki et al. 2018; Kousal et al. 2019), and one study has quantitatively analysed this region in male patients (Balducci et al. 2018). However, there are conflicting results among these studies regarding findings in the asymptomatic stage of the disease. In the macular region, one study found quantitative changes in LHON chronic eyes and a case report found qualitative changes in the subacute stage (Borrelli et al. 2018; Asanad et al. 2019), posing the question whether attention should be shifted to the macula. Yu et al. (2021) described quantitative changes in the macular and peripapillary regions in the subacute and chronic stages of the disease. To the best of our knowledge, no study has quantitatively analysed the macular region with OCTA in the asymptomatic stage. Moreover, all the studies used spectral domain (SD) OCT (SD OCT). Swept source (SS) OCT (SS OCT) offers several advantages over SD OCT. The use of longer wave lengths, a faster scan speed, and lack of sensitivity roll off allow higher depth resolution and imaging of larger areas with reduced motion artefacts (Lains et al. 2021). This study aimed to quantitatively analyse retinal microvascular networks in both the macular and circumpapillary regions across all LHON stages using SS OCTA.

Materials and Methods

Study participants

This was a prospective, multicentre, cross-sectional, observational study performed at the Institut Català de Retina (ICR, Barcelona, Spain) and Clínica Universidad de Navarra (CUN, Madrid and Pamplona, Spain). The study was approved by the Institutional Review Boards of Grupo Hospitalario Quirónsalud Catalunya (Ref. ICR 1/18) and Universidad de Navarra (Ref. 2018.093) and adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki (Fortaleza, Brazil, 2013). All subjects provided informed consent prior to enrollment. For participants aged < 18 years, written informed consent from a legal guardian was also required for participation in the study.

Patients with a molecularly confirmed LHON diagnosis were recruited at the ICR and CUN between March 2018 and May 2019. The presence of retinopathy or optic neuropathy different from LHON were exclusion criteria. For each patient with LHON, an age (± 1 year) and sex matched control participant was included. Inclusion criteria for the control group were best corrected visual acuity (BCVA) $\geq 20/25$, normal intraocular pressure (IOP) and normal appearance of the optic disc and retina. Exclusion criteria for both LHON and control participants were spherical or cylindrical refractive errors greater than five or three diopters, respectively, and systemic conditions that may affect the vascular system.

All patients underwent a thorough ophthalmological evaluation, including the measurement of BCVA and IOP, slit lamp examination and ophthalmoscopy under pharmacological mydriasis, and axial length (AL) measurement (IOL Master 700, version 1.70; Carl Zeiss Meditec, Jena, Germany). BCVA was measured using a Snellen chart and converted to the logarithm of the minimum angle of resolution (logMAR) as previously described (Holladay 1997).

Eyes of patients with LHON were divided into four groups, according to the clinical stages defined by the international consensus on the clinical and therapeutic management of LHON (Carelli et al. 2017): asymptomatic (mutation carriers who had not experienced visual loss, LHON Asy); subacute (< 6 months from onset, LHON Sub); dynamic (6–12 months from onset, LHON Dyn); or chronic (> 12 months from onset, LHON Chr).

OCT assessment

All patients were imaged using an SS OCT system (DRI OCT Triton; Topcon Corporation, Tokyo, Japan), which operates at a wavelength of 1050 nm and has a scan speed of 100 000 A scans per second. Images were acquired after pupillary dilation and analysed with the IMAGEnet 6 software, version 1.22 (Topcon Corporation, Tokyo, Japan). Although no immediate effect of smoking on retinal vessel density has been shown in healthy individuals (Ayhan et al. 2017; Ciesielski et al. 2019; Holló 2019), it is not known whether it can trigger changes in eyes with

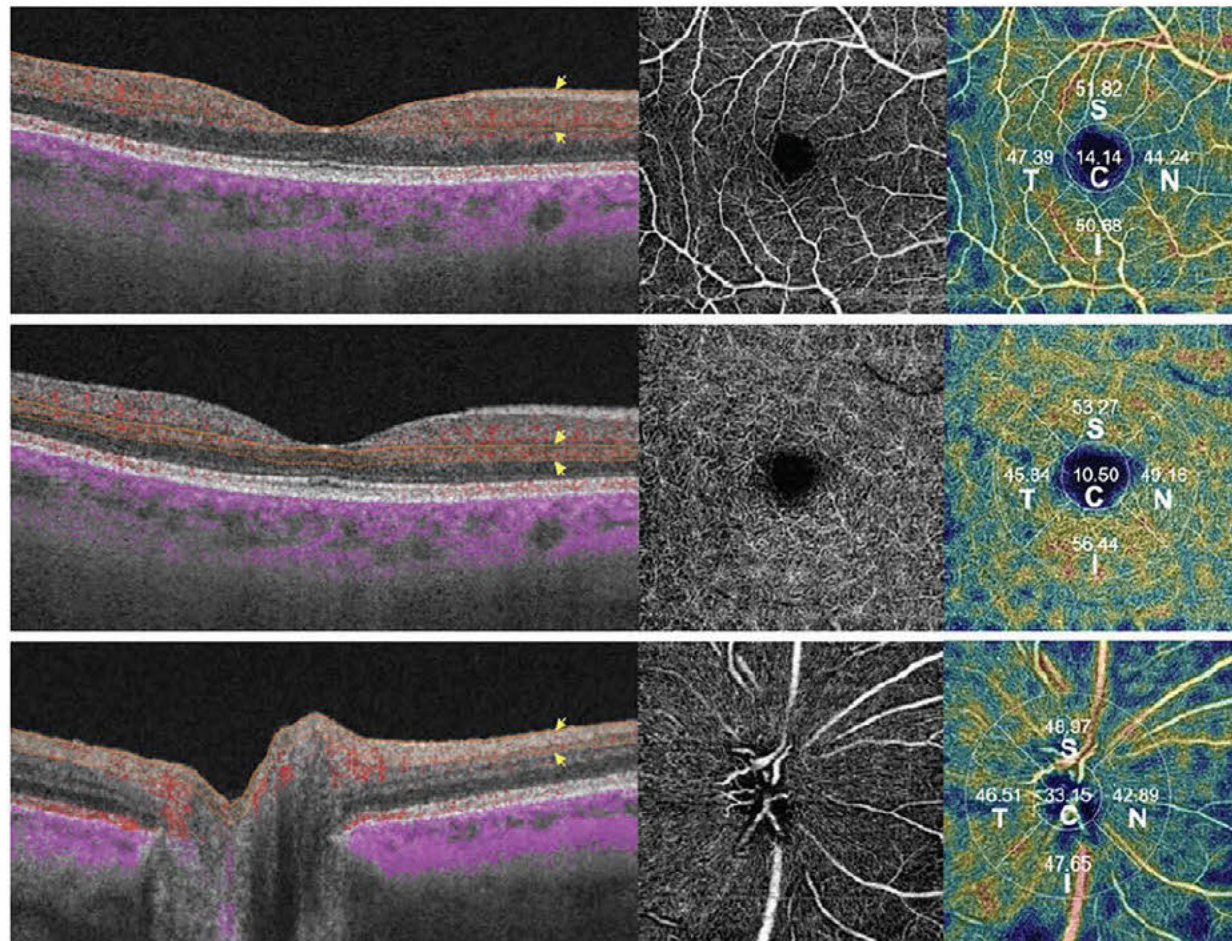


Fig. 1. B-scan, en face and density map visualization of optical coherence tomography angiography showing the different retinal plexuses. Yellow arrows point to the segmentation lines. (Top) Macular superficial capillary plexus: from 2.6 μ m below the internal limiting membrane (ILM) to 15.6 μ m below the interface between the inner plexiform layer and the inner nuclear layer (IPL/INL). (Middle) Macular deep capillary plexus: from 15.6 μ m below the IPL/INL to 70.2 μ m below the IPL/INL. (Bottom) Disc and circumpapillary radial peripapillary capillary plexus: from the ILM to 70.2 μ m below the ILM. The density maps (third column) show the percentage area occupied by vessels in the different sectors: central (C), superior (S), nasal (N), inferior (I) and temporal (T).

pathology, so no participant had smoked within the previous hour. All examinations were obtained in the morning to avoid potential diurnal changes in vessel density (VD; Yanik Odabas et al. 2018; Baek et al. 2019; Wang et al. 2020).

OCT retinal plexuses metrics

Optical coherence tomography angiography (DRI OCT Triton) signals were obtained by detecting motion between four repeated B scans of the same location. In this study, we obtained three dimensional 4.5 \times 4.5 mm maps, centred on the fovea and optic disc. Each map consisted of 320 B scans. We used active eye tracking to reduce motion artefact. Only images with a quality \geq 50 and with no artefacts were

included. Optical coherence tomography scans satisfied consensus criteria for retina OCT quality assessment (OSCAR IB; Tewarie et al. 2012). In the macula, we studied the superficial capillary plexus (SCP) and the deep capillary plexus (DCP) using the automatic segmentation built in software. The boundaries were defined as follows: (a) for the SCP, from 2.6 below the internal limiting membrane (ILM) to 15.6 μ m below the interface between the inner plexiform layer and the inner nuclear layer (IPL/INL); and (b) for the DCP, from 15.6 μ m below the IPL/INL to 70.2 μ m below the IPL/INL. In the optic disc and circumpapillary region, we studied the radial peripapillary capillary plexus (RPCP). We set the inner boundary of the RPCP at the ILM, which was not always accurately

segmented automatically in the central area of the optic disc. Therefore, three uniformly trained masked graders (L.C., C.B.V. and S.M.) carefully reviewed each of the 320 B scans of each map and manually corrected the ILM segmentation line whenever necessary. We then used the built in software to obtain the outer boundary of the RPCP, setting it 70.2 μ m below the ILM. We studied the VD, defined as the percentage area occupied by vessels in the segmented region, employing a grid that contained the two inner circles (diameters, 1 and 3 mm) of the early treatment retinopathy study (ETDRS) grid. The built in software automatically provides density maps, which show the VD in each of the five regions in which the grid is divided (central, superior, nasal, inferior and

temporal). Figure 1 shows the B scans with segmentation lines, en face images and density maps in the different retinal plexuses. For the OCTA map centred on the optic disc, we calculated the average of the whole region (the five sectors included in the grid) and the average in the circumpapillary region (i.e. excluding the central sector).

OCT structural metrics

We performed the 3D macula V and 3D disc scan patterns, which give a three dimensional 7.0 \times 7.0 mm map centred on the fovea and optic disc respectively. In the macula, we measured the thickness of the ganglion cell layer plus inner plexiform layer (GCL+) and the ganglion cell complex (GCL++). The structures were defined as follows: a) the GCL+ extends from the interface between the retinal nerve fibre layer and the ganglion cell layer (RNFL/GCL) to the IPL/INL and b) the GCL++ extends from the ILM to the IPL/INL. Macular GCL+ and GCL++ thicknesses were measured using the ETDRS grid, which consists of three concentric circles with diameters of 1, 3 and 6 mm, and is divided into nine sectors (central, superior

inner, superior outer, nasal inner, nasal outer, inferior inner, inferior outer, temporal inner and temporal outer). In the peripapillary region, the retinal nerve fibre layer (RNFL) thickness, extending from the ILM to the RNFL/GCL, was measured with a grid consisting of a 3.4 mm diameter circle divided into four quadrants and 12 clock hour sectors.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using IBM SPSS software, version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). The Kolmogorov Smirnov test was applied for all data samples to check normality. We calculated the mean and standard deviations of all quantitative variables. Continuous clinical variables were compared by one way analysis of variance with the Scheffé *post hoc* test. Continuous OCT variables were compared by one way analysis of covariance, selecting the control as the reference group and introducing sex, age and AL as covariates. Categorical variables were compared using the chi square test. We used the Pearson correlation test to evaluate associations between BCVA and OCT parameters (average and sectors representing the

PMB: nasal and temporal in the macular and optic disc regions respectively) and between the VD and structural parameters (average and between corresponding sectors evaluating the same region) in patients with LHON. For all tests, $p < 0.05$ was considered statistically significant. Graphs were created using R, version 3.5.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Results

We analysed 119 and 120 eyes of 60 patients with LHON and 60 control subjects respectively. Six patients with LHON had both eyes at different stages: one patient had one eye in LHON Asy and the contralateral eye in LHON Sub, four patients had one eye in LHON Sub and the contralateral eye in LHON Dyn, and one patient had one eye in LHON Dyn and the contralateral eye in LHON Chr. The remaining 54 patients had both eyes at the same LHON stage. The distribution of eyes of patients with LHON among groups was as follows: LHON Asy, 65 eyes of 33 patients; LHON Sub, five eyes of five patients; LHON Dyn, nine eyes of seven patients; and LHON Chr, 40

Table 1. Demographic and clinical data of study participants.

	Controls	LHON-Asy	LHON-Sub	LHON-Dyn	LHON-Chr	p-value
Eyes, number	120	65	5	9	40	
Sex						<0.001 [†]
Female, number (%)	64 (53.33%)	51 (78.46%)	3 (60.00%)	3 (33.33%)	7 (17.50%)	
Male, number (%)	56 (46.67%)	14 (21.54%)	2 (40.00%)	6 (66.67%)	33 (82.50%)	
Age (years)	35.85 \pm 18.65	37.20 \pm 20.42	32.60 \pm 15.31	28.67 \pm 15.01	35.20 \pm 16.24	0.76**
Mutation, number of eyes (%), Allele/Locus						
m.11778G > A/MT-ND4		50 (76.92%) [‡]	1 (20.00%)	1 (11.11%)	20 (50.00%) [§]	
m.14484T > C/MT-ND6		4 (6.15%) [‡]	1 (20.00%)	3 (33.33%)	4 (10.00%) [§]	
m.3460G > A/MT-ND1		13 (20.00%)	2 (40.00%)	1 (11.11%)	17 (42.50%)	
m.14495A > G/MT-ND6		0 (0.00%)	1 (20.00%)	3 (33.33%)	0 (0.00%)	
m.3734A > G/MT-ND1		0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (11.11%)	1 (2.50%)	
Tobacco, number of eyes of smokers (%) [*]	20 (16.67%)	10 (15.38%)	1 (20.00%)	2 (22.22%)	12 (30.00%)	0.38 [†]
Alcohol, number of eyes of consumers (%) [†]	14 (11.67%)	6 (9.23%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0.15 [†]
Disease duration (months)			3.80 \pm 0.84	8.22 \pm 2.11	186.93 \pm 194.93	
BCVA (logMAR)	0.01 \pm 0.03	0.00 \pm 0.04	2.27 \pm 0.68	1.65 \pm 0.87	1.38 \pm 1.10	<0.001**
Axial length (mm)	23.61 \pm 0.99	23.57 \pm 0.99	24.07 \pm 0.49	24.15 \pm 1.23	23.71 \pm 1.01	0.42**

Asy asymptomatic stage, BCVA best corrected visual acuity, Chr chronic stage, Dyn dynamic stage, LHON Leber hereditary optic neuropathy, logMAR logarithm of the minimum angle of resolution, Sub subacute stage.

Values of numerical variables are shown as the mean \pm standard deviation.

* Smokers were defined as consumers of any tobacco product.

[†] Alcohol consumers were defined as drinkers of alcoholic beverages at any rate other than occasional.

[‡] Two eyes in the asymptomatic stage had mutations 11778 and 14484.

[§] Two eyes in the chronic stage had mutations 11778 and 14484.

^{††} Chi-square test.

** One way analysis of variance.

eyes of 21 patients. Table 1 summarizes the demographic and clinical data of our cohort. It is worth noting that AL did not differ significantly among groups (p = 0.42).

Vessel density in retinal plexuses

We found significant changes in the SCP, DCP and RPCP, with a trend towards lower values as the disease progressed (Table 2 and Fig. 2). Table 3 and Fig. 3 show the magnitude of change in VD with respect to controls in sectors representing the PMB and on average. In LHON Asy, changes in average values or in sectors representing the PMB were significant only in the macular SCP (nasal sector: B coefficient = 1.17, 95% confidence interval (CI) = 2.23 to 0.11, p = 0.031; average: B coefficient = 0.72, 95% CI = 1.34 to 0.10, p = 0.022). However, in LHON Chr, the temporal sector of the RPCP (B coefficient = 12.36, 95% CI = 14.49 to 10.23, p < 0.001) was more severely affected than the nasal sector of the macular plexuses (SCP: B coefficient = 3.79, 95% CI = 5.13 to 2.46, p < 0.001; DCP: B

coefficient = 3.33, 95% CI = 4.77 to 1.89, p < 0.001).

Structural metrics

Results are summarized in Table 4. Macular GCL+ thickness was significantly reduced in all sectors and the average of all LHON groups, except for the central and inferior inner sectors of LHON Asy. Macular GCL++ thickness was significantly reduced in all sectors and the average of all LHON groups, except for the central sector of LHON Asy. Peripapillary RNFL in sectors involving the PMB (temporal quadrant and clock hour 9 right eye/3 left eye) and on average was slightly increased, although not significantly, in LHON Asy. In the three symptomatic groups, it was decreased, reaching statistical significance in all sectors and the average of LHON Chr. Figure 4 shows the percentage of change in anatomic metrics of patients with LHON as the disease progresses.

Correlation between BCVA and OCT parameters in patients with LHON

We found significant negative correlations between BCVA logMAR and all OCT parameters (VDs and structural metrics), except for the DCP. Regarding the retinal plexuses, the strongest correlations between BCVA logMAR and VD were found in the RPCP. In sectors representing the PMB, only the RPCP was significantly correlated with BCVA (Pearson coefficient = 0.558, p < 0.001; Table 5).

Correlation between retinal plexuses and related structural metrics in patients with LHON

We found significant positive correlations in all variables studied. SCP correlated more strongly with the GCL++ than with the GCL+. The strongest correlations were found between the RPCP and the RNFL, particularly in the temporal sector (Pearson coefficient = 0.747, p < 0.001; Table 6).

Table 2. Vessel density in retinal plexuses.

