



TESIS DOCTORAL

**IMPLEMENTACIÓN DE TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS ALGORITMOS DIAGNÓSTICOS Y BIOINFORMÁTICOS EN DISTROFIAS HEREDITARIAS DE RETINA**

**DOCTORANDA:** NEREIDA INÉS BRAVO GIL

**DIRECTOR:** GUILLERMO ANTIÑOLO GIL

**DEPARTAMENTO:** CIRUGÍA, UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**PROGRAMA DE DOCTORADO:** BIOLOGÍA MOLECULAR, BIOMEDICINA E INVESTIGACIÓN CLÍNICA



---

# ÍNDICE

---



## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 La visión.....	3
1.1.1 El globo ocular.....	3
1.1.2 La retina.....	4
1.1.3 Fisiología visual .....	6
1.1.3.1 Los fotorreceptores.....	6
1.1.3.2 Fototransducción y ciclo visual.....	9
1.2 Distrofias hereditarias de retina.....	13
1.2.1 Clasificación.....	13
1.2.1.1 Formas periféricas.....	14
1.2.1.2 Formas centrales .....	17
1.2.1.3 Formas mixtas .....	20
1.2.1.4 Formas sindrómicas.....	22
1.2.2 Heterogeneidad clínica y genética.....	24
1.2.3 Genes asociados a DHR.....	26
1.2.4 Aproximaciones para la identificación de nuevos genes candidatos.....	28
1.2.5 Terapias y tratamientos.....	31
1.3 Secuenciación de Nueva Generación .....	34
1.3.1 Principales plataformas basadas en la NGS.....	34
1.3.2 Aplicaciones de la NGS.....	37
1.3.3 Desarrollo de nuevas tecnologías: Secuenciación de lecturas largas.....	40
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
2.1 Hipótesis.....	45
2.2 Objetivos .....	46
<b>3. ESTUDIOS REALIZADOS</b> .....	<b>47</b>
3.1 Artículo I: Nuevas mutaciones en <i>RP1</i> y una variante recurrente en <i>BBS1</i> explican la coexistencia de dos distrofias de retina distintas en la misma familia. ....	49
3.2 Artículo II: La re-evaluación de una familia pone en duda la patogenicidad de la mutación p.Cys759Phe de <i>USH2A</i> en homocigosis. ....	65
3.3 Artículo III: Mejora en el manejo de las distrofias hereditarias de retina mediante la secuenciación dirigida de un panel de genes específico de población.....	77
3.4 Artículo IV: Desentrañando las bases genéticas de los casos aislados de retinosis pigmentaria: un estudio a gran escala.....	93
3.5 Artículo V: Identificación de <i>SYNE2</i> como un nuevo gen candidato asociado a retinosis pigmentaria autosómica recesiva.....	117
<b>4. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>139</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>151</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>155</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>173</b>
7.1 ANEXO I .....	175
7.2 ANEXO II.....	183
7.3 ANEXO III .....	187



---

# ABREVIATURAS

---





---

ABDs	<i>Actin-binding domains</i> , dominios de unión a actina
ACHM	Acromatopsia
ACL	Amaurosis congénita de Leber
AD	Autosómico dominante
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN codificante
AFG	Angiografía fluoresceínica
APEX	<i>Arrayed primer extension</i>
AR	Autosómico recesivo
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AVC	Alteraciones en la visión de los colores
A2E	N-retinilideno-N-retinil-etanolamina
A2PE	N-retinilideno-N-retinil-fosfatidiletanolamina
BWA	<i>Burrows-Wheeler Aligner</i>
Cas9	Caspasa 9
ChIP-seq	<i>chromatin immunoprecipitation sequencing</i>
CHM	Coroideremia
CNCE	Ceguera nocturna congénita estacionaria
CNVs	<i>Copy number variations</i> , Variaciones en el número de copias
cpf18	<i>Cone photoreceptor function loss 8</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> , Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas
CSVS	<i>Ciberer Spanish Variant Server</i>
DC	Distrofia de conos
DCB	Distrofia de conos y bastones
DHR	Distrofias hereditaria de retina
DM	Distrofia macular
DME	Distrofia macular asociada a la edad (DME)
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ERG	Electrorretinograma
EVS	<i>Exome Variant Server</i>
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
GATK	<i>Genome Analysis Toolkit</i>

---

GCAP	Proteínas activadoras de la guanilato ciclasa
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
KASH	Klarsicht, ANC1, Syne/NesprinHomology
LINC	<i>Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton</i>
LX	Ligado al cromosoma X
MAF	<i>Minor Allele Frequency</i> , frecuencia del alelo menor
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i>
miRNAs	Micro ARN
MLPA	<i>Multiplex-ligation probe amplification</i>
<i>Nesprin2</i>	<i>Nuclear envelope spectrin repeat protein 2</i>
NGS	<i>Next-generation sequencing</i> , Secuenciación de nueva generación
ONT	<i>Oxford Nanopore Technologies</i>
ORF15	<i>Open reading frame 15</i> , Marco abierto de lectura 15
PacBio	<i>Pacific Biosciences</i>
pb	Par de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reacción en cadena de la polimerasa
rd10	<i>Retinal degeneration 10</i>
RNA-seq	<i>RNA sequencing</i> , Secuenciación de ARN
RP	Retinosis Pigmentaria
RPe	Retinosis Pigmentaria esporádica
RS	Retinosquisis
SBB	Síndrome de Bardet Biedl
shRNAs	<i>Short hairpin RNA</i>
SMRT	<i>Single Molecule Real Time</i> , Secuenciación a tiempo real de una única molécula de ADN
SNVs	<i>Single Nucleotide Variants</i> , Variantes de un solo nucleótido
STGD	Enfermedad de Stargardt
<i>Syne2</i>	<i>Synaptic nuclear envelope protein 2</i>
UCSC	<i>University of California, Santa Cruz</i>
USH	Síndrome de Usher
WES	<i>Whole exome sequencing</i> , Secuenciación del exoma completo
WGS	<i>Whole genome sequencing</i> , Secuenciación del genoma completo