	Controls		LHON-Asy		LHON-Sub		LHON-Dyn		LHON-Chr	
	Mean ± SD		Mean ± SD	p-value	Mean ± SD	p-value	Mean ± SD	p-value	Mean ± SD	p-value
Macular SCP (%)										
Average	44.80 ± 1.75		43.86 ± 2.29	0.022	42.50 ± 2.41	0.007	41.49 ± 1.71	<0.001	39.05 ± 2.69	<0.001
Central	15.79 ± 4.59		16.17 ± 4.13	0.394	14.39 ± 2.52	0.292	20.03 ± 9.50	0.039	17.97 ± 5.48	0.094
Superior	50.60 ± 3.10		49.99 ± 3.17	0.482	48.03 ± 2.10	0.059	45.06 ± 3.22	<0.001	41.55 ± 3.11	<0.001
Nasal	45.59 ± 3.11		43.99 ± 3.76	0.031	43.06 ± 3.74	0.111	43.13 ± 2.30	0.015	42.30 ± 3.91	<0.001
Inferior	49.57 ± 3.52		48.64 ± 3.81	0.267	47.03 ± 2.70	0.119	44.68 ± 2.96	0.001	40.72 ± 7.86	<0.001
Temporal	47.96 ± 2.31		46.89 ± 3.45	0.058	45.95 ± 5.94	0.126	44.87 ± 3.73	0.002	42.74 ± 3.93	<0.001
Macular DCP (%)										
Average	46.55 ± 2.57		45.44 ± 3.02	0.094	45.56 ± 2.45	0.368	45.09 ± 1.52	0.021	44.72 ± 2.77	0.001
Central	13.62 ± 5.62		11.02 ± 3.53	0.006	8.97 ± 0.76	0.016	9.35 ± 3.55	0.001	12.42 ± 6.32	0.036
Superior	52.72 ± 4.03		51.43 ± 4.40	0.141	53.13 ± 0.68	0.854	51.84 ± 3.36	0.246	50.38 ± 4.57	0.001
Nasal	50.33 ± 3.31		49.64 ± 4.11	0.488	47.39 ± 5.21	0.053	47.81 ± 4.18	0.012	47.45 ± 3.85	<0.001
Inferior	51.47 ± 4.96		52.51 ± 4.60	0.382	51.54 ± 3.53	0.630	50.58 ± 2.90	0.428	50.78 ± 4.28	0.506
Temporal	48.59 ± 3.01		46.68 ± 4.64	0.004	48.26 ± 4.36	0.639	46.62 ± 3.74	0.063	46.63 ± 4.88	0.005
Disc/circumpapillary RPCP (%)										
Average	47.28 ± 2.14		46.74 ± 1.73	0.100	42.62 ± 4.63	<0.001	43.21 ± 3.80	<0.001	41.60 ± 2.55	<0.001
Average without central sector	47.41 ± 2.95		47.29 ± 2.36	0.668	43.21 ± 4.15	0.001	43.97 ± 3.88	<0.001	41.07 ± 3.00	<0.001
Central	46.17 ± 9.91		42.58 ± 7.72	0.032	37.86 ± 8.83	0.060	37.14 ± 4.65	0.005	45.46 ± 12.56	0.547
Superior	49.04 ± 3.80		48.86 ± 3.15	0.786	44.03 ± 4.82	0.002	45.97 ± 4.64	0.009	45.04 ± 3.94	<0.001
Nasal	45.00 ± 3.76		46.08 ± 2.87	0.207	45.30 ± 5.50	0.921	44.01 ± 4.96	0.527	40.54 ± 6.68	<0.001
Inferior	48.47 ± 3.87		47.53 ± 3.36	0.077	43.80 ± 4.87	0.007	46.79 ± 5.82	0.217	43.86 ± 3.81	<0.001
Temporal	47.06 ± 5.72		46.65 ± 4.34	0.670	39.71 ± 4.74	0.001	39.11 ± 4.09	<0.001	34.87 ± 4.98	<0.001

Asy asymptomatic stage, Chr chronic stage, DCP deep capillary plexus, Dyn dynamic stage, LHON Leber hereditary optic neuropathy, RNFL retinal nerve fibre layer, RPCP radial peripapillary capillary plexus, SCP superficial capillary plexus, Sub subacute stage. Values were compared by one-way analysis of covariance with sex, age and axial length as covariates.

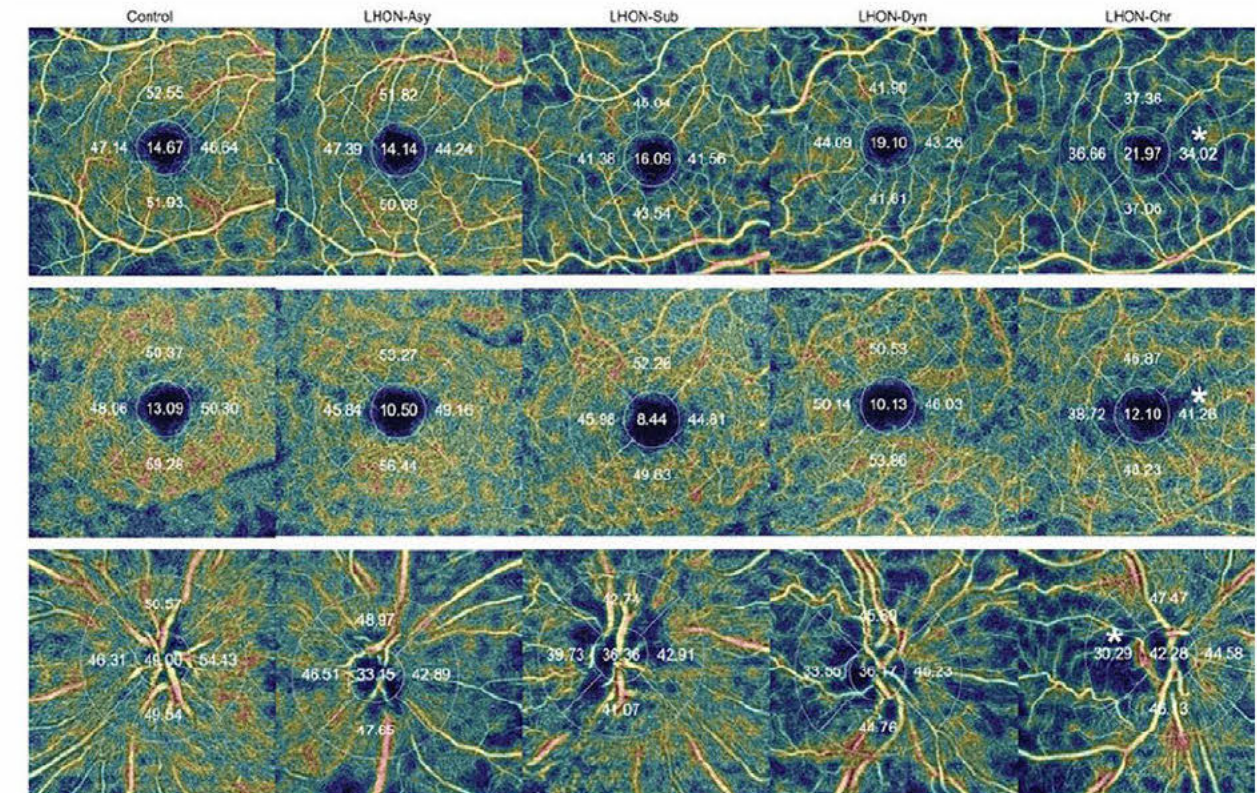


Fig. 2. Example of vessel density (VD) maps (analysed by swept source optical coherence tomography angiography) in the different groups. Asy asymptomatic stage, Chr chronic stage; Dyn dynamic stage, LHON Leber hereditary optic neuropathy, Sub subacute stage. (Top) Macular superficial capillary plexus. (Middle) Macular deep capillary plexus. (Bottom) Disc and circumpapillary radial peripapillary capillary plexus. There is a general reduction in VD as the disease progresses. In sectors representing the papillomacular bundle, the reduction ends up being more profound in the circumpapillary region than in the macula (asterisks).

Table 3. Magnitude of change in vessel density with respect to controls across the different Leber hereditary optic neuropathy stages.

	LHON Asy		LHON Sub		LHON Dyn		LHON-Chr	
	B coefficient (95% CI)	p value	B coefficient (95% CI)	p-value	B coefficient (95% CI)	p-value	B coefficient (95% CI)	p-value
Macular SCP (%)								
Average	0.72 (1.34 to 0.10)	0.022	2.49 (4.27 to 0.70)	0.007	3.79 (5.15 to 2.43)	<0.001	6.04 (6.78 to 5.30)	<0.001
Nasal	1.17 (2.23 to 0.11)	0.031	2.72 (6.07 to 0.63)	0.111	3.03 (5.46 to 0.61)	0.015	3.79 (5.13 to 2.46)	<0.001
Macular DCP (%)								
Average	0.85 (1.85 to 0.15)	0.094	1.32 (4.21 to 1.56)	0.368	2.04 (3.78 to 0.31)	0.021	2.14 (3.34 to 0.94)	0.001
Nasal	0.40 (1.54 to 0.74)	0.488	3.56 (7.17 to 0.05)	0.053	3.36 (5.97 to 0.75)	0.012	3.33 (4.77 to 1.89)	<0.001
Disc/circumpapillary RPCP (%)								
Average	0.58 (1.28 to 0.11)	0.100	4.81 (6.82 to 2.80)	<0.001	4.23 (5.76 to 2.70)	<0.001	5.58 (6.42 to 4.75)	<0.001
Average without central	0.20 (1.09 to 0.70)	0.668	4.39 (6.98 to 1.80)	0.001	3.61 (5.58 to 1.64)	<0.001	6.23 (7.30 to 5.15)	<0.001
Temporal	0.37 (2.06 to 1.33)	0.670	7.70 (12.39 to 3.01)	0.001	8.41 (11.98 to 4.83)	<0.001	12.36 (14.49 to 10.23)	<0.001

Asy asymptomatic stage, Chr chronic stage, CI confidence interval, DCP deep capillary plexus, Dyn dynamic stage, LHON Leber hereditary optic neuropathy, RPCP radial peripapillary capillary plexus, SCP superficial capillary plexus, Sub subacute stage. Values were compared by one-way analysis of covariance with sex, age and axial length as covariates.

Discussion

This study reveals significant retinal microvascular changes across all stages

of LHON. There was a general reduction in VD as the disease progressed, but with different patterns in the macular and the circumpapillary regions. Significant

changes in average VD were first detected in the macula, with the SCP being the only plexus significantly reduced on average in the asymptomatic stage of the disease. In

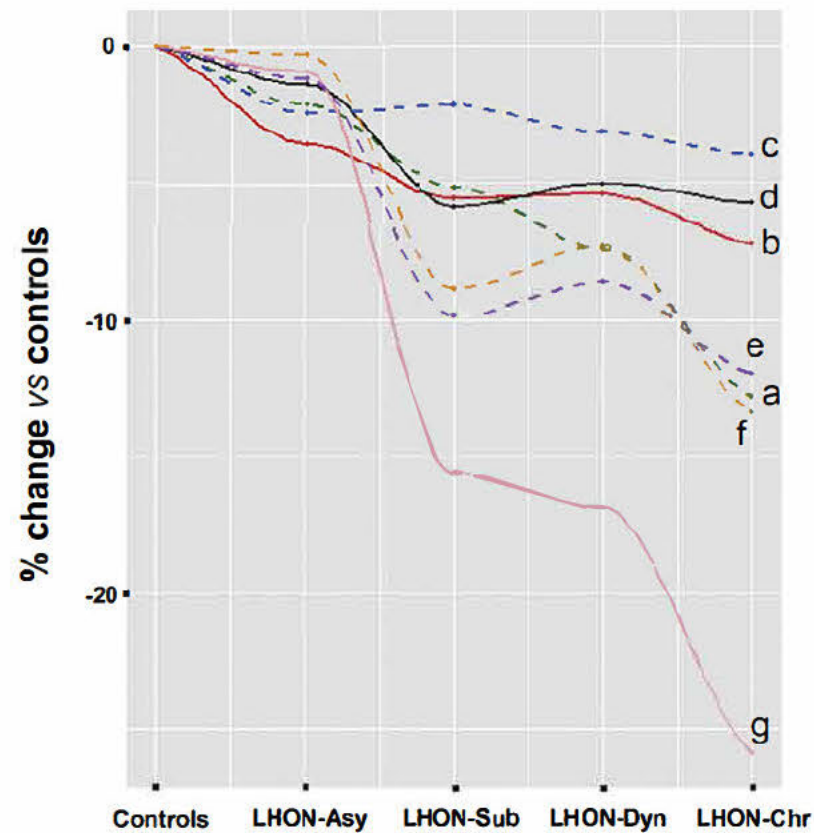


Fig. 3. Percentage of change in vessel density with respect to controls across the different Leber hereditary optic neuropathy stages. Asy asymptomatic stage, Chr chronic stage, Dyn dynamic stage, LHON Leber hereditary optic neuropathy, Sub subacute stage. Dotted lines indicate average values and solid lines indicate sectors representing the papillomacular bundle. Macular superficial capillary plexus (SCP), (a) average and (b) nasal sector. Macular deep capillary plexus, (c) average and (d) nasal sector. Disc/circumpapillary radial peripapillary capillary plexus (RPCP), (e) average, (f) average without central sector (that is, average of the circumpapillary region) and (g) temporal sector. The nasal sector of the SCP (b) is affected earlier, but the temporal sector of the RPCP (g) ends up being more profoundly affected.

sectors representing the PMB (that is, nasal in the macula and temporal circum papillary), the region preferentially affected in LHON, changes were also first detected in the macular SCP. However, as the disease became symptomatic and progressed, the temporal sector of the RPCP showed the greatest magnitude of change. Consequently, in the chronic stage, it ended up being more severely affected than the nasal sectors of the macular plexuses. We also found that VD in the SCP and, more strongly, the RPCP correlates with BCVA. All studied structural parameters (macular GCL+, macular GCL++ and peripapillary RNFL) were also associated with BCVA; however, we failed to find an association between the DCP and BCVA. In the correlation analysis between retinal plexuses and their related structures, we found significant positive associations in all tested variables. Nonetheless, the strongest correlations occurred between the RPCP and RNFL,

particularly in the temporal sector. Of note, the macular SCP correlated better with the GCL++ than with the GCL+. This is in consonance with the fact that the SCP slab is anatomically more closely related with the former, as both the GCL++ and SCP contain the RNFL, whereas the GCL+ does not.

Ophthalmoscopically visible retinal microvascular alterations in the early stages of LHON have long been described (Nikoskelainen et al. 1982; Nikoskelainen et al. 1983). They consist of circumpapillary telangiectatic capillaries, mainly in the temporal side, which corresponds to the PMB (Nikoskelainen et al. 1982; Nikoskelainen et al. 1983; Sadun et al. 2004). Interestingly, mitochondrial proliferation in both the endothelial cell and smooth muscle of blood vessel walls has been found in the optic nerve head of postmortem LHON eyes (Carelli et al. 2009). Since the introduction of

OCTA in clinical practice, only a few studies have described retinal microvascular changes in LHON using this technology. Regarding the circum papillary region, conflicting results appear in the literature regarding the asymptomatic stage of the disease. While some single case reports described qualitative changes in asymptomatic eyes (Gaier et al. 2016; Takayama et al. 2017), another single case report and a case series consisting of 12 eyes of six patients, could find no changes at the asymptomatic stage (Matsuzaki et al. 2018; Kousal et al. 2019). One cross sectional study quantitatively evaluated the peripapillary region of 22 male patients with LHON at different stages (none in the dynamic stage) and found no significant changes in VD between asymptomatic LHON eyes and controls (Balducci et al. 2018). However, there was a progressive reduction in VD in

Table 4. Structural metrics in study participants.

	Controls Mean ± SD	LHON-Asy		LHON-Sub		LHON-Dyn		LHON-Chr	
		Mean ± SD	p-value	Mean ± SD	p-value	Mean ± SD	p-value	Mean ± SD	p-value
Macular GCL+ (µm)									
Average	72.30 ± 4.98	68.15 ± 5.53	<0.001	48.57 ± 3.11	<0.001	49.82 ± 3.19	<0.001	50.61 ± 5.42	<0.001
Central	47.35 ± 9.30	45.34 ± 6.71	0.331	32.80 ± 14.34	<0.001	27.33 ± 2.87	<0.001	29.70 ± 5.13	<0.001
Superior inner	95.51 ± 6.11	89.43 ± 6.70	<0.001	56.00 ± 5.70	<0.001	52.89 ± 3.66	<0.001	52.80 ± 9.38	<0.001
Superior outer	65.18 ± 5.45	61.58 ± 6.28	<0.001	45.60 ± 4.98	<0.001	47.56 ± 4.45	<0.001	51.73 ± 7.66	<0.001
Nasal inner	93.77 ± 7.21	86.35 ± 6.41	<0.001	48.20 ± 3.49	<0.001	47.33 ± 5.17	<0.001	50.45 ± 6.85	<0.001
Nasal outer	70.93 ± 6.57	67.65 ± 6.76	0.001	45.80 ± 2.05	<0.001	49.50 ± 3.89	<0.001	51.14 ± 7.30	<0.001
Inferior inner	94.78 ± 6.42	88.71 ± 6.29	<0.001	53.60 ± 5.08	<0.001	53.33 ± 4.44	<0.001	53.54 ± 7.22	<0.001
Inferior outer	62.68 ± 7.44	60.52 ± 5.85	0.057	49.60 ± 4.04	<0.001	47.44 ± 6.37	<0.001	51.37 ± 6.37	<0.001
Temporal inner	89.35 ± 6.71	81.28 ± 6.21	<0.001	52.80 ± 6.38	<0.001	52.11 ± 4.43	<0.001	51.08 ± 7.44	<0.001
Temporal outer	69.16 ± 5.38	64.55 ± 6.58	<0.001	50.80 ± 3.83	<0.001	54.44 ± 3.81	<0.001	54.08 ± 5.02	<0.001
Macular GCL++ (µm)									
Average	108.76 ± 6.83	103.57 ± 7.74	<0.001	71.13 ± 13.54	<0.001	66.63 ± 9.07	<0.001	59.68 ± 5.64	<0.001
Central	51.33 ± 11.31	49.52 ± 8.55	0.527	34.00 ± 14.28	<0.001	28.00 ± 3.20	<0.001	31.55 ± 4.91	<0.001
Superior inner	124.00 ± 7.43	116.94 ± 8.16	<0.001	74.00 ± 12.59	<0.001	65.44 ± 7.94	<0.001	60.80 ± 4.77	<0.001
Superior outer	107.08 ± 8.23	102.46 ± 9.72	<0.001	76.00 ± 13.87	<0.001	68.00 ± 9.47	<0.001	62.46 ± 5.31	<0.001
Nasal inner	118.97 ± 8.85	110.77 ± 7.59	<0.001	61.40 ± 5.59	<0.001	61.11 ± 6.97	<0.001	58.53 ± 4.52	<0.001
Nasal outer	124.13 ± 11.49	119.15 ± 9.56	<0.001	73.60 ± 16.89	<0.001	71.25 ± 11.15	<0.001	63.17 ± 4.72	<0.001
Inferior inner	124.00 ± 8.33	117.38 ± 7.76	<0.001	67.60 ± 12.14	<0.001	65.67 ± 8.97	<0.001	60.64 ± 4.43	<0.001
Inferior outer	106.37 ± 7.67	102.60 ± 9.18	<0.001	78.00 ± 20.82	<0.001	71.22 ± 11.28	<0.001	62.43 ± 5.92	<0.001
Temporal inner	112.02 ± 7.31	103.54 ± 6.92	<0.001	66.80 ± 13.66	<0.001	60.44 ± 9.29	<0.001	56.31 ± 5.97	<0.001
Temporal outer	92.93 ± 6.36	87.91 ± 7.92	<0.001	66.80 ± 10.64	<0.001	64.11 ± 9.60	<0.001	60.55 ± 6.05	<0.001
Peripapillary RNFL (µm)									
Average	107.97 ± 10.01	109.34 ± 11.16	0.708	92.07 ± 22.33	0.004	83.85 ± 15.41	<0.001	53.45 ± 16.36	<0.001
Superior quadrant	132.02 ± 16.00	130.98 ± 19.63	0.507	120.20 ± 41.56	0.221	109.11 ± 27.28	0.002	70.35 ± 25.73	<0.001
Nasal quadrant	85.64 ± 12.47	84.42 ± 15.49	0.986	76.20 ± 11.65	0.208	73.11 ± 15.03	0.009	48.83 ± 16.44	<0.001
Inferior quadrant	139.67 ± 17.27	144.57 ± 16.27	0.256	121.40 ± 33.52	0.033	116.00 ± 24.49	0.001	67.58 ± 24.93	<0.001
Temporal quadrant	74.16 ± 9.65	77.26 ± 11.01	0.295	50.60 ± 14.03	<0.001	37.22 ± 11.05	<0.001	27.05 ± 11.59	<0.001
Temporal clock-hour*	61.57 ± 8.52	65.46 ± 11.67	0.056	41.00 ± 7.48	<0.001	33.00 ± 14.65	<0.001	25.98 ± 15.71	<0.001

Asy asymptomatic stage, Chr chronic stage, Dyn dynamic stage, GCL+ ganglion cell layer plus inner plexiform layer thickness, GCL++ ganglion cell complex thickness, LHON Leber hereditary optic neuropathy, RNFL retinal nerve fibre layer thickness, Sub subacute stage.

Values were compared by one-way analysis of covariance with sex, age and axial length as covariates.