---

# 1. INTRODUCCIÓN

---



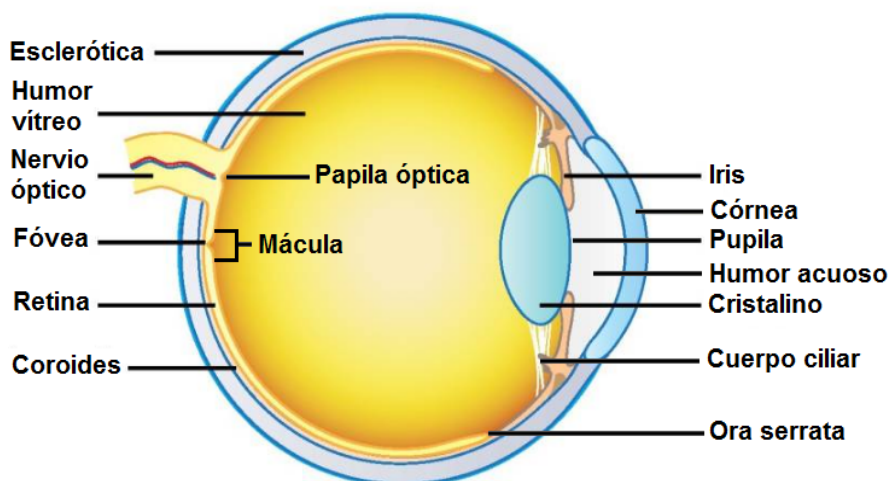
## 1.1 La visión

La visión, o sentido de la vista, es una de las principales capacidades sensoriales del hombre y de muchos animales que les permite obtener información del medio en el que viven y relacionarse con el entorno y sus semejantes. El principal órgano responsable de llevar a cabo esta función es el ojo o globo ocular, el cual recibe señales lumínicas y las transforma en señales químicas y eléctricas que son enviadas al cerebro a través del nervio óptico.

### 1.1.1 El globo ocular

El ojo humano es un órgano complejo tanto en su estructura como función. Anatómicamente, el ojo está constituido por dos líquidos de relleno (humor acuoso y humor vítreo), el cristalino y tres capas concéntricas denominadas, de la más externa a la más interna, túnica fibrosa, túnica vascular y túnica nerviosa (Figura 1):

- Túnica fibrosa. Su función principal es sostener y proteger el globo ocular. Está formada por dos estructuras principales: la esclerótica, membrana posterior externa formada por fibras de colágeno, y la córnea, membrana anterior y avascular que permite el paso de la luz y constituye la primera lente del sistema óptico.
- Túnica vascular o úvea, constituida por: i) La coroides, membrana posterior muy vascularizada y de tejido conectivo responsable de mantener la temperatura constante y nutrir a las diferentes capas del globo ocular, ii) el cuerpo ciliar, situado en la porción anterior del ojo y responsable de la producción de humor acuoso y la acomodación del cristalino y iii) el iris, membrana coloreada con apertura circular (pupila) cuya principal función es controlar la cantidad de luz que penetra en el ojo.
- Túnica nerviosa o retina. Es una lámina translúcida de tejido nervioso fotosensible cuya función es transformar las señales lumínicas en impulsos eléctricos.



**Figura 1: Representación esquemática de la anatomía del ojo humano.**

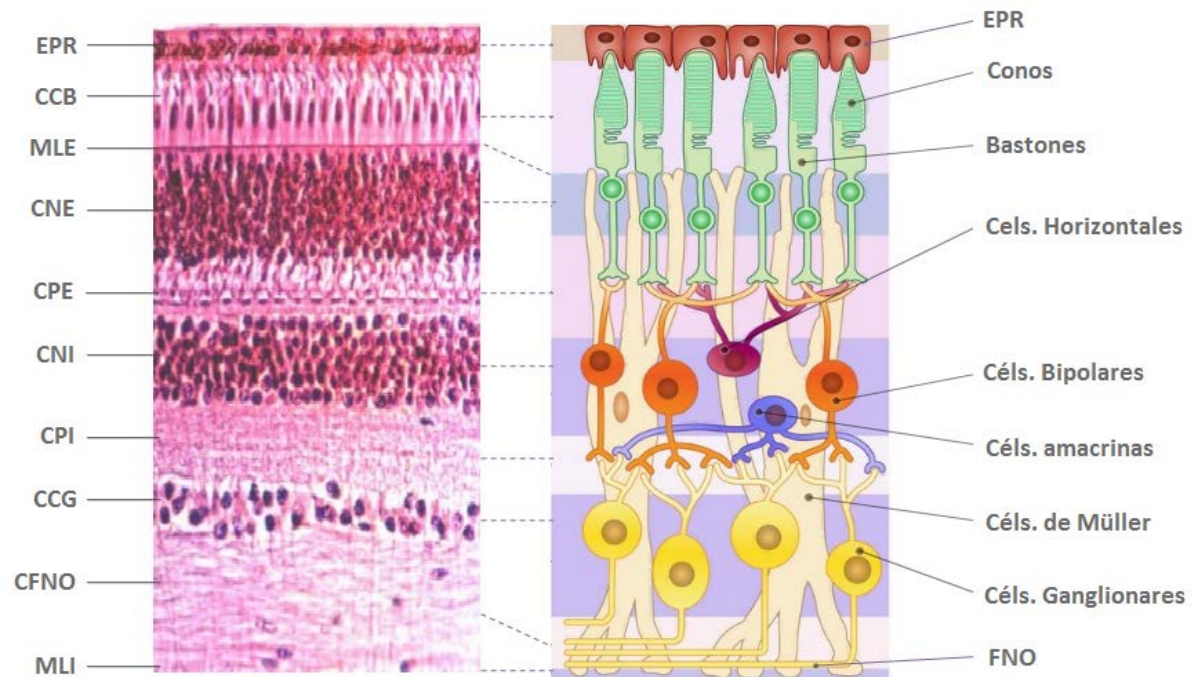
En esta sección se muestran las tres capas del globo ocular: túnica fibrosa (en azul), túnica vascular (en naranja) y túnica nerviosa (en amarillo); así como la localización de los principales elementos presentes en este órgano. Figura adaptada (Kauppinen, y cols., 2016).