* Clock-hour 9 if right eye/3 if left eye.

the symptomatic stages. Our study confirms this and adds the different pattern found in the macular region. As for the macula, the literature is even scarcer. One cross sectional study evaluated this region in 29 eyes of 15 patients with LHON, all in the chronic stage (Borrelli et al. 2018). The study found reduced VD in the SCP and DCP, which our study corroborates, adding the findings of the other stages of the disease. Our study also confirms that the SCP, but not the DCP, is associated with BCVA (Borrelli et al. 2018). Because we also studied the circumpapillary region, our study advances the field by demonstrating that the strongest associations between BCVA and plexuses occur in the RPCP. Furthermore, we add that VD in the SCP correlates better with the GCL++ than it does with the GCL+.

This could be explained by the aforementioned closer anatomical relationship between the SCP slab and the GCL++. In contrast with our results, Borrelli et al. (2018) did not find associations between BCVA and structural parameters. A possible explanation could be that they analysed only eyes in the chronic stages. The eyes had presumably reached the 'floor effect' in both GCL++ and RNFL thicknesses as measured by OCT. Borrelli et al. (2018) found significant associations between SCP VD and GCL++ thickness restricted only to the nasal and inferior sectors. Our results exhibited significant differences in the four parafoveal sectors and on average, which could be explained by our larger sample size and the inclusion of all LHON stages. A single case report described qualitative changes in two

eyes of a patient with subacute LHON (Asanad et al. 2019). This poses the question whether attention should be shifted to the macula. One study investigated VD in the macular and peripapillary regions in the symptomatic stages of patients with hereditary optic neuropathies using SD OCTA (Shemet et al. 2020). They found progressive reduction in SCP and the temporal sectors of RPCP. In general, they found medium and strong correlations between RPCP and RNFL, except for the temporal sectors, but no correlations between VD and structural parameters in the macula, which is in disagreement with our findings. This could be explained by differences in the design of the study: they included patients with either LHON or autosomal recessive optic neuropathy and no eye was in the asymptomatic

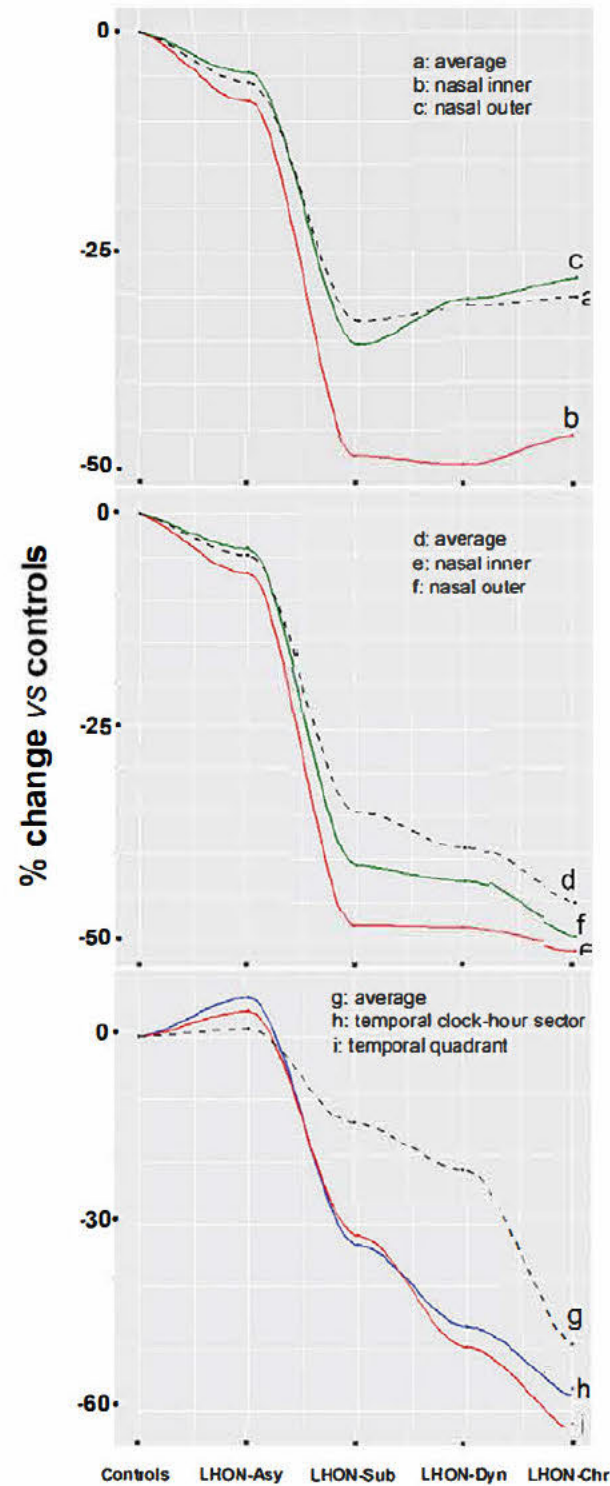


Fig. 4. Percentage of change in structural parameters with respect to controls across the different Leber hereditary optic neuropathy stages. Asy asymptomatic stage, Chr chronic stage, Dyn dynamic stage, LHON Leber hereditary optic neuropathy, Sub subacute stage. Dotted lines indicate average values and solid lines indicate sectors representing the papillomacular bundle. (Top) Macular ganglion cell layer plus inner plexiform layer thickness, (a) average, (b) nasal inner sector and (c) nasal outer sector. (Middle) Macular ganglion cell complex thickness, (d) average, (e) nasal inner sector and (f) nasal outer. (Bottom) Peripapillary retinal nerve fibre layer thickness, (g) average, (h) temporal clock-hour sector (9 clock-hour if right eye/3 if left eye) and (i) temporal quadrant.

stage. None of the previous studies that evaluated retinal microvascular changes in LHON using OCTA simultaneously analysed the macular and circumpapillary regions across all stages.

To the best of our knowledge, the current study provides the first quantitative assessment of the retinal microvascular networks in both the macular and peripapillary regions across all LHON stages. Furthermore, it is also the first one to have considered the potential influence of acute smoking or diurnal changes on quantitative OCTA metrics in LHON, and to have used SS OCTA. This has allowed us to identify different patterns in both regions and infer the chronology in which the changes occur and the magnitude they reach.

This study found that the retinal microvascular changes in LHON appear earlier in the macula than in the circumpapillary region. However, in sectors representing the papillomacular bundle, the latter ended up being more profoundly affected. We can only speculate on the explanation for these findings. The fact that structural damage is detected earlier in the macular GCL+ than in the peripapillary RNFL, was described in previous studies and corroborated in our study (Akiyama et al. 2013; Balducci et al. 2016; Balducci et al. 2018). This suggests that the GCL+ loss and the reduced SCP VD in the macular region may be pathophysiologically related. Whether blood flow is primarily reduced as a direct effect of mitochondrial dysfunction or as a consequence of neuronal damage has not been elucidated. The results of some studies argue in favour of the former (Carelli et al. 2009; Chiong et al. 2014). We hypothesize that, once the disease becomes symptomatic and progresses, there is an accumulation of defective mitochondria in the axons of the retinal ganglion cells. The defective mitochondria increase in number as a compensatory effect in response to dysfunction. This occurs in a region anatomically limited by the biomechanical properties of the lamina cribrosa. Consequently, there is a cascade of catastrophic effects, particularly in the small axons of the PMB. This could explain the fact that the temporal sector of the circumpapillary region ends up showing the greatest reduction in VD.

Table 5. Correlation analysis between best corrected visual acuity (logarithm of the minimum angle of resolution) and optical coherence tomography parameters in patients with Leber hereditary optic neuropathy.

	Pearson coefficient	p-value
Retinal plexuses (vessel densities)		
Macular SCP, average	0.360	<0.001
Macular SCP, nasal	0.124	0.214
Macular DCP, average	0.057	0.546
Macular DCP, nasal	0.138	0.166
Disc/circumpapillary RPCP, average	0.677	<0.001
Disc/circumpapillary RPCP, average without central	0.658	<0.001
Disc/circumpapillary RPCP, temporal	0.558	<0.001
Structural metrics (thicknesses)		
Macular GCL+, average	0.644	<0.001
Macular GCL+, nasal inner	0.679	<0.001
Macular GCL+, nasal outer	0.500	<0.001
Macular GCL++, nasal average	0.738	<0.001
Macular GCL++, nasal inner	0.739	<0.001
Macular GCL++, nasal outer	0.715	<0.001
Peripapillary RNFL, average	0.673	<0.001
Peripapillary RNFL, temporal quadrant	0.645	<0.001
Peripapillary RNFL, temporal clock-hour sector*	0.607	<0.001

DCP deep capillary plexus, GCL+ ganglion cell layer plus inner plexiform layer, GCL++ ganglion cell complex, RNFL retinal nerve fibre layer, RPCP radial peripapillary capillary plexus, SCP superficial capillary plexus.

* Clock-hour sector 9 if right eye/3 if left eye.

Table 6. Correlation analysis between retinal plexuses (vessel densities) and related structural metrics (thicknesses) in patients with Leber hereditary optic neuropathy.

Macular SCP	Macular GCL+	Pearson coefficient	p-value
Average	Average	0.509	<0.001
Central	Central	0.182	0.060
Superior	Superior inner	0.700	<0.001
Nasal	Nasal inner	0.218	0.025
Inferior	Inferior inner	0.549	<0.001
Temporal	Temporal inner	0.473	<0.001

Macular SCP	Macular GCL++	Pearson coefficient	p-value
Average	Average	0.617	<0.001
Central	Central	0.212	0.028
Superior	Superior inner	0.761	<0.001
Nasal	Nasal inner	0.267	0.006
Inferior	Inferior inner	0.558	<0.001
Temporal	Temporal inner	0.510	<0.001

Disc/circumpapillary RPCP	Peripapillary RNFL	Pearson coefficient	p-value
Average	Average	0.720	<0.001
Average without central	Average	0.737	<0.001
Superior	Superior	0.356	<0.001
Nasal	Nasal	0.579	<0.001
Inferior	Inferior	0.385	<0.001
Temporal	Temporal	0.747	<0.001

GCL+ ganglion cell layer plus plexiform layer, GCL++ ganglion cell complex, RNFL retinal nerve fibre layer, RPCP radial peripapillary capillary plexus, SCP superficial capillary plexus.

Our study has some limitations. First, this was a cross sectional study. A longitudinal study might have documented the retinal microvascular changes over time and helped confirm

or refute our hypothesis. Second, the sample size in the LHON Sub and LHON Dyn groups was small. However, the paucity of LHON patients identified in these stages makes the

feasibility of their inclusion in a study extremely difficult; furthermore, no previous study has quantitatively analysed eyes in the dynamic stage and, overall, this study represents the largest sample size of LHON eyes studied by OCTA. Third, the density maps used were the same for the macula and the optic nerve head region. Compared with other methods in which the central sector is adapted to the optic disc size, this one is less accurate to differentiate the optic disc and peripapillary VD. Finally, notwithstanding the fact that we did not perform repeated measurements, the repeatability and reproducibility of retinal VDs obtained by SS OCTA have proven to be excellent (Baek et al. 2019).

Although the aim of the study was to evaluate the macular and circumpapillary regions and not the centre of the optic disc itself, we also reported VD in this sector. With regard to this, we found that the careful examination and correction of each of the 320 B scans of each OCTA map that was required in most cases was excessively time consuming to be adopted for use in clinical practice. The development of future software versions will probably help overcome this drawback. Additionally, this sector mainly contains large vessels, which could not be excluded from the analysis using the built in software, and LHON is thought to affect the small vessels (Nikoskelainen et al. 1982; Nikoskelainen et al. 1983; Borrelli et al. 2018). This, along with the fact that VD in this sector did not show a consistent trend across LHON stages (it did not appear significantly affected in either the LHON Sub or the LHON Chr groups), makes us consider the finding of VD being statistically significantly reduced in LHON Asy as not being clinically relevant. It is worth noting that the average RPCP VD in the whole grid, containing the optic disc and the circumpapillary region, and the average of just the circumpapillary region (without the central sector) showed the same trend and similar correlations.

In conclusion, retinal VD changes in sectors representing the PMB appear earlier in the macula but end up being more profound and correlate better with BCVA and with structural parameters in the circumpapillary region. The results of this study contribute to a

better understanding of the natural history and pathophysiology of LHON. This could, in turn, be helpful in exploring new therapeutic pathways aiming to improve the retinal microvasculature. Further studies, particularly of longitudinal design, are needed to corroborate and better elucidate these findings. If confirmed by future studies, retinal VDs could be potential biomarkers for monitoring disease progress and efficacy of therapeutic approaches, and possibly identifying patients at risk of conversion.

References

- Akiyama H, Kashima T, Li D, Shimoda Y, Mukai R & Kishi S (2013): Retinal ganglion cell analysis in Leber's hereditary optic neuropathy. *Ophthalmology* 120: 1943-4.e5.
- Asanad S, Meer E, Fantini M, Borrelli E & Sadun AA (2019): Leber's hereditary optic neuropathy: shifting our attention to the macula. *Am J Ophthalmol Case Rep* 13: 13-15.
- Ayhan Z, Kaya M, Ozturk T, Karti O & Oner FH (2017): Evaluation of macular perfusion in healthy smokers by using optical coherence tomography angiography. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina* 48: 617-622.
- Baek SU, Kim YK, Ha A, Kim YW, Lee J, Kim J-S, Jeoung JW & Park KH (2019): Diurnal change of retinal vessel density and mean ocular perfusion pressure in patients with open-angle glaucoma. *PLoS ONE* 14: e0215684.
- Balducci N, Savini G, Cascavilla ML et al. (2016): Macular nerve fibre and ganglion cell layer changes in acute Leber's hereditary optic neuropathy. *Br J Ophthalmol* 100: 1232-1237.
- Balducci N, Cascavilla ML, Ciardella A et al. (2018): Peripapillary vessel density changes in Leber's hereditary optic neuropathy: a new biomarker. *Clin Exp Ophthalmol* 46: 1055-1062.
- Borrelli E, Balasubramanian S, Triolo G, Barboni P, Sadda SVR & Sadun AA (2018): Topographic macular microvascular changes and correlation with visual loss in chronic Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Ophthalmol* 192: 1932-1934.
- Carelli V, Ross-Cisneros FN & Sadun AA (2004): Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog Retin Eye Res* 23: 53-89.
- Carelli V, La Morgia C, Valentino ML, Barboni P, Ross-Cisneros FN & Sadun AA (2009): Retinal ganglion cell neurodegeneration in mitochondrial inherited disorders. *Biochim Biophys Acta* 1787: 518-528.
- Carelli V, Carbonelli M, De Coo IF et al. (2017): International consensus statement on the clinical and therapeutic management of Leber hereditary optic neuropathy. *J Neuroophthalmol* 37: 371-381.
- Chiong M, Cartes-Saavedra B, Norambuena Soto I, Mondaca-Ruff D, Morales PE, García-Miguel M & Mellado R (2014): Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation. *Front Cell Dev Biol* 2: 72.
- Ciesielski M, Rakowicz P & Stopa M (2019): Immediate effects of smoking on optic nerve and macular perfusion measured by optical coherence tomography angiography. *Sci Rep* 9: 10161.
- De Rojas JO, Rasool N, Chen RW, Horowitz J & Odel JG (2016): Optical coherence tomography angiography in Leber hereditary optic neuropathy. *Neurology* 87: 2065-2066.
- Gaier ED, Gittinger JW, Cestari DM & Miller JB (2016): Peripapillary capillary dilation in Leber hereditary optic neuropathy revealed by optical coherence tomographic angiography. *JAMA Ophthalmol* 134: 1932-1934.
- Holladay JT (1997): Proper method for calculating average visual acuity. *J Refract Surg* 13: 388-391.
- Holló G (2019): No acute effect of smoking on peripapillary and macular vessel density in healthy middle-aged smokers. *J Glaucoma* 28: e86-e88.
- Kousal B, Kolarova H, Meliska M et al. (2019): Peripapillary microcirculation in Leber hereditary optic neuropathy. *Acta Ophthalmol* 97: e71-e76.
- Lains I, Wang JC, Cui Y et al. (2021): Retinal applications of swept source optical coherence tomography (OCT) and optical coherence tomography angiography (OCTA). *Prog Retin Eye Res* 84: 100951.
- Matsuzaki M, Hirami Y, Uyama H & Kurimoto Y (2018): Optical coherence tomography angiography changes in radial peripapillary capillaries in Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Ophthalmol Case Rep* 9: 51-55.
- Nikoskelainen E, Hoyt WF & Nummelin K (1982): Ophthalmoscopic findings in Leber's hereditary optic neuropathy. I. Fundus findings in asymptomatic family members. *Arch Ophthalmol* 100: 1597-1602.
- Nikoskelainen E, Hoyt WF & Nummelin K (1983): Ophthalmoscopic findings in Leber's hereditary optic neuropathy. II. The fundus findings in the affected family members. *Arch Ophthalmol* 101: 1059-1068.
- Sadun F, De Negri AM, Carelli V et al. (2004): Ophthalmologic findings in a large pedigree of 11778/haplogroup J Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Ophthalmol* 137: 271-277.
- Sheremet NL, Shmelkova MS, Andreeva NA, Zhorzholadze NV, Fomin AV, Krylova TD & Tsygankova PG (2020): Особенности микрососудистых изменений сетчатки и зрительного нерва у пациентов с наследственной оптической нейропатией по данным оптической когерентной томографии-ангиографии [Characteristics of changes in retinal and optic nerve microvascularisation in Leber hereditary optic neuropathy patients seen with optical coherence tomography angiography]. *Vestn oftalmol* 136: 171-182.
- Spaide RF, Fujimoto JG, Waheed NK, Sadda SR & Staurengi G (2018): Optical coherence tomography angiography. *Prog Retin Eye Res* 64: 1-55.
- Takayama K, Ito Y, Kaneko H, Kataoka K, Ra E & Terasaki H (2017): Optical coherence tomography angiography in Leber hereditary optic neuropathy. *Acta Ophthalmol* 95: e344-e345.
- Tewarie P, Balk L, Costello F, Green A, Martin R, Schippling S & Petzold A (2012): The OSCAR-IB consensus criteria for retinal OCT quality assessment. *PLoS ONE* 7: e34823.
- Wang X, Chen J, Zhang S, Shang X, Zhou K, Lan Y, Cai J & Liang Y (2020): Diurnal fluctuations of macular vessel density in patients with primary open-angle glaucoma and healthy subjects. *Int Ophthalmol* 40: 2257-2266.
- Yanik Odabas Ö, Demirel S, Özmert E & Batioglu F (2018): Repeatability of automated vessel density and superficial and deep foveal avascular zone area measurements using optical coherence tomography angiography diurnal findings. *Retina* 38: 1238-1245.
- Yu-Wai-Man P, Griffiths PG & Chinnery PF (2011): Mitochondrial optic neuropathies - disease mechanisms and therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* 30: 81-114.
- Yu-Wai-Man P, Votruba M, Burté F, La Morgia C, Barboni P & Carelli V (2016): A neurodegenerative perspective on mitochondrial optic neuropathies. *Acta Neuropathol* 132: 789-806.
- Yu J, Xu H, Huang Y, Gu R, Zong Y, Zhu H & Wang M (2021): Changes in retinal perfusion in Leber's hereditary optic neuropathy: an optical coherence tomography angiography study. *Ophthalmic Res* 64: 863-870.

Received on October 23rd, 2021.

Accepted on April 19th, 2022.

Correspondence:

Lorena Castillo, MD
 Institut Català de Retina
 C/ Pau Alcover 67
 08022 Barcelona
 Spain
 Tel: +34 696938589
 Email: 36918lcc@gmail.com

7.4. Choriocapillaris and choroidal thickness in all Leber hereditary optic neuropathy stages using swept-source technology

Resumen

Introducción: El papel de la coroides en la LHON no ha sido aclarado. La literatura al respecto es escasa, con resultados contradictorios, y no incluye medidas de longitud axial. Así, nuestro objetivo fue analizar la coriocapilar y el grosor coroideo en todos los estadios de la LHON utilizando tecnología "swept source" y considerando la posible influencia de la longitud axial en los parámetros coroideos.