### **1.1.2 La retina**

La retina es una porción del cerebro que se proyecta hacia las estructuras superficiales para recibir los rayos luminosos que provienen del mundo exterior. Su fácil acceso, unido a la posibilidad de estudiar el procesamiento de la información en una parte intacta del sistema nervioso, convierte a esta estructura en un modelo de gran utilidad para estudios fisiológicos y morfológicos del sistema nervioso en general (Dowling, 1987). Por este motivo, en los últimos 100 años, la organización de la retina ha sido un tema de estudio recurrente por parte de multitud de investigadores. Santiago Ramón y Cajal (1892) fue uno de los pioneros en este campo y, aunque técnicas posteriores a su estudio han permitido ampliar el conocimiento sobre los circuitos neuronales de la retina, la mayoría de sus descripciones y clasificaciones siguen siendo válidas actualmente.

La retina humana es una capa de tejido de aproximadamente 0,2 mm de grosor que recubre la cara interna del ojo. Se diferencia anatómicamente en dos regiones: la retina anterior o ciega que reviste la cara posterior del cuerpo ciliar y del iris, y la retina posterior o sensitiva que forma la cubierta interna de las tres cuartas partes del globo ocular, termina a lo largo de una línea festoneada conocida como la ora serrata y se encarga de la percepción y procesamiento del estímulo visual (Figura 1). En la retina sensitiva se localizan la papila óptica, también conocida como disco óptico o punto ciego, y la mácula. La papila óptica es la zona donde las fibras nerviosas aferentes de la retina convergen para formar el nervio óptico y no presenta fotorreceptores. La mácula tiene un diámetro de unos 5 mm, es el área central de la retina, el de mayor agudeza visual y el de mayor grosor. Además, en el centro de la mácula se encuentra la fovea, una estructura deprimida especialmente capacitada para la visión de los colores.

La sección vertical de la retina humana muestra una estructura estratificada compleja con un total de diez capas, incluyendo el epitelio pigmentario de la retina (EPR), capas neuronales y capas plexiformes o de interacción sináptica (Figura 2).



**Figura 2: Representación esquemática de una sección transversal de la retina humana.** En la imagen de la izquierda se muestran las distintas capas que componen la retina y a la derecha los distintos tipos celulares que la forman. EPR: Epitelio pigmentario de la retina, CCB: Capa de conos y bastones, MLE: Membrana limitante externa, CNE: Capa nuclear externa, CPE: Capa plexiforme externa, CNI: Capa nuclear interna, CPI: capa plexiforme interna, CCG: capa de células ganglionares, CFNO: Capa de fibras del nervio óptico, MLI: Membrana limitante interna, FNO: Fibras del nervio óptico. Figura adaptada (González, 2014; Micheau, y cols., 2014).

El EPR constituye la capa más externa o porción no visual de la retina y está formado por una monocapa de células epiteliales con microvellosidades en su polo apical y vainas cilíndricas en su membrana plasmática que envuelven los segmentos externos de los fotorreceptores (Junqueira y Carneiro, 1987). Estas células contienen gránulos de melanina en su citoplasma que se encargan de absorber los rayos luminosos dispersos, impidiendo así la reflexión y diseminación de la luz en el interior del globo ocular y garantizando una imagen nítida (Zinn y Marmor, 1979). Además, el EPR forma parte de la barrera hematorretiniana que separa la retina neural de la coroides y tiene un papel crucial en el mantenimiento e integridad de la retina ya que suministra factores tróficos a los fotorreceptores, interviene en la fagocitosis y digestión de los discos de las membranas del segmento externo de conos y bastones, recicla y aporta retinoides al ciclo visual y regula la composición del espacio subretinal (Bridges, 1976; Nicoletti, y cols., 1995; Rizzolo, y cols., 2011; Young y Bok, 1969).

La porción visual de la retina de mamíferos está constituida por células gliales de sostén, entre las que cabe destacar las células de Müller, y cinco clases de neuronas: células fotorreceptoras (bastones y conos), células horizontales, células bipolares, células amacrinas

y células ganglionares (Figura 2). Como se ha mencionado anteriormente, estas células se estructuran de forma estratificada en la retina, constituyendo capas neuronales y plexiformes bien diferenciadas. La capa más externa es la denominada capa de conos y bastones, que contiene las prolongaciones de las células fotorreceptoras y se encuentra en íntimo contacto con el EPR. Los núcleos celulares de los fotorreceptores se encuentran en la capa contigua denominada capa nuclear externa. Estas dos capas se encuentran separadas por la membrana limitante externa, que representa la unión intercelular entre las células de Müller y los fotorreceptores y forma una barrera entre el espacio subretinal y la retina neuronal propiamente dicha. Las señales provenientes de los fotorreceptores pueden seguir una vía vertical o una vía lateral en la retina. En la vía vertical de la retina, los fotorreceptores traducen la señal luminosa y establecen sinapsis en la capa plexiforme externa con las dendritas de las células bipolares, cuyos núcleos celulares se localizan en la capa nuclear interna. Estas neuronas emiten sus axones a la capa plexiforme interna y conectan con las dendritas de las células ganglionares, cuyos núcleos celulares constituyen la capa de células ganglionares y cuyos axones se dirigen hacia la papila óptica formando la capa de fibras aferentes del nervio óptico. En las vías laterales de la retina, las interneuronas moduladoras (células horizontales y células amacrinas) se encargan de modificar las señales transmitidas por la vía vertical. Las células horizontales forman sinapsis con los conos y bastones en la capa plexiforme externa, modulando así las conexiones de estas células con las células bipolares. Por otro lado, las células amacrinas forman sinapsis con los axones de las células bipolares y las dendritas de las células ganglionares en la capa plexiforme interna, ejerciendo una función moduladora de tipo inhibitorio sobre la señal que reciben las células ganglionares, que son las responsables de enviar la información al sistema nervioso a través del nervio óptico (de Vries, y cols., 2011). Finalmente, la porción más interna de la retina está constituida por la membrana limitante interna, formada por la membrana basal de las células de Müller, que tienen función de soporte y actúan como una barrera de difusión entre la retina y el humor vítreo (Ruiz, y cols., 2001).