Métodos: Este fue un estudio prospectivo observacional y transversal. Se incluyó un total de 119 ojos de 60 pacientes con LHON confirmada molecularmente en todos los estadios de la enfermedad y 120 ojos de 60 participantes sanos (controles). Medimos la densidad vascular de la coriocapilar utilizando mapas de OCTA centrados en la fóvea. El grosor coroideo fue medido desde la membrana de Bruch hasta la interfaz coroidoescleral en las regiones macular y peripapilar.

Resultados: La coriocapilar no se afectó significativamente de media ni en el análisis sectorial en ningún grupo, excepto por un ligero cambio en la región superior de los ojos en estadio crónico ($52.08 \pm 1.62\%$ vs. $53.50 \pm 2.29\%$, $P = 0.002$). El grosor coroideo mostró una tendencia hacia valores disminuidos en ojos asintomáticos y hacia valores aumentados en los estadios sintomáticos, que no alcanzó significación estadística en los sectores correspondientes al haz papilomacular excepto en el sector macular nasal interno de los ojos en estadio crónico ($281.10 \pm 67.12 \mu\text{m}$ vs. $252.08 \pm 70.55 \mu\text{m}$, $P = 0.045$). No se observó ninguna correlación significativa entre la agudeza visual y la coriocapilar o el grosor coroideo.

Conclusión: La coriocapilar permanece estable en todos los estadios de la LHON. La vascularización coroidea no parece jugar un papel en la fisiopatología de la LHON. Son necesarios más estudios sobre el grosor coroideo como potencial marcador de la LHON.

Choriocapillaris and choroidal thickness in all Leber hereditary optic neuropathy stages using swept-source technology

Author information: Lorena Castillo, MD¹, Clara Berrozpe-Villabona, PhD^{2,3,4}, Sergio Miserachs-García, MD⁵, Hanan Haulani, OD¹, Cecilia Gómez-Gutiérrez, MD¹, Alba González-Martínez, MD¹, Antonio Morilla-Grasa, PhD¹, Luis Arias, PhD^{6,7}, José M. Caminal, PhD^{6,7}, Ricardo Casaroli-Marano, PhD⁸

Affiliations:

¹Institut Català de Retina (ICR), Barcelona, Spain

²Department of Ophthalmology, Clínica Universidad de Navarra, Madrid, Spain

³Department of Ophthalmology, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, Spain

⁴Thematic Network of Cooperative Health Research in Eye Diseases (Oftared), Health Institute Carlos III, Madrid, Spain

⁵Institut Clínic d'Oftalmologia (ICOF) – Seu Plató, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain

⁶Department of Ophthalmology, Bellvitge University Hospital, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

⁷Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

⁸Department of Surgery, School of Medicine and Health Sciences, Hospital Clínic de Barcelona, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Conflict of interest statement: The authors declare no conflicts of interest.

Funding statement: The authors are grateful to the Spanish Society for Leber Hereditary Optic Neuropathy (ASANOL) for paying patients' travel expenses and accommodation. Neither the authors nor our institutions received any payment from ASANOL.

Key words: Leber hereditary optic neuropathy; choriocapillaris; choroidal thickness; swept source; optical coherence tomography; choroid.

ABSTRACT

Background: The role of the choroid in Leber hereditary optic neuropathy (LHON) remains unclear. The literature is scarce, with conflicting results, and lacks axial length measurements. Therefore, we aimed to analyze the choriocapillaris (CC) and choroidal thickness (ChT) in all stages of LHON using swept-source (SS) technology and considering the possible influence of axial length on choroidal parameters.

Methods: This was a prospective cross-sectional observational study. A total of 119 eyes of 60 patients with molecularly confirmed LHON across all stages and 120 eyes of 60 control participants were included. We obtained the CC vessel density using optical coherence tomography angiography maps centered on the fovea. ChT was measured from the Bruch's membrane to the choroid-sclera interface in the macular and peripapillary regions.

Results: The CC was not significantly affected in any sectors or average, except for a slight change in the superior region of chronic eyes ($52.08 \pm 1.62\%$ vs. $53.50 \pm 2.29\%$, $P = 0.002$). ChT demonstrated a trend towards decreased values in asymptomatic eyes and increased values in the symptomatic stages that failed to reach statistical significance in sectors corresponding to the papillomacular bundle except for the macular nasal inner sector of chronic eyes ($281.10 \pm 67.12 \mu\text{m}$ vs. $252.08 \pm 70.55 \mu\text{m}$, $P = 0.045$). No significant correlations were observed between visual acuity and CC or ChT.

Conclusion: The CC remained stable across the LHON stages. Choroidal vasculature does not appear to play a role in LHON pathophysiology. Further research is needed on ChT as a potential biomarker of LHON.

INTRODUCTION

Leber hereditary optic neuropathy (LHON) is the most common primary mitochondrial disease (1). For reasons that have not been completely elucidated, it causes retinal

ganglion cell degeneration that preferentially affects the papillomacular bundle (PMB) (2), resulting in central visual loss. In recent years, growing evidence of vascular involvement in LHON has emerged. The retinal microvasculature has been revealed to be affected (3–6); however, the role of the choroid in LHON pathophysiology remains unclear, and the literature is scarce. The choriocapillaris (CC) has only been studied in the chronic stage of the disease using spectral domain (SD) technology, with no significant changes discovered with respect to controls and no reports regarding its correlation with visual acuity (VA) (4). Conflicting results exist in the literature regarding the choroidal thickness (ChT). Two studies (7,8) revealed decreased ChT in LHON chronic patients, whereas another (9) did not reveal any significant changes in the same disease stage. However, a trend towards increased peripapillary ChT in patients with symptomatic LHON has also been reported, significant only in the nasal sector (10). ChT in stages other than chronic has only been assessed using SD optical coherence tomography (OCT). Swept-source (SS) technology allows better visualization of the choroid-sclera interface owing to deeper penetration and lower scattering from the retinal pigment epithelium. Faster scan rates also help mitigate motion artifacts (11). Further, the aforementioned studies did not measure the axial length (AL), which has been revealed to correlate with choroidal parameters (11).

In this study, we aimed to analyze CC and ChT across all LHON stages using SS technology and considering the possible influence of AL on the results. We also aimed to study whether these choroidal parameters correlate with VA.

METHODS

Study population and design

This prospective, cross-sectional, observational study included patients with a molecularly confirmed LHON diagnosis and a control group. Participants were recruited at the Institut Català de Retina (ICR, Barcelona, Spain) and Clínica Universidad de Navarra (CUN, Madrid, and Pamplona, Spain) between March 2018 and May 2019. The Institutional Review Boards of Grupo Hospitalario Quirónsalud-Catalunya and Universidad de Navarra approved the study, which was conducted per the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all the participants prior to enrollment.

Patients with retinopathy or optic neuropathy, different from LHON, were excluded. For each patient with LHON, an age- (± 1 year) and sex-matched control participant was included. The inclusion criteria for the control group were best-corrected visual acuity (BCVA) $\geq 20/25$, normal intraocular pressure (IOP), and normal appearance of the optic disc and retina. The exclusion criteria for the LHON and control participants were spherical or cylindrical refractive errors greater than 5 or 3 diopters, respectively, and systemic conditions that may affect the vascular system.

All patients underwent an extensive ophthalmologic examination, including BCVA, IOP, slit-lamp examination, ophthalmoscopy under pharmacological mydriasis, and AL measurement (IOL Master 700, version 1.70; Carl Zeiss Meditec, Jena, Germany). BCVA was measured using a Snellen chart and converted to the logarithm of the minimum angle of resolution (logMAR) as previously described (12).

The eyes of patients with LHON were divided into four groups according to the clinical stages defined by the international consensus on the clinical and therapeutic management of LHON (1): asymptomatic (mutation carriers who had not experienced visual loss, LHON-Asy), subacute (<6 months from onset, LHON-Sub), dynamic (6–12 months from onset, LHON-Dyn), or chronic (>12 months from onset, LHON-Chr).

Imaging acquisition

Imaging was performed for all patients using an SS-OCT system (DRI OCT Triton; Topcon Corporation, Tokyo, Japan), which operates at a wavelength of 1,050 nm and

has a scan speed of 100,000 A-scans per second. Images were acquired after pupillary dilation and analyzed using IMAGEnet 6 software, version 1.22 (Topcon Corporation, Tokyo, Japan). None of the participants had smoked within the previous hour, as it could potentially increase the ChT (13). All examinations were performed in the morning to avoid potential diurnal changes in choroidal parameters (14,15).

We obtained OCTA three-dimensional (3D) 4.5 x 4.5 mm maps consisting of 320 B-scans centered on the fovea. Active eye tracking was used to reduce motion artifacts. We only included images with a quality ≥ 50 and without artifacts. We studied CC from Bruch's membrane (BM) to 10.4 μm below BM. Vessel density (VD), defined as the percentage area occupied by the microvasculature, was obtained in the segmented region, employing the two inner circles (diameters 1 and 3 mm) of the early treatment retinopathy study (ETDRS) grid. The built-in software automatically provides density maps that show the VD in each of the five regions in which the grid is divided (central, superior, nasal, inferior, and temporal). We performed the 3D macula and 3D disc scan patterns, which give a 3D 7.0 x 7.0 mm and 6.0 x 6.0 mm map centered on the fovea and optic disc, respectively. We measured the ChT from the BM to the choroid-sclera interface. Macular ChT was measured using the ETDRS grid, comprised of three concentric circles with diameters of 1, 3, and 6 mm and was divided into nine sectors (central, superior inner, superior outer, nasal inner, nasal outer, inferior inner, inferior outer, temporal inner, and temporal outer). The peripapillary ChT was measured with a grid consisting of a 3.4 mm-diameter circle divided into four quadrants and 12 clock-hour sectors (Figure 1). All measurements were automatically obtained using built-in segmentation software. Images with segmentation failures were excluded from the analysis.

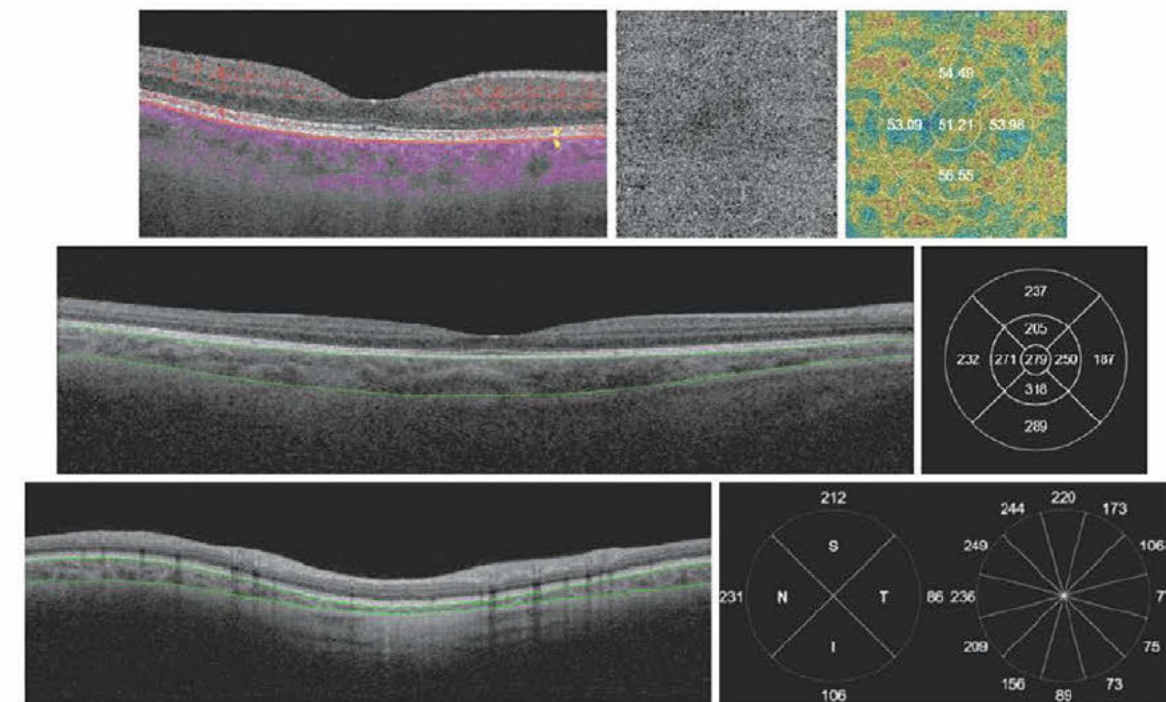


FIG. 1. Imaging of choriocapillaris (CC) and choroidal thickness (ChT) using swept source optical coherence tomography. (Top) B-scan (yellow arrows point to the segmentation lines), en face, and density map visualization of macular CC. (Middle) Macular ChT was measured from Bruch's membrane (BM) to the choroid-sclera interface (CSI) in the 9 sectors of the early treatment retinopathy study grid. (Bottom) Peripapillary ChT was measured from BM to CSI in 4 quadrants and 12 clock-hour sectors.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the IBM SPSS software (version 20.0; IBM Corp., Armonk, N.Y., USA). The Kolmogorov-Smirnov test was applied to all data samples to check for normality. We calculated the mean and standard deviation of all quantitative variables. Continuous clinical variables were compared using a one-way analysis of variance with the Scheffé post hoc test. Continuous OCT variables were compared by one-way analysis of covariance, selecting the control as the reference group and using sex, age, and AL as covariates, as these factors have been revealed to influence choroidal parameters (16). We used the Pearson correlation test to evaluate the associations between BCVA and OCT parameters (average and sectors corresponding to the PMB: nasal and temporal in the macular and optic disc regions, respectively) in patients with LHON. For all tests, $P < 0.05$ was considered statistically

significant. Graphs were created using R, version 3.5.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

RESULTS

We analyzed 119 and 120 eyes of 60 patients with LHON and 60 controls, respectively. Six patients with LHON had both eyes at different stages: one eye in LHON-Asy and the contralateral eye in LHON-Sub. Four patients had one eye in LHON-Sub and the contralateral eye in LHON-Dyn, and one patient had one eye in LHON-Dyn and the contralateral eye in LHON-Chr. The remaining 54 patients had both eyes at the same LHON stage. The distribution of the eyes of patients with LHON among the groups was as follows: LHON-Asy, 65 eyes of 33 patients; LHON-Sub, 5 eyes of 5 patients; LHON-Dyn, 9 eyes of 7 patients; and LHON-Chr, 40 eyes of 21 patients. AL did not differ significantly among groups (controls = 23.61 ± 0.99 mm; LHON-Asy = 23.57 ± 0.99 mm; LHON-Sub = 24.07 ± 0.49 mm; LHON-Dyn = 24.15 ± 1.23 mm; LHON-Chr = 23.71 ± 1.01 mm; *P* = 0.42). This cohort's demographic and clinical data have been previously described (6).

Choriocapillaris

The average CC was not significantly affected in any group. In the sectorial analysis, only the superior region of LHON-Chr was slightly decreased compared with that of the controls (52.08 ± 1.62% vs. 53.50 ± 2.29%, *P* = 0.002).

Choroidal thickness

Macular ChT was decreased in LHON-Asy, although only statistically significant in the inferior outer sector (229.11 ± 82.17 μm vs. 260.58 ± 67.22 μm, *P* = 0.001). Macular ChT was increased in the late stages of LHON (LHON-Dyn and LHON-Chr); however, in sectors involving the PMB, only the nasal inner region of LHON-Chr was affected (281.10 ± 67.12 μm vs. 252.08 ± 70.55 μm, *P* = 0.045).

Peripapillary ChT was significantly decreased in the LHON-Asy group, except in sectors involving PMB. In the symptomatic groups, there was a trend towards increased peripapillary ChT, but not statistically significant in any sector or average.

Table 1 summarizes the choroidal parameters of the study participants. The average values and sectors corresponding to the PMB are illustrated in Figure 2. Peripapillary choroidal thickness in all clock-hour sectors is detailed in Supplementary table.

Table 1. Choroidal parameters in study participants

	Controls	LHON-Asy		LHON-Sub		LHON-Dyn		LHON-Chr	
	Mean ± SD	Mean ± SD	P-value	Mean ± SD	P-value	Mean ± SD	P-value	Mean ± SD	P-value
Macular CC (%)									
Average	53.29 ± 1.73	53.29 ± 1.49	0.497	54.25 ± 0.77	0.125	53.89 ± 0.71	0.420	53.25 ± 0.96	0.403
Central	51.17 ± 4.77	49.84 ± 6.90	0.217	53.08 ± 2.80	0.715	54.72 ± 1.60	0.087	53.37 ± 3.27	0.128
Superior	53.50 ± 2.29	53.71 ± 2.60	0.505	54.11 ± 1.08	0.671	53.14 ± 1.76	0.577	52.08 ± 1.62	0.002
Nasal	53.00 ± 2.25	53.08 ± 2.75	0.621	53.45 ± 2.31	0.827	53.22 ± 1.15	0.955	53.56 ± 2.57	0.433
Inferior	54.16 ± 2.31	54.00 ± 2.95	0.886	55.52 ± 1.95	0.322	53.97 ± 1.96	0.686	53.25 ± 2.84	0.0503
Temporal	54.00 ± 2.15	54.31 ± 2.64	0.126	54.52 ± 1.12	0.745	54.48 ± 1.49	0.884	53.99 ± 2.05	0.501
Macular ChT (μm)									
Average	254.74 ± 60.09	237.82 ± 76.71	0.085	284.31 ± 73.17	0.159	290.94 ± 58.99	0.048	274.20 ± 52.89	0.065
Central	276.60 ± 67.77	265.23 ± 85.47	0.455	263.80 ± 54.23	0.842	299.89 ± 58.60	0.292	303.25 ± 59.27	0.061
Superior inner	277.45 ± 68.20	269.78 ± 82.73	0.774	302.40 ± 68.84	0.290	321.00 ± 54.68	0.058	307.50 ± 59.05	0.040
Superior outer	273.18 ± 69.77	262.62 ± 80.57	0.450	318.00 ± 69.75	0.085	331.00 ± 54.97	0.010	306.27 ± 53.31	0.012
Nasal inner	252.08 ± 70.55	246.34 ± 84.90	0.805	251.60 ± 72.23	0.766	287.22 ± 52.01	0.090	281.10 ± 67.12	0.045
Nasal outer	203.58 ± 66.22	190.91 ± 75.83	0.271	214.80 ± 76.67	0.441	233.33 ± 64.71	0.082	220.79 ± 71.17	0.167
Inferior inner	272.17 ± 65.69	252.31 ± 88.64	0.066	312.80 ± 89.37	0.105	310.44 ± 46.42	0.061	301.38 ± 62.92	0.014
Inferior outer	260.58 ± 67.22	229.11 ± 82.17	0.001	309.40 ± 96.45	0.068	318.50 ± 62.27	0.017	288.06 ± 70.33	0.036
Temporal inner	275.47 ± 63.36	260.31 ± 85.92	0.187	282.00 ± 63.81	0.670	301.00 ± 50.84	0.233	302.60 ± 56.92	0.024
Temporal outer	261.15 ± 60.76	245.15 ± 79.57	0.076	294.60 ± 66.90	0.140	298.44 ± 48.66	0.060	287.03 ± 47.85	0.015
Peripapillary ChT (μm)									
Average	150.72 ± 54.29	131.11 ± 46.08	0.018	160.93 ± 74.53	0.586	158.65 ± 64.35	0.601	153.70 ± 46.43	0.735
Superior	165.33 ± 61.37	143.31 ± 49.33	0.013	178.60 ± 78.39	0.570	179.78 ± 73.27	0.413	168.43 ± 51.77	0.659
Nasal	150.15 ± 55.33	126.66 ± 41.40	0.006	179.80 ± 102.34	0.198	158.44 ± 71.05	0.664	151.75 ± 48.10	0.894
Inferior	134.93 ± 55.86	116.20 ± 49.64	0.031	146.00 ± 87.24	0.574	143.67 ± 66.64	0.602	135.68 ± 46.91	0.926
Temporal	152.81 ± 58.22	138.20 ± 55.58	0.112	138.80 ± 37.16	0.691	152.56 ± 55.76	0.909	156.35 ± 49.38	0.749

Asy = asymptomatic stage; CC = choriocapillaris; Chr = chronic stage; ChT = choroidal thickness; Dyn = dynamic stage; LHON = Leber hereditary optic neuropathy; Sub = subacute stage
 Values were compared by one-way analysis of covariance with sex, age, and axial length as covariates.