### **1.1.3 Fisiología visual**

#### **1.1.3.1 Los fotorreceptores**

La luz entra en el ojo a través de la córnea, atraviesa el humor acuoso, el cristalino, el humor vítreo y, finalmente, llega a la retina. Una vez allí pasa por la retina sensitiva hasta



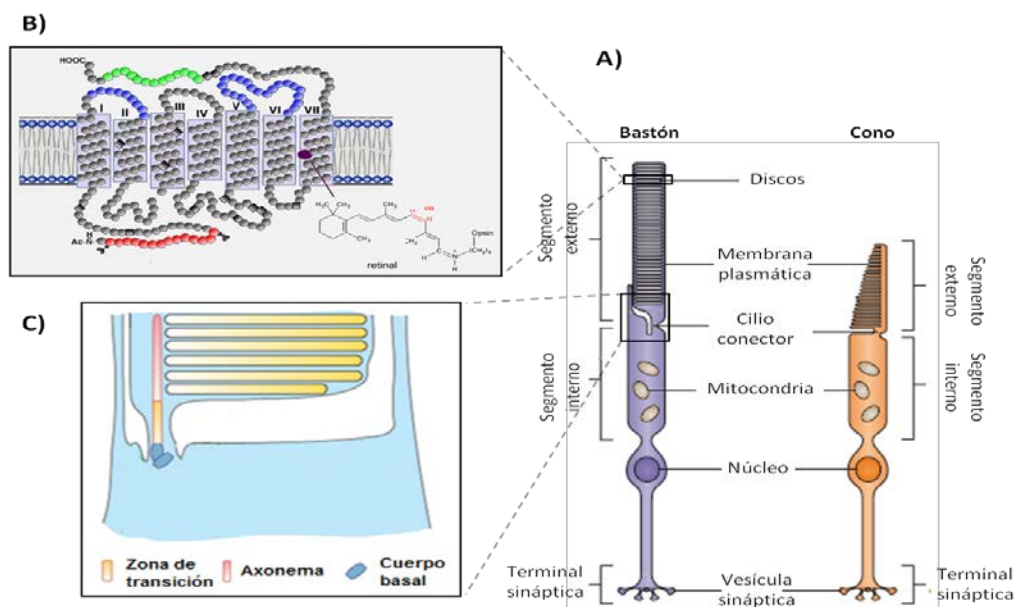
llegar a los fotorreceptores, que son las neuronas responsables de captar la señal lumínica (fotones) y convertirla en un impulso eléctrico, proceso conocido como fototransducción.

La mayoría de los vertebrados tienen dos tipos de fotorreceptores: bastones y conos, los cuales se diferencian entre sí en su morfología, localización y función. Los bastones son los fotorreceptores más abundantes de la retina humana (~120 millones) y su densidad aumenta conforme nos acercamos a la periferia. Por otra parte, la cantidad de conos en la retina es 20 veces inferior (~6-7 millones) y su densidad aumenta a medida que nos acercamos a la mácula, siendo máxima en la fovea (hasta 140.000 conos/mm<sup>2</sup>) donde además es el único tipo de fotorreceptor dada la ausencia de bastones en esta zona.

Respecto a la sensibilidad lumínica, los bastones son sensibles a estímulos de luz muy débiles (hasta de un único fotón) y se encargan de la visión en condiciones escotópicas (poca luz y/o visión nocturna), mientras que los conos son menos sensibles y funcionan bajo condiciones de luz fuerte, siendo relevantes en condiciones fotópicas (mucha luz y/o visión diurna). Además, estos dos tipos celulares también se diferencian en la respuesta cinética y el periodo de adaptación (Fu y Yau, 2007; Kefalov, y cols., 2010). Por un lado, los bastones se saturan con facilidad, llegando a perder su capacidad de respuesta bajo condiciones de luz moderada o fuerte, presentan una respuesta lenta a la luz débil y un periodo de refracción más o menos largo (Wang y Kefalov, 2011). Sin embargo, los conos muestran una respuesta rápida a condiciones de poca luz y, además, se recuperan rápidamente de la exposición a luz intensa (Wassle y Boycott, 1991).

Tanto los conos como los bastones presentan una estructura funcional similar ya que ambos poseen un segmento interno, una terminal sináptica, un cilio conector y un segmento externo (Figura 3). El segmento interno es la porción celular que contiene el núcleo, la mayoría de orgánulos celulares y gran parte de la maquinaria biosintética. De este segmento sale una prolongación conocida como terminal sináptica, que es la responsable de llevar a cabo las sinapsis con las células bipolares y con interneuronas moduladoras como las células horizontales (Wassle y Boycott, 1991). El segmento interno está conectado con el segmento externo a través del cilio conector, que es una estructura que contiene numerosos microtúbulos y que se considera responsable de mantener la morfología de los segmentos externos y de transportar el material biológico en los mismos. Esta función es crucial para la viabilidad de los fotorreceptores ya que el segmento externo carece de la maquinaria necesaria para sintetizar proteínas y discos membranosos necesarios para la

fototransducción. Para que este proceso se lleve a cabo, este segmento necesita tener una elevada capacidad de captación de la luz, lo que consigue gracias a la alta concentración de pigmentos visuales que presenta. Estos pigmentos son pequeñas moléculas formadas por un cromóforo derivado de la vitamina A, conocido como retinal, unido covalentemente a una proteína de membrana llamada opsina mediante un enlace de base Schiff en el residuo Lisina<sup>296</sup>. En función de las características de la opsina, los pigmentos visuales pueden ser de varios tipos. Los bastones presentan un único tipo de pigmento llamado rodopsina, mientras que los conos pueden tener tres tipos de pigmentos (opsinas) ya sean rojos (64%), verdes (34%) o azules (2%), dando lugar así a la visión tricromática (Stockman, y cols., 2000). Para poder albergar una gran cantidad de pigmentos, los fotorreceptores cuentan con un sistema de discos de membrana sobrepuestos entre ellos que aumentan considerablemente la superficie total de la membrana plasmática. Mientras que los discos de los conos están conectados entre sí permaneciendo como invaginaciones membranales, los discos de los bastones no presentan continuidad y, además, están separados del espacio extracelular por la membrana plasmática (Mustafi, y cols., 2009; Yau, 1994a). Aunque, como el resto de neuronas, los fotorreceptores no tienen mitosis, sus segmentos externos se renuevan continuamente mediante el crecimiento basal del segmento externo y la digestión o fagocitosis del extremo apical por parte de las células del EPR (Young y Bok, 1969).



**Figura 3: Representación esquemática de los fotorreceptores de la retina.** A) Estructura funcional de los dos tipos de fotorreceptores: bastones (morado) y conos (naranja). B) Esquema de la rodopsina en los discos del segmento externo. En números romanos se representan los 7 dominios transmembranales de la proteína. En verde se señalan los sitios de fosforilación, en azul los sitios de interacción con proteínas citoplasmáticas, en rojo los oligosacáridos y en morado el sitio de unión al retinal. C) Cilio conector de los fotorreceptores. Imagen modificada de (Hargrave, y cols., 1984; Megaw, y cols., 2015; Wright, y cols., 2010).

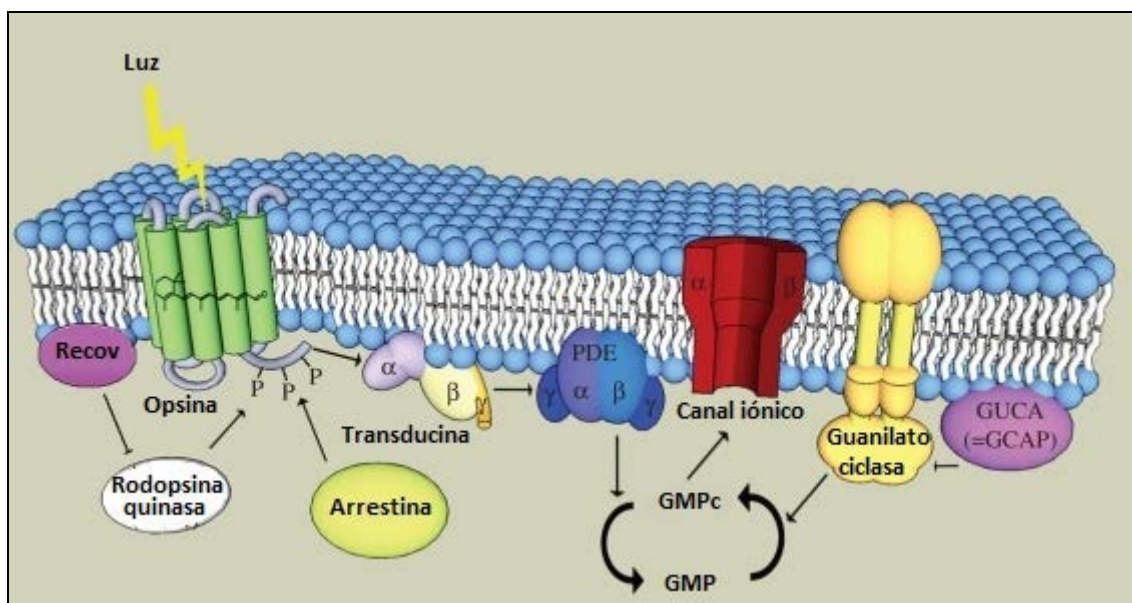
### 1.1.3.2 Fototransducción y ciclo visual

Los mecanismos de la fototransducción conllevan una cascada de eventos bioquímicos que tienen lugar en el segmento externo de los fotorreceptores (Figura 4). En este proceso están implicadas diversas proteínas ancladas a la membrana plasmática y el segundo mensajero Guanosín Monofosfato Cíclico (GMPc).

El GMPc se encarga de regular la apertura y cierre de los canales catiónicos asociados a GMPc. En condiciones de oscuridad, su concentración permanece constante gracias al equilibrio entre su síntesis por parte de la enzima guanilato ciclasa y su hidrólisis mediada por la fosfodiesterasa. En esta situación el GMPc se encuentra unido a estos canales, lo que los mantiene abiertos y permite la continua entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y la consecuente despolarización de la membrana y liberación del neurotransmisor (glutamato). En condiciones de luz, los fotones son absorbidos por los pigmentos visuales, que una vez activados estimulan a una proteína G (transducina en los bastones) que a su vez activa a la fosfodiesterasa de GMPc. Esto lleva a una bajada en la concentración citosólica de GMPc que provoca el cierre de los canales catiónicos y, consecuentemente, la hiperpolarización de la membrana plasmática, la disminución de la liberación de glutamato y, por tanto, la señal nerviosa (Yau y Hardie, 2009).