*Clock-hour 9 if right eye/3 if left eye.

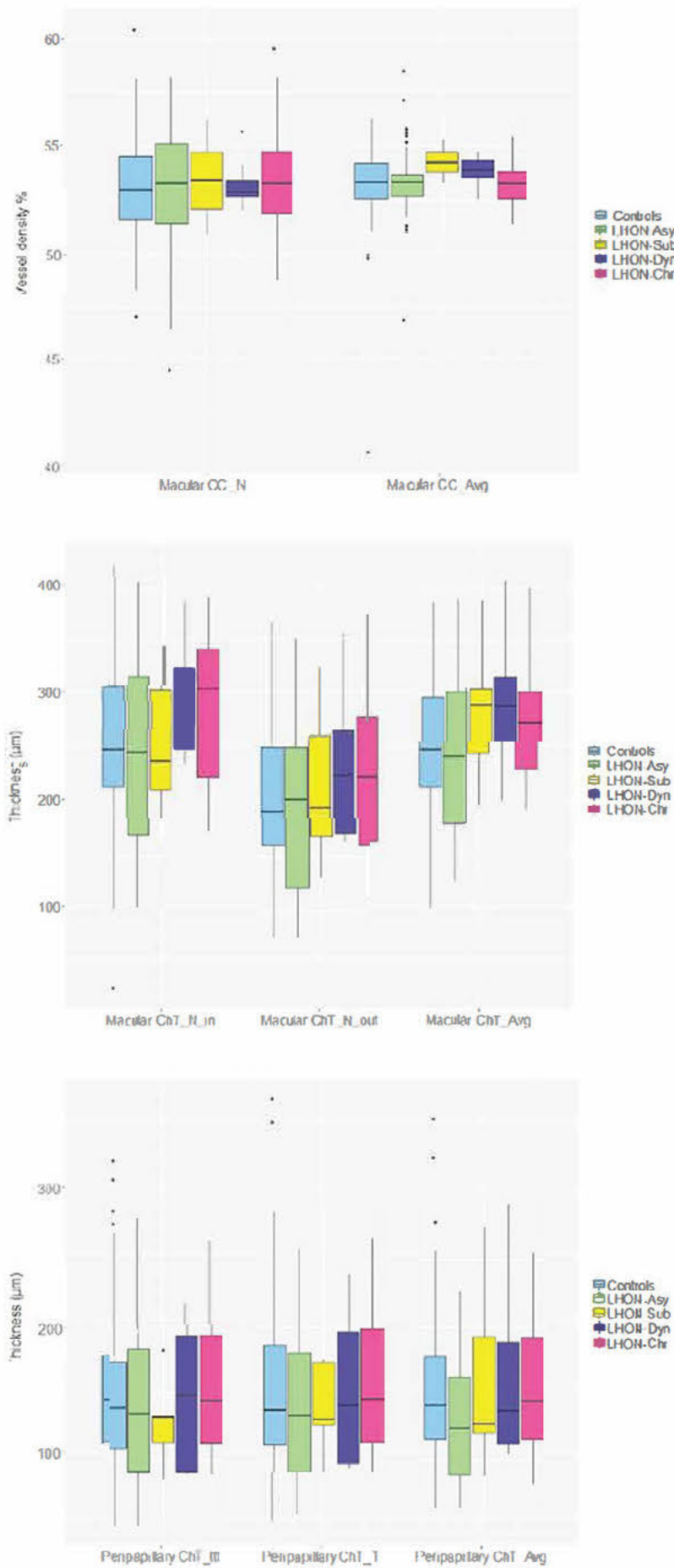


FIG. 2. Boxplots of choroidal parameters in study participants. Asy = asymptomatic stage; Avg = average; CC = choriocapillaris; Chr = chronic stage; ChT = choroidal thickness; Dyn = dynamic stage; LHON = Leber hereditary optic neuropathy; N = nasal; N_in = nasal inner; N_out = nasal outer; Sub = subacute stage; T = temporal quadrant; ttt = temporal clock-hour sector (9 clock-hour if right eye/3 if left eye).

Correlations

No significant correlations were observed between BCVA and choroidal parameters (CC or ChT; Table 2).

Table 2. Correlation analysis between best corrected visual acuity (logarithm of the minimum angle of resolution) and choroidal parameters in patients with Leber hereditary optic neuropathy

	Pearson Coefficient	P-value
Macular CC, average	0.142	0.130
Macular CC, nasal	0.032	0.746
Macular ChT, average	0.155	0.097
Macular ChT nasal inner	0.113	0.231
Macular ChT, nasal outer	0.099	0.298
Peripapillary ChT, average	0.126	0.180
Peripapillary ChT, temporal quadrant	0.070	0.455
Peripapillary ChT, temporal clock-hour sector*	0.026	0.784

CC = choriocapillaris, ChT = choroidal thickness

*Clock-hour sector 9 if right eye/3 if left eye.

CONCLUSIONS

In this cross-sectional study, we evaluated the CC and ChT across all LHON stages using SS-OCT/OCTA and considered the possible influence of age, AL, acute tobacco smoking, and circadian variability on the results. Choroidal parameter measurements were performed in an automated manner with high reproducibility (11). CC remained stable throughout the disease. Regarding ChT, there was a trend towards decreased values in LHON-Asy and increased values in the symptomatic stages. However, few changes were statistically significant; intriguingly, those did not tend to affect the average or the sectors corresponding to the PMB, which is the region known to be preferentially involved in LHON pathophysiology. Moreover, neither CC nor ChT was associated with VA.

The first study to assess the choroid in LHON (7) revealed no association between the ChT and VA, which aligns with our study. However, they observed increased ChT in the early stages of the disease and decreased values of LHON-Chr. Differences in study design may explain these differences. They used SD-OCT, manual segmentation, and measured points instead of areas; more importantly, AL was not measured. In line with our findings, Jiang et al. (10) observed a trend toward increased peripapillary ChT in patients with symptomatic LHON, which was not significant on average. They only studied patients with the m.11778G>A mutation; the macular region was not analyzed. The two studies that reported ChT in LHON using SS-OCT only included LHON-Chr eyes and revealed conflicting results; one reported decreased values (8), whereas the other revealed no significant differences (9). In contrast to our study, neither diurnal changes nor the AL was considered. Regarding choroidal vascular parameters, CC has been studied in LHON-Chr (4) and the choroidal vascular index in patients with symptomatic LHON (9,10), with no significant changes observed. Our study confirms this and adds to the literature by analyzing CC in all LHON stages and studying its possible association with VA.

The pattern of ChT changes observed in our study is difficult to explain. Considering that retinal changes occur mainly in the PMB (2), it is striking that statistically significant differences in ChT occur nearly exclusively in areas not topographically related to PMB. As the nature of these choroidal changes remains to be elucidated, we can only speculate about the possible underlying mechanisms that lead to increased ChT in patients with

symptomatic LHON. Similar to reports in Alzheimer's disease (AD) (17), a compensatory increase in choroidal vessels (either in number or diameter) can occur. This could be in response to retinal hypoperfusion, which is known to worsen as the disease progresses (3,6). A high number of string vessels may be associated with neuronal loss, as observed in the brains of patients with Parkinson's disease (PD) (18). An increase in fibrovascular tissue is also possible, as in vascular parkinsonism, and has been proposed in PD (19). The choroid could also thicken as an adaptation to thinning of the retinal layers. The compromised retinal microcirculation might lead to the expansion of membrane-lined lacunae that have been proposed to act as lymphatic drainage, although their identification in humans is controversial (20). Improper contraction of non-vascular smooth muscle cells may cause choroid thickening. However, this seems improbable as these cells are located mainly behind the fovea. The fact that ChT in patients with LHON does not tend to be affected in sectors corresponding to PMB does not support any of the previous hypotheses. Moreover, the choroid is a highly variable structure, even among healthy emmetropic patients in a certain age group (11). Thus, although we controlled for age, sex, AL, acute tobacco smoking, and circadian variability, other physiological factors (such as corneal thickness or systolic blood pressure) may have influenced the results. Moreover, conflicting results have been reported in other neurodegenerative diseases, such as AD and PD. In addition, the lack of association between ChT and VA also supports the hypothesis that ChT changes observed in LHON might be spurious.

Our study had some limitations. Our study was cross-sectional; longitudinal studies would help clarify whether actual changes in ChT occur in LHON. However, because of the rarity of the disease, observing the transition from LHON-Asy to LHON-Sub is particularly challenging. Another limitation is the small sample size of LHON-Sub and LHON-Dyn. However, their identification is extremely difficult given the paucity of patients with LHON within the first year of symptom onset. This is the first study to provide choroid imaging in all LHON stages using OCTA. Furthermore, this is also the first study to include all disease stages in ChT analysis using SS technology.

In conclusion, for the first time, we have provided the analysis of CC and ChT across all LHON stages using SS-OCT/OCTA. To our knowledge, this is also the first study to report correlations between choroidal vasculature and VA and the possible influence of AL on ChT and choroidal vascular parameters. We observed that CC remained stable in patients with LHON. However, ChT did not tend to change significantly on average or in sectors corresponding to the PMB. Moreover, neither CC nor ChT correlated with VA.

Thus, the results of our study suggest that the choroidal vasculature may not play a role in LHON pathophysiology. Nevertheless, they highlight the need for further research on ChT as a potential biomarker for LHON. Long-term follow-up is warranted to clarify whether actual changes in ChT occur in patients with LHON. In addition, only histopathological studies can assess the actual status of the choroid in these patient

Supplementary table. Peripapillary choroidal thickness (μm) as measured in clock-hour sectors in study participants

	Controls			LHON-Asy		LHON-Sub		LHON-Dyn		LHON-Chr	
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	P-value	Mean \pm SD	P value	Mean \pm SD	P-value	Mean \pm SD	P-value		
Clock-hour secto											
1 if RE/11 if LE	158.91 \pm 61.24	138.22 \pm 47.07	0.022	189.20 \pm 89.69	0.234	176.22 \pm 79.15	0.365	164.35 \pm 53.72	0.551		
2 if RE/10 if LE	151.33 \pm 59.04	129.18 \pm 40.05	0.013	187.20 \pm 96.67	0.140	167.22 \pm 75.21	0.396	160.55 \pm 52.48	0.372		
3 if RE/9 if LE	147.58 \pm 55.25	124.77 \pm 40.78	0.009	178.60 \pm 113.43	0.174	148.56 \pm 65.57	0.975	146.40 \pm 47.62	0.826		
4 if RE/8 if LE	150.59 \pm 55.26	125.88 \pm 47.19	0.004	174.60 \pm 97.10	0.316	159.22 \pm 76.48	0.676	148.58 \pm 51.56	0.879		
5 if RE/7 if LE	139.73 \pm 54.16	120.46 \pm 48.96	0.019	159.40 \pm 91.66	0.403	146.56 \pm 76.33	0.726	137.55 \pm 48.81	0.962		
6	127.92 \pm 57.48	109.40 \pm 48.97	0.034	140.40 \pm 87.97	0.534	136.00 \pm 65.59	0.606	131.23 \pm 49.26	0.707		
7 if RE/5 if LE	137.12 \pm 61.14	118.83 \pm 55.17	0.069	139.20 \pm 85.52	0.810	148.44 \pm 63.68	0.520	138.05 \pm 49.61	0.955		
8 if RE/4 if LE	147.58 \pm 60.96	133.51 \pm 60.23	0.168	129.60 \pm 40.76	0.635	155.89 \pm 69.82	0.571	151.13 \pm 56.75	0.796		
9 if RE/3 if LE	149.32 \pm 57.42	139.29 \pm 56.96	0.329	128.40 \pm 35.51	0.508	142.67 \pm 50.25	0.814	153.60 \pm 49.97	0.778		
10 if RE/2 if LE	161.66 \pm 63.88	142.03 \pm 53.22	0.040	158.80 \pm 52.32	0.964	160.11 \pm 62.29	0.936	172.20 \pm 56.53	0.331		
1 if RE/10 if LE	169.03 \pm 64.34	145.98 \pm 53.78	0.011	171.60 \pm 72.45	0.846	179.22 \pm 70.76	0.515	172.08 \pm 54.11	0.635		
12	167.91 \pm 64.42	145.74 \pm 50.86	0.016	174.20 \pm 74.31	0.787	183.67 \pm 71.40	0.406	168.65 \pm 53.17	0.830		

Asy = asymptomatic stage; Chr = chronic stage; ChT = choroidal thickness; Dyn = dynamic stage; LE = left eye; LHON = Leber hereditary optic neuropathy; Sub = subacute stage; RE = right eye

Values were compared by one-way analysis of covariance with sex, age, and axial length as covariates.

REFERENCES

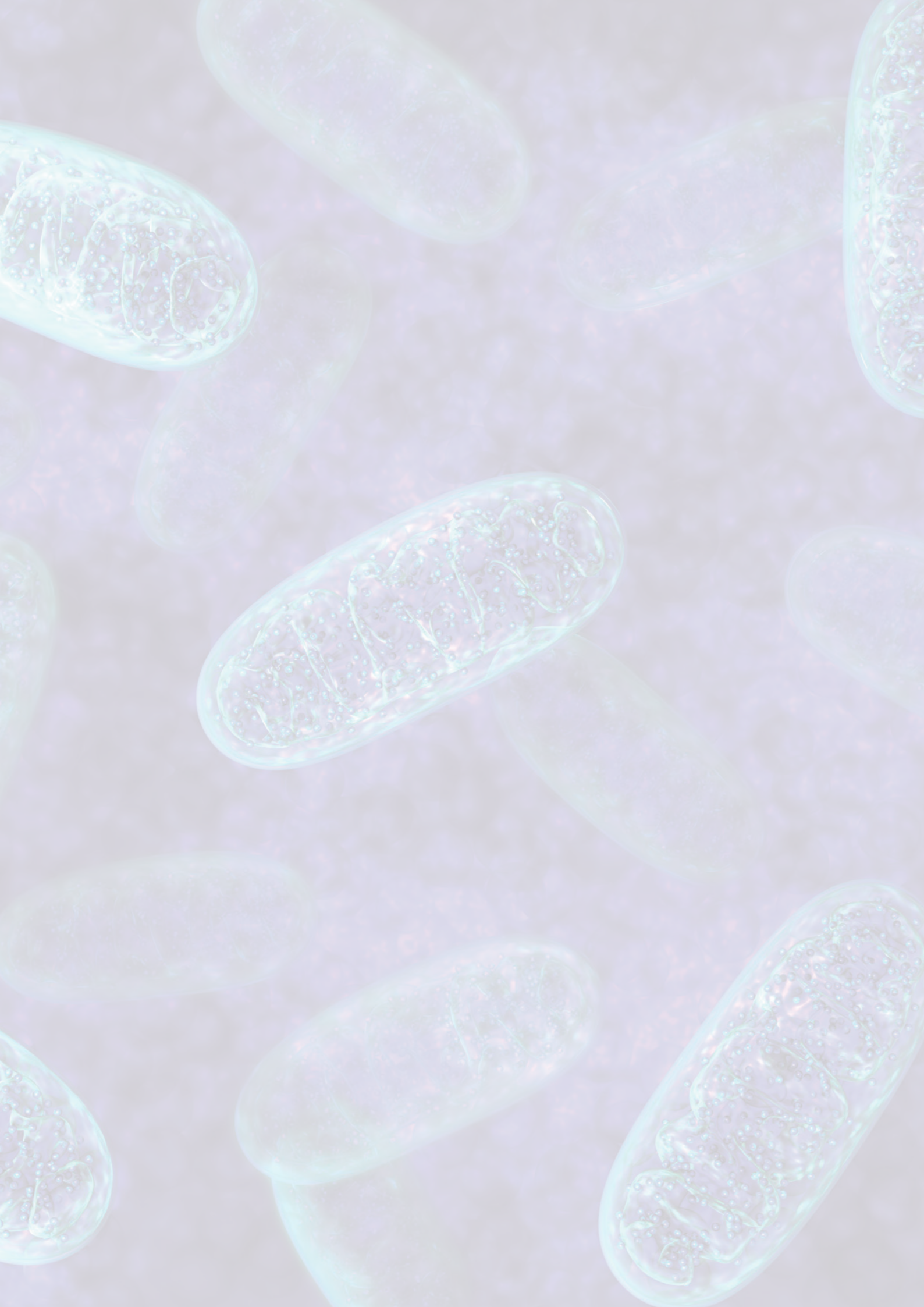
1. Carelli V, Carbonelli M, de Coo IF, Kawasaki A, Klopstock T, Lagrèze WA, la Morgia C, Newman NJ, Orssaud C, Pott JWR, Sadun AA, van Everdingen J, Vignal-Clermont C, Votruba M, Yu-Wai-Man P, Barboni P. International consensus statement on the clinical and therapeutic management of leber hereditary optic neuropathy. *J Neuroophthalmol*. 2017; 37: 371–381.
2. Yu-Wai-Man P, Votruba M, Burté F, la Morgia C, Barboni P, Carelli V. A neurodegenerative perspective on mitochondrial optic neuropathies. *Acta Neuropathol*. 2016; 132: 789–806.
3. Balducci N, Cascavilla ML, Ciardella A, la Morgia C, Triolo G, Parisi V, Bandello F, Sadun AA, Carelli V, Barboni P. Peripapillary vessel density changes in Leber's hereditary optic neuropathy: a new biomarker. *Clin Exp Ophthalmol*. 2018; 46: 1055–1062.
4. Borrelli E, Balasubramanian S, Triolo G, Barboni P, Sadda SVR, Sadun AA. Topographic Macular Microvascular Changes and Correlation With Visual Loss in Chronic Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Am J Ophthalmol*. 2018; 192: 1932–1934.
5. Yu J, Xu H, Huang Y, Gu R, Zong Y, Zhu H, Wang M. Changes in retinal perfusion in Leber's hereditary optic neuropathy: An optical coherence tomography–angiography study. *Ophthalmic Res*. 2021; 64: 863–870.
6. Castillo L, Berrozpe-Villabona C, Miserachs-García S, Haulani H, Gómez-Gutiérrez C, Díaz-García RS, González-Martínez A, Fernández-Sanz G, Morilla-Grasa A, García V, Arias L, Caminal JM, Casaroli-Marano R. Quantitative assessment of macular and circumpapillary retinal vessel density across all stages of Leber hereditary optic neuropathy using swept source optical coherence tomography angiography. *Acta Ophthalmol*. 2022; 100: e1646–e1656.
7. Borrelli E, Triolo G, Cascavilla ML, la Morgia C, Rizzo G, Savini G, Balducci N, Nucci P, Giglio R, Darvizeh F, Parisi V, Bandello F, Sadun AA, Carelli V, Barboni P. Changes in Choroidal Thickness follow the RNFL Changes in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Sci Rep*. 2016; 6: 37332.
8. Darvizeh F, Asanad S, Falavarjani KG, Wu J, Tian JJ, Bandello F, Ross-Cisneros FN, Barboni P, Borrelli E, Sadun AA. Choroidal thickness and the retinal ganglion cell complex in chronic Leber's hereditary optic neuropathy: a prospective study using swept-source optical coherence tomography. *Eye*. 2020; 34: 1624–1630.
9. Battista M, Cascavilla ML, Borrelli E, Barresi C, Lari G, Caporali L, Viganò C, Berni A, Carelli V, Bandello F, Barboni P. Choroidal vascularity index in hereditary optic neuropathies. *Eye*. Published Online First: 7 February 2023.
10. Jiang J, Sun G, Miao Q, Li B, Wang D, Yuan J, Chen C. Observation of Peripapillary Choroidal Vascularity in Natural Disease Course and After Gene Therapy for Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Front Med (Lausanne)*. 2021; 8.
11. Láíns I, Wang JC, Cui Y, Katz R, Vingopoulos F, Staurenghi G, Vavvas DG, Miller JW, Miller JB. Retinal applications of swept source optical coherence tomography (OCT) and optical coherence tomography angiography (OCTA). *Prog Retin Eye Res*. 2021; 84: 100951.
12. Holladay JT. Proper method for calculating average visual acuity. *Journal of Refractive Surgery*. 1997; 13: 388–391.
13. Ulaş F, Çelik F, Doğan Ü, Çelebi S. Effect of smoking on choroidal thickness in healthy smokers. *Curr Eye Res*. 2014; 39: 504–511.
14. Usui S, Ikuno Y, Akiba M, Maruko I, Sekiryu T, Nishida K, Iida T. Circadian Changes in Subfoveal Choroidal Thickness and the Relationship with Circulatory Factors in Healthy Subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53: 2300–2307.
15. Sarwar S, Hassan M, Soliman MK, Sohail Halim M, Ali Sadiq M, Afridi R, Agarwal A, Do D v, Dong Nguyen Q, Sepah YJ. Diurnal variation of choriocapillaris vessel flow density in normal subjects measured using optical coherence tomography angiography. *Int J Retina Vitreous*. 2018; 4: 37.
16. Xie R, Qiu B, Chhablani J, Zhang X. Evaluation of Choroidal Thickness Using Optical Coherent Tomography: A Review. *Front Med (Lausanne)*. 2021; 8.