La última fase de la fototransducción es la de recuperación, en la que las moléculas involucradas vuelven a su estado inicial de activación/desactivación. Esta recuperación es crucial para preservar la capacidad de reacción de los fotorreceptores. La captación de un fotón por parte de los pigmentos visuales causa cambios conformacionales en su estructura que los convierte en moléculas activas capaces de activar a las proteínas G pertinentes. La inactivación de estos pigmentos activos tiene como consecuencia su separación de la proteína G y la consiguiente inactivación de la fosfodiesterasa. Esto tiene lugar gracias a la fosforilación del extremo C-terminal del pigmento activo por parte de la enzima rodopsina quinasa, lo que disminuye su afinidad por la proteína G y detiene la cascada de fototransducción. Además, esta fosforilación aumenta la probabilidad de que el pigmento se una a arrestina, una molécula que acelera el proceso de recuperación (Chen, y cols., 1999; Rinner, y cols., 2005; Xu, y cols., 1997). Aunque este mecanismo de recuperación parece ser el predominante en bastones, en el caso de los conos depende de la intensidad lumínica. Mientras que en condiciones de luz tenue la inactivación mayoritaria de los pigmentos de los conos sigue el modelo anterior de rodopsina quinasa y arrestina, cuando la intensidad es fuerte dicha

inactivación tiene lugar, principalmente, de forma espontánea (Sakurai, y cols., 2015). Esto es posible ya que la molécula de pigmento activada tiene el enlace de base de Schiff retinil-lisina más accesible al agua, lo que favorece su hidrólisis y descomposición en una molécula de opsina y otra del cromóforo en forma *todo-trans* retinal. De esta forma se consigue que dicha inactivación sea independiente de la actividad quinasa para estímulos de luz fuerte que activan más del 1% de los pigmentos de los conos y que, por tanto, tienen la capacidad de saturar la actividad de dicha enzima.

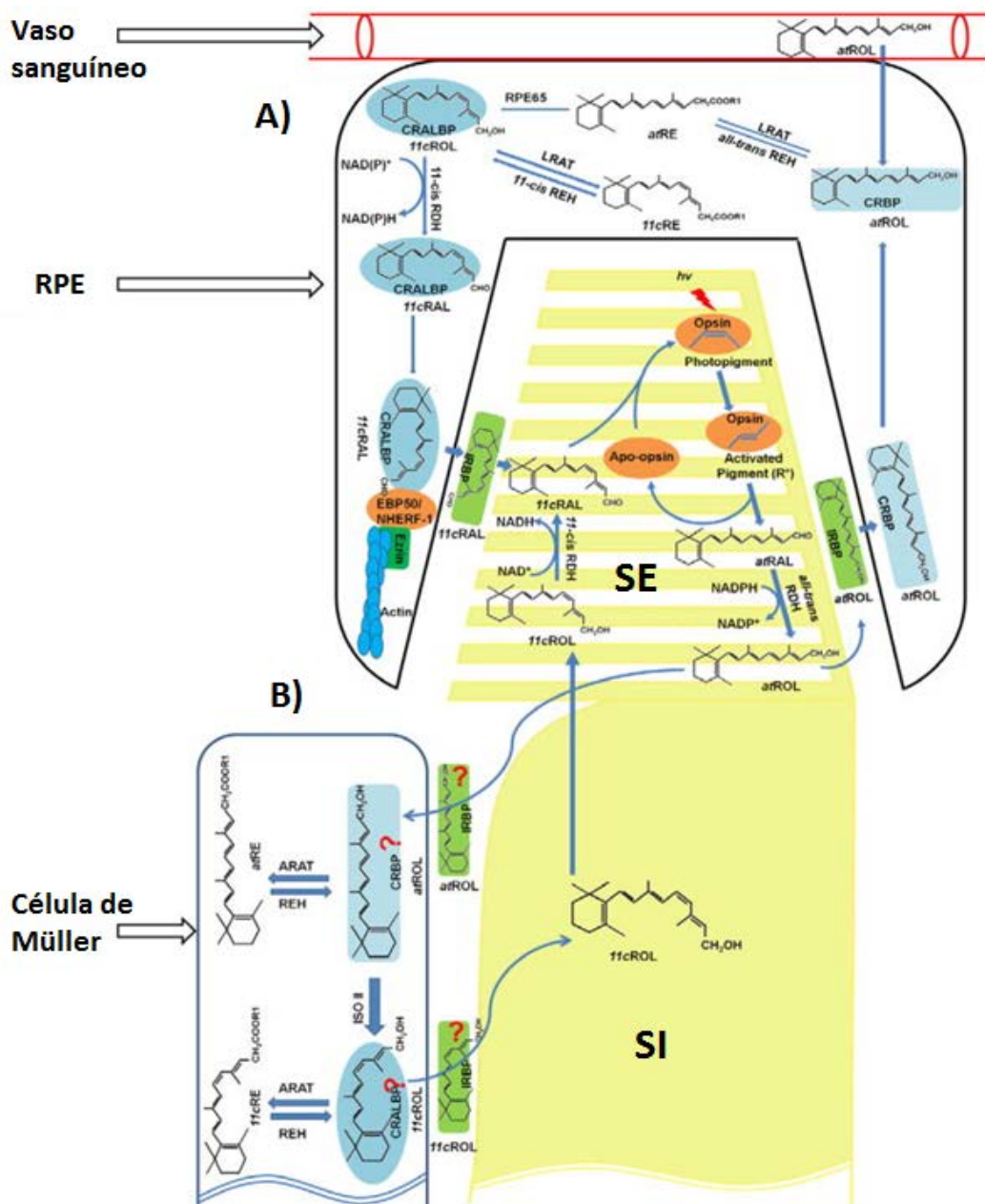


**Figura 4: Cascada de fototransducción en los fotorreceptores.** Tras la absorción de la señal lumínica, el 11-*cis* retinal unido a la opsina es transformado en *todo-trans* retinal, lo que activa a la molécula de pigmento y ésta a su vez a la proteína G heterotrimérica (transducina). Esta proteína activada estimula a la fosfodiesterasa (PDE) produciendo la hidrólisis de GMPc, que mantiene abierto el canal iónico, a GMP. El GMPc es de nuevo generado por la guanilato ciclasa, que se encuentra regulada por proteínas activadoras de la guanilato ciclasa (GCAP o GUCA) que son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . La rodopsina quinasa, regulada mediante la acción de la recoverina (Recov), desactiva la opsina por fosforilación. La arrestina se une a la opsina fosforilada para reducir la señal activadora de ésta sobre la proteína G. Modificada de (Larhammar, y cols., 2009).