17. Asanad S, Ross-Cisneros FN, Barron E, Nassisi M, Sultan W, Karanjia R, Sadun AA. The retinal choroid as an oculo-vascular biomarker for Alzheimer's dementia: A histopathological study in severe disease. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2019; 11: 775–783.
18. Paul G, Elabi OF. Microvascular Changes in Parkinson's Disease- Focus on the Neurovascular Unit. *Front Aging Neurosci*. 2022; 14.
19. Garcia-Martin E, Pablo LE, Bambo MP, Alarcia R, Polo V, Larrosa JM, Vilades E, Cameo B, Orduna E, Ramirez T, Satue M. Comparison of peripapillary choroidal thickness between healthy subjects and patients with Parkinson's disease. *PLoS One*. 2017; 12: e0177163-undefined.
20. Nickla DL, Wallman J. The multifunctional choroid. *Prog Retin Eye Res*. 2010; 29: 144–168.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Spanish Society for Leber Hereditary Optic Neuropathy (ASANOL) for paying patients' travel expenses and accommodation. Neither the authors nor our institutions received any payment from ASANOL.

The authors are also grateful to Daniel Cuadras (Servei d'Assessorament Metodològic i Estadístic a la Recerca, Parc Sanitari Sant Joan de Déu, Sant Boi de Llobregat, Barcelona, Spain) for conducting the statistical analysis.



8. DISCUSIÓN

La LHON, paradigma de enfermedad mitocondrial, ha sido considerada clásicamente una enfermedad monogénica. Sin embargo, conforme se ha ido avanzando en el conocimiento de su fisiopatología, se ha ido incrementando la evidencia de que se trata, en realidad, de una enfermedad compleja multifactorial. Esto significa que, probablemente, un abordaje multidisciplinar pueda conseguir mejores resultados que los obtenidos en estudios de tratamientos individuales (5, 31). Su importancia reside, por un lado, en el alto impacto psicológico, económico y social que conlleva, al ser una causa frecuente de ceguera en varones jóvenes. Por otro lado, el que sea considerada un modelo de estudio de la disfunción mitocondrial hace que los avances en la LHON puedan tener implicaciones en enfermedades muy diversas, como el cáncer, la diabetes mellitus, el parkinsonismo o incluso el envejecimiento celular (5–7).

En el presente trabajo, hemos revisado los factores pronósticos de la LHON, ahondado en el potencial del único tratamiento disponible actualmente y estudiado la microvascularización retinocoroidea en búsqueda de nuevos biomarcadores. Hemos encontrado que los pacientes que debutan de adultos con la mutación m.11778G>A son los que presentan peores resultados visuales, que el tratamiento con idebenona durante más tiempo del establecido en el consenso internacional consigue mayores tasas de recuperación visual clínicamente relevante y que las densidades vasculares retinianas podrían ser biomarcadores de la enfermedad.

8.1. Interpretación de los resultados y comparación con la literatura

8.1.1. Factores pronósticos: estudio “REALITY”

Los resultados visuales se estudiaron a través de un registro retrospectivo internacional (“REALITY”) de pacientes sintomáticos. Los pacientes debían tener diagnóstico genético confirmado de una de las tres mutaciones más frecuentes (m.11778G>A, m.3460G>A o m.14484T>C). Esta cohorte fue representativa de la población general de LHON sintomática, con edad de debut (media de 27.9 años) y distribución de género (75 % de varones) en consonancia con estudios previos (12, 69, 70). La proporción de pacientes con edad <15 años al inicio de la pérdida visual fue del 18 %, también en consonancia con la literatura previa (4, 71–74).

Los dos factores pronósticos más importantes en la LHON son la edad al inicio de la pérdida visual y la mutación causal. En el estudio REALITY, los pacientes con la mutación m.14484T>C tuvieron los mejores resultados visuales, consistente con lo reportado en la literatura. Estudios previos han documentado que, cuando la edad de debut es ≤ 12 años, los resultados visuales son significativamente mejores que en los adultos (73, 75–77). En concordancia con dichos hallazgos, en el REALITY observamos que la mejor agudeza visual corregida (MAVC) media fue de 0.65 logMAR frente a 1.46 logMAR según la pérdida visual se hubiera iniciado en ≤ 12 años o en > 12 años respectivamente. Además, en los pacientes con LHON que tenían <15 años en el momento del debut, la última medida observada de MAVC fue mejor que 1.0 logMAR en la mayoría de los ojos, y estaba “on-chart” en todos los casos de mutación m.11778G>A o m.14484T>C, lo que confirma el mejor pronóstico en este grupo de pacientes más jóvenes.

En los pacientes con la mutación m.11778G>A que tenían ≥ 15 años al inicio de la pérdida visual, la última medida observada de MAVC fue igual o peor que 1.0 logMAR en la mayoría de los ojos. Se sabe que la mutación m.11778G>A confiere mal pronóstico, con mejoría espontánea parcial en <15 % de los casos (18,73), y es raro que las MAVC finales sean > 0.1 en la escala decimal. En el REALITY, el 84.8 % de los ojos con la mutación m.11778G>A que tenían ≥ 15 años al inicio de la pérdida visual tuvieron una MAVC < 0.1 en la escala decimal en la última medida observada, y el 47.8 % de los ojos estaban “off-chart”.

8.1.2. Tratamiento con idebenona: programa de acceso expandido

El programa de acceso expandido (EAP) internacional proporciona una muestra amplia de pacientes tratados con idebenona durante una media superior a 2 años. El tratamiento fue bien

tolerado, con un alto perfil de seguridad, en línea con los resultados del ensayo RHODOS (42). No se observaron nuevos efectos adversos.

Dado que los pacientes con LHON experimentan pérdida visual rápidamente progresiva, se pueden definir dos objetivos terapéuticos, según el grado de afectación en que se encuentre el paciente en el momento de plantear el tratamiento. En pacientes que hayan sufrido una pérdida visual relevante, el objetivo será recuperar el máximo posible: al menos, recuperación clínicamente relevante. En el EAP, la recuperación clínicamente relevante de la MAVC se definió como la mejoría de “off-chart” a ver al menos 5 letras del optotipo ETDRS o la mejoría de al menos 10 letras del optotipo ETDRS si el paciente estaba “on-chart”. En pacientes con visión residual relevante, la estabilización es importante. En el EAP, la estabilización clínicamente relevante se definió de la siguiente forma: si el paciente tenía una MAVC < 1.0 logMAR en la visita basal (no había cruzado el umbral de ceguera legal) en alguno de los ojos, que se mantuviera por debajo de este límite en la última visita. Alcanzar uno u otro objetivo (o ambos), se puede considerar como un beneficio clínicamente relevante para los pacientes.

Estabilización clínicamente relevante

La pérdida visual en los pacientes no tratados es rápida (24). Más de un 70 % de los ojos progresan a MAVC > 1.0 logMAR en 3 meses. En consonancia con estos datos, sólo un 27.6 % de los pacientes tenía MAVC < 1.0 logMAR en la visita basal (realizada, de media, 4.6 meses desde el inicio de los síntomas). Aunque lo esperado sería que la mayoría de los pacientes siguiera progresando si no recibiera tratamiento, con la idebenona el 50 % de los pacientes mantuvo una MAVC por debajo del umbral de la ceguera tras un seguimiento medio de 24.3 meses. Comparado con la historia natural de la enfermedad, la idebenona iniciada precozmente proporciona una oportunidad para evitar la pérdida visual severa que experimenta la mayoría de los pacientes (78).

En la mayoría de los casos, el recorrido que siguen los pacientes desde que se inician los síntomas hasta que tienen el diagnóstico de LHON dura varias semanas o meses. Por tanto, ambos ojos suelen estar afectados en el momento del diagnóstico. En el EAP, sólo 3 de los 87 pacientes en los que se analizó la eficacia de la idebenona tenían un ojo asintomático al comenzar el tratamiento, y 2 de ellos se mantuvieron en este estadio en la última visita. Aunque los números son pequeños, esto contrasta con una serie de casos previa, donde los 6 pacientes que comenzaron idebenona con un ojo asintomático experimentaron pérdida visual subsiguiente en dicho ojo (44).

Recuperación clínicamente relevante

La pérdida visual en los pacientes con LHON suele ser permanente (8, 14, 23, 24). Sin embargo, en el EAP, casi uno de cada dos pacientes (46 %) tratados con idebenona experimentó recuperación clínicamente relevante tras un tratamiento que duró 9.48 meses de media. Esto es comparable a lo descrito en estudios previos. En una serie de casos que utilizó criterios similares para definir la recuperación visual (44), la tasa de respondedores fue del 45.5 %. En una pequeña cohorte de pacientes tratados con idebenona y vitamina B2 (79), la tasa de respondedores fue del 42.9 %. En estos dos estudios retrospectivos, se documentaron menores tasas de recuperación en el grupo control de pacientes no tratados: 32.2 % (44) y 28.6 % (79). Aunque en el EAP no hubo grupo control, un estudio retrospectivo que recogió una gran cantidad de casos no tratados usó los mismos criterios que el EAP para definir la recuperación clínicamente relevante (80). En este estudio, un 31.1 % de los pacientes experimentó una recuperación clínicamente relevante, en línea también con los otros dos estudios retrospectivos antes mencionados (44,79).

Tasa de recuperación en función de la duración del tratamiento

En el EAP, el tiempo desde el inicio del tratamiento hasta la observación inicial de recuperación clínicamente relevante osciló entre 2.5 y 26.5 meses. Estos datos proporcionan evidencia de que el beneficio terapéutico de la idebenona aumenta al prolongar el tratamiento. Así, en un 33 % de los pacientes respondedores, la recuperación visual clínicamente relevante se detectó más allá de los 12 meses iniciales de tratamiento, que fue el límite establecido en el consenso internacional (4), y algunos casos tardaron más de 24 meses en alcanzar esta recuperación.

8.1.3. Microvascularización retinocoroidea

8.1.3.1. Plexos vasculares retinianos

Nuestro estudio ha revelado cambios microvasculares significativos a lo largo de los diferentes estadios de la LHON. Hemos demostrado que existe una reducción general en la densidad vascular conforme la enfermedad progresa, pero que sigue diferentes patrones en las regiones macular y circumpapilar.

En las densidades vasculares medias, los cambios estadísticamente significativos se detectaron inicialmente en la mácula. Así, el plexo capilar superficial macular fue el único que mostró una reducción media significativa en el estadio asintomático de la enfermedad. En los sectores que representan el haz papilomacular (es decir, sector nasal en la región macular y sector temporal en la región circumpapilar), que, como ya se ha comentado, es la localización que se

afecta de manera preferencial en la LHON, los cambios también se detectaron en primer lugar en la mácula, en el plexo capilar superficial. Sin embargo, al hacerse sintomática la enfermedad y progresar, el sector temporal del plexo capilar radial peripapilar mostró la mayor magnitud de cambio. En consecuencia, en el estadio crónico, dicho sector acabó mostrando una afectación más severa que la encontrada en los sectores nasales de los plexos maculares. El plexo capilar profundo macular es el que mostró la menor magnitud de cambio.

Con respecto a la asociación entre las densidades vasculares de los plexos retinianos y la agudeza visual, nuestro estudio reveló que el plexo capilar superficial macular y, en mayor medida, el plexo capilar radial peripapilar, se correlacionan con la MAVC. La correlación entre dichas densidades vasculares y la MAVC logMAR fue negativa en todos los casos, lo que implica una peor visión a menor densidad vascular en estos plexos. No encontramos, sin embargo, asociación entre las densidades vasculares en el plexo capilar profundo y la agudeza visual.

Todos los parámetros estructurales retinianos (GCL+ macular, complejo de células ganglionares o GCL++ macular y RNFL peripapilar) mostraron una asociación con la agudeza visual. La correlación entre el grosor de las diferentes capas retinianas analizadas y la MAVC logMAR fue negativa y estadísticamente significativa en todos los casos, lo que implica peor visión cuando el grosor en estas capas disminuye.

En el análisis de correlación entre los plexos retinianos y las estructuras anatómicas relacionadas, encontramos asociaciones positivas estadísticamente significativas en todas las variables estudiadas. Las correlaciones más fuertes se dieron entre el plexo capilar radial peripapilar y la RNFL peripapilar, particularmente en el sector temporal. Hay que destacar que el plexo capilar superficial mostró una mejor correlación con GCL++ que con GCL+. Esto está en consonancia con el hecho de que el plexo capilar superficial está más estrechamente relacionado con GCL++, ya que ambos contienen la RNFL, mientras que GCL+ no contiene esta capa retiniana.

Las alteraciones microvasculares retinianas oftalmoscópicamente visibles en los estadios precoces de la LHON se describieron hace varias décadas (45, 46). Estas alteraciones consisten en capilares telangiectásicos circumpapilares, principalmente en el lado temporal, que se corresponde con el haz papilomacular (45, 46, 52). Más recientemente, un estudio *post mortem* de ojos de pacientes con LHON reveló la existencia de proliferación mitocondrial tanto en las células endoteliales como en las paredes de los vasos sanguíneos (47).

Desde la introducción de la OCTA en la práctica clínica, sólo un pequeño número de estudios ha descrito los cambios microvasculares en la LHON usando esta tecnología. En la región circumpapilar, los resultados que aparecen en la literatura con respecto al estadio asintomático de la enfermedad son conflictivos. Así, mientras que algunos casos aislados han descrito cambios cualitativos en ojos asintomáticos (54, 55), otro caso aislado (56) y una serie de casos que incluyó 12 ojos de 6 pacientes (57), no encontraron cambios en el estadio asintomático. Un estudio transversal evaluó de manera cuantitativa la región peripapilar en 22 pacientes varones con LHON en diferentes estadios (ninguno en estadio dinámico) y no encontró cambios significativos en las densidades vasculares entre los ojos con LHON en estadio asintomático y los controles (58). Sin embargo, se encontró una reducción progresiva en la densidad vascular en los estadios sintomáticos. Nuestro estudio, que no se ha limitado a pacientes varones, confirma estos hallazgos en la región peripapilar y añade datos maculares, que muestran un patrón diferente en esta región. Con respecto a la mácula, la literatura es incluso más escasa. Un estudio transversal evaluó esta región en 29 ojos de 15 pacientes con LHON, todos ellos en el estadio crónico de la enfermedad (59). Dicho estudio encontró que la densidad vascular estaba reducida en el plexo capilar superficial y en el plexo capilar profundo. Nuestro estudio corrobora estas observaciones y añade los hallazgos en todos los demás estadios de la enfermedad. Nuestro estudio también confirma que la agudeza visual se asocia con el plexo capilar superficial pero no con el plexo capilar profundo (59). Dado que nosotros también estudiamos la región circumpapilar, nuestro estudio avanza el campo de conocimiento al demostrar que las asociaciones más fuertes entre agudeza visual y plexos retinianos ocurren en el plexo capilar radial peripapilar. Además, nuestro estudio también añade que la densidad vascular en el plexo capilar superficial se correlaciona mejor con GCL++ que con GCL+, lo que puede explicarse por la relación anatómica más estrecha antes mencionada entre el plexo capilar superficial y GCL++. En contraste con nuestros resultados, Borrelli et al. (59) no encontraron asociaciones entre la agudeza visual y los parámetros estructurales retinianos. Una posible explicación es que su estudio sólo analizó ojos en el estadio crónico de LHON. Estos ojos habrían alcanzado, probablemente, el “efecto suelo” tanto en los grosores de GCL++ como de RNFL medidos por OCT. Borrelli et al. (59) encontraron asociaciones significativas entre la densidad vascular en el plexo capilar superficial y el grosor en GCL++ sólo en los sectores nasal e inferior. Nuestros resultados revelaron diferencias significativas en los cuatro sectores parafoveales y en la densidad vascular media, lo que puede explicarse por el mayor tamaño de nuestra muestra y la inclusión de todos los estadios de la LHON. Un caso aislado describió cambios cualitativos en los ojos de un paciente con LHON en estadio subagudo (60), lo que plantea la cuestión de si deberíamos dirigir la atención a la mácula. Un estudio investigó la densidad vascular retiniana

en las regiones macular y peripapilar de pacientes sintomáticos con neuropatías ópticas hereditarias usando SD-OCTA (81). Este estudio encontró una reducción progresiva en el plexo capilar superficial y en el sector temporal del plexo capilar radial peripapilar. En general, dicho estudio encontró correlaciones entre moderadas y fuertes entre el plexo capilar radial peripapilar y el grosor de RNFL, excepto en el sector temporal, y no encontró ninguna correlación entre la densidad vascular retiniana y los parámetros estructurales maculares, lo que está en desacuerdo con nuestros hallazgos. Estas discrepancias se pueden explicar por diferencias en el diseño del estudio: ellos incluyeron pacientes tanto con LHON como con neuropatía óptica autosómica recesiva y ningún ojo se encontraba en el estadio asintomático.

El haber estudiado simultáneamente y de manera cuantitativa la microvascularización retiniana tanto en la región macular como en la peripapilar en todos los estadios de la LHON nos ha permitido identificar diferentes patrones en ambas regiones e inferir cómo aparecen cronológicamente esos cambios y qué magnitud alcanzan. Así, hemos encontrado que los cambios microvasculares en la LHON aparecen antes en la mácula que en la región peripapilar. Sin embargo, en sectores que representan el haz papilomacular, la región peripapilar se acaba afectando más profundamente. Para dar una explicación a estos hallazgos sólo podemos especular. El hecho de que el daño estructural se detecta antes en la GCL+ macular que en la RNFL peripapilar se ha descrito en estudios previos (27, 58, 82) y corroborado en nuestro estudio. Esto sugiere que la pérdida de GCL+ y la reducción en la densidad vascular del plexo capilar superficial en la región macular pueden estar fisiopatológicamente relacionados. No se ha dilucidado si el flujo sanguíneo está reducido primariamente como efecto directo de la disfunción mitocondrial o si es consecuencia del daño neuronal. Los resultados de algunos estudios (47, 83) apoyan la primera posibilidad. Nosotros hipotetizamos que, una vez que la enfermedad se vuelve sintomática y progresa, hay una acumulación de mitocondrias defectuosas en los axones de las RGC. Las mitocondrias defectuosas aumentan en número como mecanismo de compensación en respuesta a la disfunción. Esto ocurre en una región anatómicamente limitada por las propiedades biomecánicas de la lámina cribosa. Como consecuencia, hay una cascada de efectos catastróficos, particularmente en los pequeños axones del haz papilomacular. Esto podría explicar el hecho de que el sector temporal de la región circumpapilar acabe mostrando la mayor reducción en la densidad vascular.