Es importante destacar la acción del  $\text{Ca}^{2+}$  tanto en la fase de recuperación como en la adaptación lumínica (Yau, 1994b). Por un lado, el  $\text{Ca}^{2+}$  se une a una proteína conocida como recoverina que se encarga de suprimir la actividad de la rodopsina quinasa, prolongando así el tiempo de vida del pigmento activo al impedir su fosforilación. Esto es importante ya que el control de la vida útil del pigmento activo regula la amplificación de la señal y la resolución temporal de la visión (Umino, y cols., 2012). Aunque este proceso es bien conocido en bastones (Kawamura, 1993; Kawamura, y cols., 1992), no está del todo claro en los conos. Sin embargo, sí se ha visto que la recoverina potencia la sensibilidad de los conos en condiciones de luz tenue, aunque no es así en condiciones de luz intensa (Sakurai, y cols., 2015). Además,

el  $\text{Ca}^{2+}$  (mediante su unión a la proteína activadora de la guanilato ciclasa o GCAP) inhibe a la guanilato ciclasa, por lo que la disminución de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que se produce tras un estímulo de luz provoca a su vez la síntesis de GMPc, permitiendo que los canales catiónicos vuelvan a abrirse y la membrana vuelva a estar despolarizada. En la tercera retroalimentación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  que se produce tras el estímulo visual interviene la calmodulina, la cual se une a los canales catiónicos asociados a GMPc. La disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular hace que esta calmodulina se separe de los canales, lo que modifica sus características físicas y favorece su apertura ante concentraciones bajas de GMPc (Fain, y cols., 2001).

Por último, para que el pigmento visual vuelva por completo a su situación inicial no es suficiente con su inactivación y posterior disociación en opsina y *todo-trans* retinal, sino que es necesaria la transformación del cromóforo en *11-cis* retinal mediante la acción de diversas reacciones bioquímicas, ya que ésta es la forma capaz de unirse a la opsina y susceptible de ser activada por la señal lumínica. Este proceso de reciclaje de los pigmentos visuales es conocido como ciclo visual, presenta una duración más larga en los bastones que en los conos y tiene lugar entre el citosol de los fotorreceptores y el de las células del EPR (Wright, y cols., 2015) (Figura 5A), por lo que son necesarias diversas moléculas que permitan su transporte. Aunque este mecanismo de reciclaje de los pigmentos parece ser el único descrito en bastones, se ha sugerido que los conos pueden presentar una segunda vía para el reciclaje de sus cromóforos (Wang y Kefalov, 2011) que explique las diferencias funcionales entre ambos tipos celulares. Este mecanismo secundario es independiente del EPR, siendo las células de Müller las responsables de llevarlo a cabo (Figura 5B). Así pues, estas células proporcionan cromóforos reciclados a los conos de forma rápida y selectiva, lo que es crucial para el correcto funcionamiento de los conos frente a condiciones de luz fuerte y para mantener su rápida adaptación a la oscuridad.



**Figura 5: Representación de los dos ciclos visuales descritos en conos. A)** Ciclo visual canónico compartido por ambos tipos de fotorreceptores (bastones y conos). Aquí, el todo-*trans* retinal (atRAL) originado por la absorción de un fotón, es reducido a todo-*trans* retinol (atROL) por la enzima retinol deshidrogenasa (RDH) en el segmento externo de los fotorreceptores (SE). Esta molécula es transportada, mediante proteínas de la matriz interfotorreceptora de unión al cromóforo (IRBP) a la parte apical de las células del EPR. Allí, otra proteína de unión a retinoides (CRBP) se unirá al atROL y lo transportará al cuerpo celular de las células del EPR, donde será esterificado a todo-*trans* retinil éster (atRE) por la enzima LRAT. Tras esto, la isomerohidrolasa RPE65 se encargará de hidrolizar e isomerizar la molécula convirtiéndola en 11-*cis* retinol (11cROL). Este retinoide es oxidado a 11-*cis* retinal (11cRAL) por la RDH y es transportado a la zona apical de las células del EPR mediante su unión a CRALBP, donde es transportado fuera de la célula ayudado por las proteínas EBP50/NHERF-1 y ezrina. Entonces el cromóforo se une a IRBP y es transportado de nuevo al segmento externo del fotorreceptor donde se combinará de nuevo con una molécula de oposina para regenerar el pigmento visual. **B)** Ciclo visual específico de los conos. En éste, la molécula de atROL es transportada a las células de Müller donde es convertida a 11cROL mediante la enzima isomerasa II y devuelta al segmento interno del fotorreceptor (SI). De ahí, el 11cROL es transportado hacia el segmento externo, donde es oxidado mediante una RDH a 11cRAL. Modificada de (Wang y Kefalov, 2011).

## 1.2 Distrofias hereditarias de retina

La retina nos proporciona una visión sumamente sensible, que está basada en la integridad de los fotorreceptores. El adecuado funcionamiento retiniano requiere un balance preciso entre los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular programada (apoptosis). El gran requerimiento energético de los fotorreceptores, su complejidad estructural y su alta especificidad hacen de ellos unas células extremadamente vulnerables a su degeneración. Determinadas mutaciones genéticas y/o factores ambientales pueden activar vías específicas para inducir la apoptosis en los fotorreceptores, contribuyendo al desarrollo de numerosas distrofias de retina. La razón por la cual la afectación de un amplio rango de funciones celulares converge en la muerte o disfunción de los fotorreceptores sigue constituyendo un enigma para los investigadores.

Las distrofias hereditarias de retina (DHR) son un conjunto de enfermedades degenerativas y, generalmente, progresivas que se caracterizan por la afectación primaria de los fotorreceptores. Se estima que este grupo de enfermedades afecta, aproximadamente, a 1 de cada 3000 personas (Wright, y cols., 2010) por lo que están englobadas dentro de las denominadas enfermedades raras. Actualmente, las DHR no tienen un tratamiento paliativo ni curativo, y conducen a la pérdida parcial o total de la visión (Rivolta, y cols., 2002b). La gran variedad dentro de este grupo de enfermedades permite su clasificación en función de múltiples criterios, como son el fenotipo clínico, el patrón de herencia y el defecto genético. A continuación, se va a proceder a la descripción de las DHR más relevantes para el presente estudio, clasificadas según el área de la retina que se vea predominantemente afectada o la existencia de síntomas extraoculares. No obstante, aunque estas patologías se han descrito como entidades clínicas distintas, hay que tener en cuenta que no siempre es fácil distinguirlas ya que existe un elevado solapamiento clínico y genético (Estrada-Cuzcano, y cols., 2012b; Neveling, y cols., 2013) que será explicado más adelante (ver apartado 1.2.2).