Aunque nuestro objetivo era evaluar las regiones macular y circumpapilar y no el centro del disco óptico, también hemos descrito la densidad vascular en este sector. A este respecto, encontramos que el examen cuidadoso y la corrección (necesaria en la mayoría de los casos)

de cada uno de los 320 B-scans de cada mapa de OCTA consume un tiempo excesivo para ser adoptado en la práctica clínica. El desarrollo de futuras versiones de software probablemente solventará ese problema. Por otro lado, el sector central del disco óptico contiene principalmente grandes vasos, que no se pueden excluir del análisis usando el software integrado, y se piensa que la LHON afecta a los pequeños vasos (45, 46, 59). Esto, junto con el hecho de que la densidad vascular en este sector no mostró una tendencia consistente a lo largo de los diferentes estadios de la enfermedad (no se afectó significativamente en los estadios subagudo ni crónico), nos hace considerar que la densidad vascular reducida de manera estadísticamente significativa en el estadio asintomático es un hallazgo sin relevancia clínica.

8.1.3.2. Cambios coroideos

Hemos evaluado la coriocapilar y el grosor retiniano en todos los estadios de la LHON mediante SS-OCT/OCTA considerando la posible influencia de la edad, la longitud axial, el efecto agudo del tabaco y los ritmos circadianos en los resultados.

Nuestro estudio ha demostrado que la coriocapilar se mantiene estable a lo largo de la enfermedad. Con respecto al grosor coroideo, se encontró una tendencia hacia valores disminuidos en el estadio asintomático y valores aumentados en los estadios sintomáticos. Sin embargo, pocos de estos cambios fueron estadísticamente significativos y, sorprendentemente, no tendieron a afectar a la media ni a los sectores correspondientes al haz papilomacular, que es la región que, fisiopatológicamente, se afecta de manera preferente en la LHON. Además, ni la coriocapilar ni el grosor coroideo se asociaron con la agudeza visual.

El primer estudio que evaluó el grosor coroideo en la LHON (65) encontró que este no se asociaba con la agudeza visual, en consonancia con nuestros resultados. Sin embargo, ellos encontraron un aumento del grosor coroideo en los estadios precoces de la enfermedad y disminuido en el estadio crónico. Estas diferencias con nuestros hallazgos se pueden explicar por diferencias en el diseño del estudio. Borrelli et al. (65) utilizaron SD-OCT, segmentación manual, midieron puntos en vez de áreas y, lo más importante, no midieron la longitud axial. En línea con nuestros resultados, Jiang et al. (68) observaron una tendencia hacia un grosor coroideo peripapilar aumentado en pacientes sintomáticos de LHON, que no fue significativo de media. Su estudio sólo incluyó pacientes con la mutación m.11778G>A y no analizó la región macular. Los dos estudios que han documentado el grosor coroideo en la LHON utilizando SS-OCT sólo incluyeron pacientes en estadio crónico y revelaron resultados conflictivos: mientras que

uno de ellos (66) reportó valores disminuidos, el otro (67) no encontró cambios significativos. En contraste con nuestro estudio, no consideraron los cambios diurnos ni la longitud axial.

Con respecto a los parámetros coroideos vasculares, la coriocapilar se ha estudiado en el estadio crónico de la LHON (59) y el índice coroideo vascular en pacientes con LHON sintomática (67, 68), sin que se hayan encontrado cambios significativos. Nuestro estudio confirma que la coriocapilar no se afecta en la LHON y añade a la literatura el análisis de la misma en todos los estadios de la enfermedad y la consideración de su posible asociación con la agudeza visual.

El patrón de cambios en el grosor coroideo observado en nuestro estudio es difícil de explicar. Considerando que los cambios retinianos ocurren principalmente en el haz papilomacular (71), es llamativo e inesperado que las diferencias estadísticamente significativas en el grosor coroideo aparezcan casi exclusivamente en áreas que no están topográficamente relacionadas con el haz papilomacular. Mientras que la naturaleza de estos cambios permanezca sin dilucidar, sólo podemos especular acerca de los posibles mecanismos subyacentes que conduzcan a un aumento del grosor coroideo en los pacientes sintomáticos de LHON. De manera similar a lo que se ha descrito en la enfermedad de Alzheimer (84), podría darse un aumento compensatorio en los vasos coroideos (en número o en diámetro). Esto podría ocurrir en respuesta a la hipoperfusión retiniana, que nuestro estudio ha demostrado que empeora conforme avanza la enfermedad. Como se ha observado en el cerebro de pacientes con enfermedad de Parkinson (85), podría haber un alto número de bandas de tejido conectivo con remanentes capilares colapsados, sin células endoteliales, asociado a la pérdida neuronal. También es posible que haya un incremento en el tejido fibrovascular, como se ha encontrado en el parkinsonismo vascular y propuesto en la enfermedad de Parkinson (86). La coroides también podría engrosarse como una adaptación al adelgazamiento de las capas retinianas. El compromiso de la microvascularización retiniana podría conducir a la expansión de las lagunas delimitadas por membranas que se ha propuesto que actúan como drenaje linfático, aunque su identificación en humanos es controvertida (62). Una contracción alterada de las células musculares lisas no vasculares podría causar engrosamiento coroideo. Sin embargo, esto parece improbable, puesto que estas células se localizan fundamentalmente detrás de la fovea. De hecho, el hallazgo de que el grosor coroideo en los pacientes con LHON no tienda a afectarse en los sectores correspondientes al haz papilomacular no apoya ninguna de las hipótesis previas. Además, la coroides es una estructura altamente variable, incluso en pacientes sanos emétopes de un mismo grupo de edad (49). Así, aunque, en nuestro estudio, controlamos la influencia de la edad, el sexo,

la longitud axial, el efecto agudo del tabaco y la variabilidad diurna, otros factores fisiológicos (como el grosor corneal o la tensión arterial sistólica) podrían haber influido en los resultados. Además, también se han encontrado resultados contradictorios en cuanto al grosor coroideo en otras enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer o el Parkinson. Por otro lado, la falta de asociación entre el grosor coroideo y la agudeza visual también apoya la hipótesis de que los cambios en el grosor coroideo observados en la LHON sean espurios.

8.2. Fortalezas

- El estudio REALITY proporciona una cohorte representativa de la población general de LHON sintomática en cuanto a la edad de debut y la distribución por sexos.
- El estudio EAP proporciona datos de seguridad y eficacia del tratamiento prolongado con idebenona en un amplio número de pacientes con LHON.
- Nuestro estudio es el primero que ha analizado los plexos retinianos simultáneamente en las regiones macular y peripapilar en todos los estadios de la LHON.
- Representa la mayor muestra de pacientes con LHON estudiados mediante OCTA.
- Es el primer estudio que ha utilizado SS-OCTA en la LHON.
- Es el primer estudio que ha evaluado la coriocapilar con OCTA en los estadios asintomático, subagudo y dinámico de la LHON, además del estadio crónico.
- Es el primer estudio que ha analizado el grosor coroideo en todos los estadios de la LHON utilizando SS-OCT.
- Es el primer estudio que ha descrito los hallazgos del análisis de correlación entre la vascularización coroidea y la agudeza visual.
- Es el primer estudio que ha considerado la posible influencia del efecto agudo del tabaco y los cambios diurnos en los parámetros cuantitativos de OCTA en la LHON.
- Es el primer estudio que ha considerado la posible influencia de la longitud axial en los parámetros coroideos.
- Las medidas de los parámetros retinocoroideos se obtuvieron utilizando un software de segmentación automática que ha demostrado una excelente repetibilidad y reproducibilidad (49)
- Los mapas de OCTA en la zona del disco óptico, para los que no existía un software comercializado específico, se revisaron cuidadosamente en cada uno de los 320-scan que componían cada mapa y se corrigió manualmente la segmentación de la membrana limitante interna en todos los casos necesarios.

8.3. Limitaciones

- EL estudio REALITY fue retrospectivo y los pacientes podían haber recibido algún tratamiento para la LHON.
- En el estudio EAP fue retrospectivo y no hubo grupo control.
- La microvascularización coriorretiniana se estudió de manera transversal. Sin embargo, dada la rareza de la enfermedad y que la mayoría de los pacientes asintomáticos permanecen en este estadio de por vida, observar la transición entre los estadios asintomático y subagudo es extremadamente difícil.
- El tamaño muestral de los grupos subagudo y dinámico estudiados mediante OCT/OCTA fue pequeño. Sin embargo, la escasez de pacientes identificados en estos estadios hace que su inclusión en un estudio sea particularmente difícil. Además, ninguno de los estudios previos ha analizado cuantitativamente los plexos retinianos en el estadio subagudo ni la coriocapilar en un estadio diferente al crónico y nuestro estudio representa la mayor muestra de pacientes con LHON estudiados mediante OCTA.

8.4. Aplicaciones/perspectivas futuras

- Los resultados del EAP indican que, en los pacientes con LHON que llevan hasta 1 año de evolución desde el inicio de los síntomas en el segundo ojo, el tratamiento con idebenona debería mantenerse, al menos, durante 24 meses. Estos hallazgos podrían sugerir la celebración de un segundo consenso internacional para revalorar la duración mínima del tratamiento con idebenona en estos pacientes.
- Se ha llevado a cabo el ensayo clínico LEROS, que ha estudiado la seguridad y eficacia a largo plazo del tratamiento con idebenona en pacientes de hasta 5 años de evolución desde el inicio de los síntomas. Los resultados de dicho estudio aún no han sido publicados.
- Los hallazgos del análisis cuantitativo de los plexos retinianos en la LHON contribuyen a un mejor conocimiento de la historia natural y la fisiopatología de la enfermedad. Esto podría ser útil para explorar nuevas vías terapéuticas dirigidas a mejorar la microvascularización retiniana.
- Son necesarios más estudios, particularmente de diseño longitudinal, para corroborar y contribuir a dilucidar nuestros hallazgos. Por otro lado, sólo estudios histopatológicos pueden revelar el estado real de la coroides en pacientes con LHON.
- Si se confirma en futuros estudios, las densidades vasculares retinianas podrían servir como potenciales biomarcadores de la LHON para monitorizar la progresión de la enfermedad, la eficacia de los abordajes terapéuticos y, quizá, ayudar a identificar a pacientes en riesgo de conversión.

9. CONCLUSIONES

1. En los pacientes con neuropatía óptica hereditaria de Leber con alguna de las tres mutaciones más frecuentes que inician la pérdida visual en la edad adulta, los peores resultados visuales corresponden a aquellos con la mutación m.11778G>A.
2. En los pacientes con neuropatía óptica hereditaria de Leber que llevan hasta un año de evolución desde el inicio de los síntomas en el segundo ojo, el tratamiento con idebenona durante más tiempo del estipulado en el consenso internacional de 2016 consigue mayores tasas de recuperación visual clínicamente relevante.
3. El tratamiento prolongado con idebenona en los pacientes con neuropatía óptica hereditaria de Leber es bien tolerado y muestra un alto perfil de seguridad.
4. En la neuropatía óptica hereditaria de Leber, hay una reducción general en la densidad vascular de los plexos retinianos conforme la enfermedad progresa, más marcada en los plexos capilar superficial macular y capilar radial peripapilar que en el plexo capilar profundo macular.
5. En la neuropatía óptica hereditaria de Leber, los cambios microvasculares retinianos en los sectores que representan el haz papilomacular aparecen antes en la mácula pero acaban siendo más profundos en la región circumpapilar.
6. En la neuropatía óptica hereditaria de Leber, se observa menor densidad vascular en los plexos capilar superficial macular y capilar radial peripapilar a menor agudeza visual.
7. En la neuropatía óptica hereditaria de Leber, se observa menor densidad vascular en los plexos capilar superficial macular y capilar radial peripapilar a menor grosor en las estructuras anatómicas relacionadas (capa de células ganglionares-plexiforme interna/complejo de células ganglionares y capa de fibras nerviosas retinianas respectivamente).
8. En la neuropatía óptica hereditaria de Leber, las densidades vasculares en los plexos retinianos se correlacionan más fuertemente con la agudeza visual y con parámetros estructurales en la región circumpapilar que en la macular.
9. En la neuropatía óptica hereditaria de Leber, la coriocapilar se mantiene estable a lo largo de la enfermedad.
10. En la neuropatía óptica hereditaria de Leber, el grosor coroideo no tiende a afectarse significativamente de media ni en los sectores correspondientes al haz papilomacular.
11. Ni la densidad vascular coriocapilar ni el grosor coroideo se correlacionan con la agudeza visual en la neuropatía óptica hereditaria de Leber.
12. La vascularización coroidea no parece jugar un papel en la fisiopatología de la neuropatía óptica hereditaria de Leber.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Von Graefe A. Exceptionelles verrhalten des Gesichtsfeldes bei pigmentenartung der Netzhaut. *Albrecht Von Graefes Arch Ophthalmol*. 1858;4(6):250-3.
2. Leber T. Ueber hereditäre und congenital-angelegte Sehnervenleiden. *Albrecht Von Graefes Arch Ophthalmol* [Internet]. Septiembre de 1871 [citado 14 de marzo de 2023];17(2):249-91. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01694557>
3. Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AMS, et al. Mitochondrial DNA Mutation Associated with Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Science* [Internet]. 9 de diciembre de 1988 [citado 14 de marzo de 2023];242(4884):1427-30. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.3201231>
4. Carelli V, Carbonelli M, De Coi IF, Kawasaki A, Klopstock T, Lagrèze WA, et al. International consensus statement on the clinical and therapeutic management of Leber hereditary optic neuropathy. *J Neuroophthalmol* [Internet]. Diciembre de 2017 [citado 14 de marzo de 2023];37(4):371-81. Disponible en: <https://doi.org/10.1097/wno.0000000000000570>
5. Bahr T, Welburn K, Donnelly J, Bai Y. Emerging model systems and treatment approaches for Leber's hereditary optic neuropathy: Challenges and opportunities. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* [Internet]. 1 de junio de 2020 [citado 14 de marzo de 2023];1866(6):165743. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165743>
6. Stenton SL, Sheremet NL, Catarino CB, Andreeva NA, Assouline Z, Barboni P, et al. Impaired complex I repair causes recessive Leber's hereditary optic neuropathy. *J Clin Invest* [Internet]. 19 de enero de 2021 [citado 14 de marzo de 2023];131(6):e138267. Disponible en: <https://doi.org/10.1172/jci138267>

7. Spiegel SJ, Sadun AA. Solutions to a Radical Problem: Overview of Current and Future Treatment Strategies in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 30 de octubre de 2022 [citado 14 de marzo de 2023];23(21):13205. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms232113205>
8. Newman NJ, Yu-Wai-Man P, Biousse V, Carelli V. Understanding the molecular basis and pathogenesis of hereditary optic neuropathies: towards improved diagnosis and management. *Lancet Neurol* [Internet]. 22 de septiembre de 2022 [citado 14 de marzo de 2023];22(2):172-8. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(22\)00174-0](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(22)00174-0)
9. Man PYW, Griffiths PG, Brown DT, Howell N, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *Am J Hum Genet* [Internet]. Febrero de 2003 [citado 15 de marzo de 2023];72(2):333-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1086/346066>
10. Spruijt L, Kolbach DN, De Coo RF, Plomp AS, Bauer NJ, Smeets HJ, et al. Influence of mutation type on clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 30 de diciembre de 2005 [citado 15 de marzo de 2023];141(4):676-82. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2005.11.007>
11. Puomila A, Hämäläinen P, Kivioja S, Savontaus ML, Koivumäki S, Huoponen K, et al. Epidemiology and penetrance of Leber hereditary optic neuropathy in Finland. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 4 de abril de 2007 [citado 15 de marzo de 2023];15(10):1079-89. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201828>
12. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Hudson G, Chinnery PF. Inherited mitochondrial optic neuropathies. *J Med Genet* [Internet]. 1 de marzo de 2009 [citado 15 de marzo de 2023];46(3):145-58. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2007.054270>. Fe de erratas en *J Med Genet* [Internet]. 25 de marzo de 2011 [citado 15 de marzo de 2023];48:284. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2007.054270corr1>
13. Sahel JA, Newman NJ, Yu-Wai-Man P, Vignal-Clermont C, Carelli V, Biousse V, et al. Gene Therapies for the Treatment of Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Int Ophthalmol Clin* [Internet]. 1 de octubre de 2021 [citado 10 de abril de 2023];61(4):195-208. Disponible en: <https://doi.org/10.1097/iao.0000000000000364>
14. Fraser JA, Biousse V, Newman NJ. The neuro-ophthalmology of mitochondrial disease. *Surv Ophthalmol* [Internet]. 14 de mayo de 2010 [citado 10 de abril de 2023];55(4):299-334. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2009.10.002>
15. Gerber S, Ding MG, Gérard X, Zwicker K, Zanlonghi X, Rio M, et al. Compound heterozygosity for severe and hypomorphic NDUFS2 mutations cause non-syndromic LHON-like optic neuropathy. *J Med Genet* [Internet]. 24 de abril de 2017 [citado 10 de abril de 2023];54(5):346-56. Disponible en: <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-104212>
16. Stenton SL, Tesarova M, Sheremet NL, Catarino CB, Carelli V, Ciara E, et al. DNAJC30 defect: A frequent cause of recessive Leber hereditary optic neuropathy and Leigh syndrome. *Brain* [Internet]. 11 de febrero de 2022 [citado 10 de abril de 2023];145(5):1624-31. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/brain/awac052>
17. Mansukhani SA, Mehta DG, Renaud DL, Whealy MA, Chen JJ, Bhatti MT. Nuclear DNA Mutation Causing a Phenotypic Leber Hereditary Optic Neuropathy Plus. *Ophthalmology* [Internet]. 8 de septiembre de 2020 [citado 10 de abril de 2023];128(4):628-31. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2020.09.011>
18. Yu-Wai-Man P, Chinnery PF. Leber Hereditary Optic Neuropathy. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 26 de octubre de 2000 [actualizado 11 de marzo de 2011] [citado 10 de abril de 2023];1993-2023. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1174/>
19. Caporali L, Iommarini L, La Morgia C, Olivieri A, Achilli A, Maresca A, et al. Peculiar combinations of individually non-pathogenic missense mitochondrial DNA variants cause low penetrance Leber's hereditary optic neuropathy. *PLoS Genet* [Internet]. 14 de febrero de 2018 [citado 10 de abril de 2023];14(2). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007210>
20. Pisano A, Preziuso C, Iommarini L, Perli E, Grazioli P, Campese AF, et al. Targeting estrogen receptor β as preventive therapeutic strategy for Leber's hereditary optic neuropathy. *Hum Mol Genet* [Internet]. 26 de septiembre de 2015 [citado 10 de abril de 2023];24(24):6921-31. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv396>
21. Zhang J, Ji Y, Lu Y, Fu R, Xu M, Liu X, et al. Leber's hereditary optic neuropathy (LHON)-associated ND5 12338T > C mutation altered the assembly and function of complex I, apoptosis and mitophagy. *Hum Mol Genet* [Internet]. 22 de marzo de 2018 [citado 10 de abril de 2023];27(11):1999-2011. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy107>
22. Hwang TJ, Karanjia R, Moraes-Filho MN, Gale J, Tran JS, Chu ER, et al. Natural History of Conversion of Leber's Hereditary Optic Neuropathy: A Prospective Case Series. *Ophthalmology* [Internet]. 10 de febrero de 2017 [citado 10 de abril de 2023];124(6):843-50. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.01.002>
23. Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. Enero de 2004 [citado 10 de abril de 2023];23(1):53-89. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2003.10.003>
24. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Chinnery PF. Mitochondrial optic neuropathies - disease mechanisms and therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. Marzo de 2011 [citado 10 de abril de 2023];30(2):81-114. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2010.11.002>

25. Savini G, Barboni P, Valentino ML, Montagna P, Cortelli P, De Negri AM, et al. Retinal nerve fiber layer evaluation by optical coherence tomography in unaffected carriers with Leber's hereditary optic neuropathy mutations. *Ophthalmology* [Internet]. 6 de diciembre de 2004 [citado 10 de abril de 2023];112(1):127-31. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2004.09.033>
26. Barboni P, Carbonelli M, Savini G, Ramos C do VF, Carta A, Berezovsky A, et al. Natural History of Leber's Hereditary Optic Neuropathy: Longitudinal Analysis of the Retinal Nerve Fiber Layer by Optical Coherence Tomography. *Ophthalmology* [Internet]. 24 de diciembre de 2009 [citado 10 de abril de 2023];117(3):623-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2009.07.026>
27. Balducci N, Savini G, Cascavilla ML, La Morgia C, Triolo G, Giglio R, et al. Macular nerve fibre and ganglion cell layer changes in acute Leber's hereditary optic neuropathy. *Br J Ophthalmol* [Internet]. 17 de agosto de 2016 [citado 10 de abril de 2023];100(9):1232-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2015-307326>
28. Carper MG, Henderson AD. Updated Review of Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Curr Treat Options Neurol* [Internet]. 1 de julio de 2022 [citado 10 de abril de 2023];24:441-52. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11940-022-00729-0>
29. Pfeffer G, Ailbhe Burke F, Patrick Yu-Wai-Man Mbbc, Alastair S Compston FrcoD, Patrick Chinnery FmF. Clinical features of MS associated with Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations. *Neurology* [Internet]. 6 de noviembre de 2013 [citado 10 de abril de 2023];81:2073-3081. Disponible en: <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000437308.22603.43>
30. Kogachi K, Ter-Zakarian A, Asanad S, Sadun A, Karanjia R. Toxic medications in Leber's hereditary optic neuropathy. *Mitochondrion* [Internet]. Mayo de 2019 [citado 10 de abril de 2023];46:270-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.07.007>
31. Chen BS, Yu-Wai-Man P, Newman NJ. Developments in the Treatment of Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* [Internet]. 21 de noviembre de 2022 [citado 10 de abril de 2023];22:881-92. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11910-022-01246-y>
32. Nevinitina T, Sheremet N, Andreeva N, Zhorzholadze N, Ronzina I, Lyamzaev K, et al. Effect of ophthalmic mitochondrial reactive oxygen species scavenger Visomitin® on visual acuity of patients diagnosed with Leber hereditary optic neuropathy: findings of an observational clinical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. Junio de 2022 [citado 10 de abril de 2023];63(7):4070-F0034. Disponible en: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2781883>
33. Sadun AA, Chicani CF, Ross-Cisneros FN, Barboni P, Thoolen M, Shrader WD, et al. Effect of EPI-743 on the clinical course of the mitochondrial disease Leber hereditary optic neuropathy. *Arch Neurol* [Internet]. Marzo de 2012 [citado 13 de abril de 2023];69(3):331-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.2972>
34. Calkins DJ, Yu-Wai-Man P, Newman NJ, Taiel M, Singh P, Chalmeley C, et al. Biodistribution of intravitreal lenadogene nolparavec gene therapy in nonhuman primates. *Mol Ther Methods Clin Dev* [Internet]. 10 de diciembre de 2021 [citado 13 de abril de 2023];23:307-18. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.09.013>
35. Newman NJ, Yu-Wai-Man P, Subramanian PS, Moster ML, Wang AG, Donahue SP, et al. Randomized trial of bilateral gene therapy injection for m.11778G>A MT-ND4 Leber optic neuropathy. *Brain* [Internet]. 9 de noviembre de 2022 [citado 13 de abril de 2023];awac421. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/brain/awac421>
36. Yu-Wai-Man P, Newman NJ, Carelli V, Moster ML, Biousse V, Sadun AA, et al. Bilateral visual improvement with unilateral gene therapy injection for Leber hereditary optic neuropathy. *Sci Transl Med* [Internet]. 9 de diciembre de 2020 [citado 13 de abril de 2023];12(573):eaaz7423. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaz7423>
37. Newman NJ, Yu-Wai-Man P, Carelli V, Moster ML, Biousse V, Vignal-Clermont C, et al. Efficacy and Safety of Intravitreal Gene Therapy for Leber Hereditary Optic Neuropathy Treated within 6 Months of Disease Onset. *Ophthalmology* [Internet]. 12 de enero de 2021 [citado 13 de abril de 2023];128(5):649-60. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2020.12.012>
38. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* [Internet]. 25 de agosto de 2006 [citado 11 de abril de 2023];126(4):663-76. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
39. Harvey JP, Sladen PE, Yu-Wai-Man P, Cheetham ME. Induced Pluripotent Stem Cells for Inherited Optic Neuropathies - Disease Modeling and Therapeutic Development. *J Neuroophthalmol* [Internet]. Marzo de 2022 [citado 11 de abril de 2023];42(1):35-44. Disponible en: <https://doi.org/10.1097/wno.0000000000001375>
40. Giordano C, Montopoli M, Perli E, Orlandi M, Fantin M, Ross-Cisneros FN, et al. Oestrogens ameliorate mitochondrial dysfunction in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* [Internet]. 13 de octubre de 2010 [citado 11 de abril de 2023];134(1):220-34. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/brain/awq276>. Fe de erratas en: *Brain* [Internet]. Enero de 2011 [citado 11 de abril de 2023];134(1):1-3. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/brain/awq276>
41. Asanad S, Meer E, Tian JJ, Fantini M, Nassisi M, Sadun AA. Leber's hereditary optic neuropathy: Severe vascular pathology in a severe primary mutation. *Intractable Rare Dis Res* [Internet]. Febrero de 2019 [citado 11 de abril de 2023];8(1):52-5. Disponible en: <https://doi.org/10.5582/irdr.2018.01126>
42. Klopstock T, Yu-Wai-Man P, Dimitriadis K, Rouleau J, Heck S, Bailie M, et al. A randomized placebo-controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* [Internet]. 23 de julio de 2011 [citado 11 de abril de 2023];134(9):2677-86. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/brain/awr170>

43. Klopstock T, Metz G, Yu-Wai-Man P, Büchner B, Gallenmüller C, Bailie M, et al. Persistence of the treatment effect of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* [Internet]. 6 de febrero de 2013 [citado 11 de abril de 2023];136(2):e230. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/brain/aws279>
44. Carelli V, Morgia C La, Valentino ML, Rizzo G, Carbonelli M, De Negri AM, et al. Idebenone treatment in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* [Internet]. 2 de agosto de 2011 [citado 11 de abril de 2023];134(9):e188. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/brain/awr180>
45. Nikoskelainen E, Hoyt WF, Nummelin K. Ophthalmoscopic findings in Leber's hereditary optic neuropathy. I. Fundus findings in asymptomatic family members. *Arch Ophthalmol* [Internet]. Octubre de 1982 [citado 11 de abril de 2023];100(10):1597-602. Disponible en: <https://doi.org/10.1001/archopht.1982.01030040575003>
46. Nikoskelainen E, Hoyt WF, Nummelin K. Ophthalmoscopic findings in Leber's hereditary optic neuropathy. II. The fundus findings in the affected family members. *Arch Ophthalmol* [Internet]. Julio de 1983 [citado 11 de abril de 2023];101(7):1059-68. Disponible en: <https://doi.org/10.1001/archopht.1983.01040020061011>
47. Carelli V, La Morgia C, Valentino ML, Barboni P, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Retinal ganglion cell neurodegeneration in mitochondrial inherited disorders. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. Mayo de 2009 [citado 11 de abril de 2023];1787(5):518-28. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2009.02.024>
48. Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, et al. Optical coherence tomography. *Science* [Internet]. 22 de noviembre de 1991 [citado 12 de abril de 2023];254(5035):1178-81. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.1957169>
49. Láins I, Wang JC, Cui Y, Katz R, Vingopoulos F, Staurengi G, et al. Retinal applications of swept source optical coherence tomography (OCT) and optical coherence tomography angiography (OCTA). *Prog Retin Eye Res* [Internet]. Septiembre de 2021 [citado 12 de abril de 2023];84:100951. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.100951>
50. Spaide RF, Fujimoto JG, Waheed NK, Sadda SR, Staurengi G. Optical coherence tomography angiography. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. Mayo de 2018 [citado 12 de abril de 2023];64:1-55. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.11.003>
51. Campbell JP, Zhang M, Hwang TS, Bailey ST, Wilson DJ, Jia Y, et al. Detailed Vascular Anatomy of the Human Retina by Projection-Resolved Optical Coherence Tomography Angiography. *Sci Rep* [Internet]. 10 de febrero de 2017 [citado 12 de abril de 2023];7:42201. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/srep42201>
52. Sadun F, De Negri AM, Carelli V, Salomao SR, Berezovsky A, Andrade R, et al. Ophthalmologic findings in a large pedigree of 11778/Haplogroup J Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Ophthalmol* [Internet]. Febrero de 2004 [citado 12 de abril de 2023];137(2):271-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2003.08.010>
53. De Rojas JO, Rasool N, Chen RW, Horowitz J, Odel JG. Optical coherence tomography angiography in Leber hereditary optic neuropathy. *Neurology* [Internet]. 7 de noviembre de 2016 [citado 12 de abril de 2023];87(19):2065-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003313>
54. Gaier ED, Gittinger JW, Cestari DM, Miller JB. Peripapillary Capillary Dilation in Leber Hereditary Optic Neuropathy Revealed by Optical Coherence Tomographic Angiography. *JAMA Ophthalmol* [Internet]. 1 de noviembre de 2016 [citado 12 de abril de 2023];134(11):1932-4. Disponible en: <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2016.3593>
55. Takayama K, Ito Y, Kaneko H, Kataoka K, Ra E, Terasaki H. Optical coherence tomography angiography in Leber hereditary optic neuropathy. *Acta Ophthalmol* [Internet]. 24 de octubre de 2016 [citado 12 de abril de 2023];95(4):e344-5. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/aos.13244>
56. Matsuzaki M, Hiram Y, Uyama H, Kurimoto Y. Optical coherence tomography angiography changes in radial peripapillary capillaries in Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Ophthalmol Case Rep* [Internet]. Marzo de 2018 [citado 12 de abril de 2023];9:51-5. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ajoc.2018.01.003>
57. Kousal B, Kolarova H, Meliska M, Bydzovsky J, Diblik P, Kulhanek J, et al. Peripapillary microcirculation in Leber hereditary optic neuropathy. *Acta Ophthalmol* [Internet]. 26 de septiembre de 2018 [citado 12 de abril de 2023];97(1):e71-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/aos.13817>
58. Balducci N, Cascavilla ML, Ciardella A, La Morgia C, Triolo G, Parisi V, et al. Peripapillary vessel density changes in Leber's hereditary optic neuropathy: a new biomarker. *Clin Exp Ophthalmol* [Internet]. 22 de mayo de 2018 [citado 12 de abril de 2023];46(9):1055-62. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/ceo.13326>
59. Borrelli E, Balasubramanian S, Triolo G, Barboni P, Sadda SVR, Sadun AA. Topographic Macular Microvascular Changes and Correlation With Visual Loss in Chronic Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 6 de junio de 2018 [citado 12 de abril de 2023];192:1932-4. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2018.05.029>
60. Asanad S, Meer E, Fantini M, Borrelli E, Sadun AA. Leber's hereditary optic neuropathy: Shifting our attention to the macula. *Am J Ophthalmol Case Rep* [Internet]. Marzo de 2019 [citado 12 de abril de 2023];13:13-5. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ajoc.2018.11.010>
61. Yu J, Xu H, Huang Y, Gu R, Zong Y, Zhu H, et al. Changes in retinal perfusion in Leber's hereditary optic neuropathy: An optical coherence tomography-angiography study. *Ophthalmic Res* [Internet]. Septiembre de 2021 [citado 12 de abril de 2023];64(5):863-70. Disponible en: <https://doi.org/10.1159/000518185>
62. Nickla DL, Wallman J. The multifunctional choroid. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. Marzo de 2010 [citado 12 de abril de 2023];29(2):144-68. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2009.12.002>

63. Brinks J, van Dijk EHC, Klaassen I, Schlingemann RO, Kielbasa SM, Emri E, et al. Exploring the choroidal vascular labyrinth and its molecular and structural roles in health and disease. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. Marzo de 2022 [citado 12 de abril de 2023];87:1000994. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.100994>
64. Spaide RF, Koizumi H, Pozonni MC. Enhanced depth imaging spectral-domain optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 27 de julio de 2008 [citado 12 de abril de 2023];146(4):496-500. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2008.05.032>
65. Borrelli E, Triolo G, Cascavilla ML, La Morgia C, Rizzo G, Savini G, et al. Changes in Choroidal Thickness follow the RNFL Changes in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Sci Rep* [Internet]. 17 de noviembre de 2016 [citado 12 de abril de 2023];6:37332. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/srep37332>
66. Darvizeh F, Asanad S, Falavarjani KG, Wu J, Tian JJ, Bandello F, et al. Choroidal thickness and the retinal ganglion cell complex in chronic Leber's hereditary optic neuropathy: a prospective study using swept-source optical coherence tomography. *Eye* [Internet]. 5 de diciembre de 2019 [citado 12 de abril de 2023];34:1624-30. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41433-019-0695-5>
67. Battista M, Cascavilla ML, Borrelli E, Barresi C, Lari G, Caporali L, et al. Choroidal vascularity index in hereditary optic neuropathies. *Eye* [Internet]. Epub 7 de febrero de 2023 [citado 12 de abril de 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41433-023-02383-5>
68. Jiang J, Sun G, Miao Q, Li B, Wang D, Yuan J, et al. Observation of Peripapillary Choroidal Vascularity in Natural Disease Course and After Gene Therapy for Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Front Med (Lausanne)* [Internet]. 7 de diciembre de 2021 [citado 12 de abril de 2023];8. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.770069>
69. Newman NJ. Hereditary Optic Neuropathies: From the Mitochondria to the Optic Nerve. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 6 de junio de 2005 [citado 12 de abril de 2023];140(3):517.e1-517.e9. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2005.03.017>
70. Newman NJ, Biousse V. Hereditary optic neuropathies. *Eye* [Internet]. 8 de noviembre de 2004 [citado 12 de abril de 2023];18(11):1144-60. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6701591>
71. Yu-Wai-Man P, Votruba M, Burté F, La Morgia C, Barboni P, Carelli V. A neurodegenerative perspective on mitochondrial optic neuropathies. *Acta Neuropathol* [Internet]. 30 de septiembre de 2016 [citado 12 de abril de 2023];132(6):789-806. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1625-2>
72. Newman NJ, Lott MT, Wallace DC. The clinical characteristics of pedigrees of Leber's hereditary optic neuropathy with the 11778 mutation. *Am J Ophthalmol* [Internet]. Junio de 1991 [citado 12 de abril de 2023];111(6):750-62. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(14\)76784-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(14)76784-4)
73. Newman NJ, Carelli V, Tabei M, Yu-Wai-Man P. Visual Outcomes in Leber Hereditary Optic Neuropathy Patients With the m.11778G>A (MTND4) Mitochondrial DNA Mutation. *J Neuroophthalmol* [Internet]. Diciembre de 2020 [citado 12 de abril de 2023];40(4):547-57. Disponible en: <https://doi.org/10.1097/wno.0000000000001045>
74. Hotta Y, Fujiki K, Hayakawa M, Nakajima A, Kanai A, Mashima Y, et al. Clinical features of Japanese Leber's hereditary optic neuropathy with 11778 mutation of mitochondrial DNA. *Jpn J Ophthalmol*. 1995;39(1):96-108.
75. Riordan-Eva P, Sanders MD, Govan GG, Sweeney MG, Costa JD, Harding AE. The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation. *Brain* [Internet]. 1 de abril de 1995 [citado 12 de abril de 2023];118(2):319-37. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/brain/118.2.319>
76. Majander A, Bowman R, Poulton J, Antcliff RJ, Reddy MA, Michaelides M, et al. Childhood-onset Leber hereditary optic neuropathy. *Br J Ophthalmol* [Internet]. Epub 17 de marzo de 2017 [citado 12 de abril de 2023];101(11):1505-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2016-310072>
77. Nikoskelainen EK, Huoponen K, Juvonen V, Lamminen T, Nummelin K, Savontaus ML. Ophthalmologic findings in Leber hereditary optic neuropathy, with special reference to mtDNA mutations. *Ophthalmology* [Internet]. Marzo 1996 [citado 12 de abril de 2023];103(3):504-14. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(96\)30665-9](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(96)30665-9)
78. Newman NJ, Biousse V, Newman SA, Bhatti MT, Hamilton SR, Farris BK, et al. Progression of Visual Field Defects in Leber Hereditary Optic Neuropathy: Experience of the LHON Treatment Trial. *Am J Ophthalmol*. 6 de febrero de 2006 [citado 12 de abril de 2023];141(6):1061-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2005.12.045>
79. Mashima Y, Kigasawa K, Wakakura M, Oguchi Y. Do idebenone and vitamin therapy shorten the time to achieve visual recovery in Leber hereditary optic neuropathy? *J Neuroophthalmol* [Internet]. Septiembre de 2000 [citado 12 de abril de 2023];20(3):166-70. Disponible en: <https://doi.org/10.1097/00041327-200020030-00006>
80. Silva M, Llòria X, Catarino C, Klopstock T. Natural history findings from a large cohort of patients with Leber's hereditary optic neuropathy (LHON): New insights into the natural disease-course. *Acta Ophthalmol* [Internet]. 12 de diciembre de 2018 [citado 12 de abril de 2023];96(S261):117. Disponible en: https://doi.org/10.1111/aos.13972_438
81. Sheremet NL, Shmelkova MS, Andreeva NA, Zhorzholadze N V., Fomin A V., Krylova TD, et al. Characteristics of changes in retinal and optic nerve microvascularisation in Leber hereditary optic neuropathy patients seen with optical coherence tomography angiography. *Vestn Oftalmol* [Internet]. 2020 [citado 12 de abril de 2023];136(4):171-82. Disponible en: <https://doi.org/10.17116/oftalma2020136042171>

82. Akiyama H, Kashima T, Li D, Shimoda Y, Mukai R, Kishi S. Retinal ganglion cell analysis in Leber's hereditary optic neuropathy. *Ophthalmology* [Internet]. Septiembre de 2013 [citado 12 de abril de 2023];120(9):1943-4.e5. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.05.031>
83. Chiong M, Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, Mondaca-Ruff D, Morales PE, García-Miguel M, et al. Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 15 de diciembre de 2014 [citado 12 de abril de 2023];2:72. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00072>
84. Asanad S, Ross-Cisneros FN, Barron E, Nassisi M, Sultan W, Karanjia R, et al. The retinal choroid as an oculo-vascular biomarker for Alzheimer's dementia: A histopathological study in severe disease. *Alzheimers Dement (Amst)* [Internet]. 1 de diciembre de 2019 [citado 12 de abril de 2023];11:775-83. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2019.08.005>
85. Paul G, Elabi OF. Microvascular Changes in Parkinson's Disease- Focus on the Neurovascular Unit. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 10 de marzo de 2022 [citado 12 de abril de 2023];14:853372. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.853372>
86. Garcia-Martin E, Pablo LE, Bambo MP, Alarcia R, Polo V, Larrosa JM, et al. Comparison of peripapillary choroidal thickness between healthy subjects and patients with Parkinson's disease. *PLoS One* [Internet]. 16 de mayo de 2017 [citado 12 de abril de 2023];12(5):e0177163. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177163>