### 1.2.1 Clasificación

Las DHR se pueden clasificar en base a si afectan predominantemente a los bastones (ej: Retinosis pigmentaria, RP; Coroideremia, CHM; o ceguera nocturna congénita estacionaria, CNCE), a los conos (ej: Distrofia de conos, DC; distrofia de conos y bastones, DCB; alteración en la visión de los colores o acromatopsia, AVC/ACHM; distrofia macular, DM; Retinosquiasis, RS; o enfermedad de Stargardt, STGD) o causan la afectación generalizada de ambos tipos de fotorreceptores (ej: Amaurosis congénita de Leber, ACL) (Berger, y cols., 2010; Hamel, 2006).

La función retiniana se estudia mediante el electroretinograma (ERG), que es una herramienta que permite registrar los potenciales de acción de los fotorreceptores producidos por el estímulo visual, y así poder medir la respuesta eléctrica de estas células. El ERG es fundamental para el diagnóstico y clasificación de las DHR (Heckenlively, y cols., 1991).

#### *1.2.1.1 Formas periféricas*

Los bastones son las primeras células, pero no necesariamente las únicas, afectadas en las formas periféricas de las DHR, por lo que a estas enfermedades se las conoce como distrofias de bastones o de bastones y conos. Este subgrupo de enfermedades puede dividirse a su vez en función de si son progresivas (ej: Retinosis pigmentaria o Coroideremia) o estacionarias (ej: Ceguera nocturna congénita estacionaria). En este estudio vamos a prestar especial atención a las formas progresivas.

##### *1.2.1.1.1 Retinosis pigmentaria*

La Retinosis pigmentaria o Retinitis Pigmentosa (RP; MIM #268000; ORPHA791) es la distrofia hereditaria de retina más frecuente, constituyendo el 85-90% de todos los casos de DHR. Los estudios realizados en diferentes poblaciones han permitido estimar una prevalencia mundial para la RP de 1 de cada 4000 personas, constituyendo un total de más de un millón de individuos afectados en todo el mundo (Hamel, 2006; Hartong, y cols., 2006). En cuanto a la población española, la incidencia se estima en 1 de cada 2500-3000 recién nacidos vivos (Ayuso, y cols., 1997).

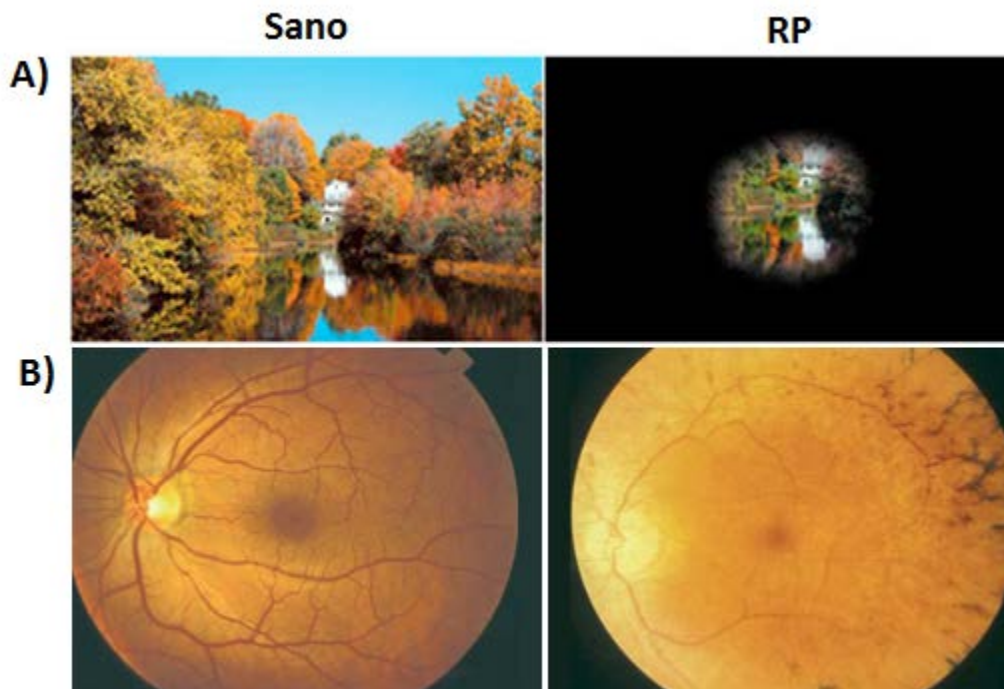
La mayoría de las formas de RP tienen como primera causa la degeneración de los bastones. Debido a ello, el primer síntoma suele ser nictalopía o ceguera nocturna, seguida de la pérdida progresiva de campo visual periférico, lo que lleva a lo que se conoce como visión de túnel (Figura 6). Algunos pacientes también presentan síntomas secundarios como discromatopsia y fotofobia (Hamel, 2006). Con el tiempo, también se produce la degeneración de los conos, ocasionando una alteración de la visión diurna y de la agudeza visual, y pudiendo llegar a la ceguera total después de varias décadas (Ferrari, y cols., 2011). Algunas de las principales características de un fondo de ojo de un paciente con RP son la disminución del grosor de los vasos sanguíneos de la retina, la palidez del disco óptico, y la presencia de depósitos de pigmento retiniano en forma de espículas óseas (Figura 6). Estos depósitos provienen de las células afectadas del epitelio pigmentario de la retina (Phelan y Bok, 2000).



Además de las características clínicas mencionadas anteriormente, la edad de aparición de los síntomas también constituye una variable importante para ayudar en el diagnóstico clínico de la RP. Mientras que en la mayoría de los pacientes de RP los síntomas clínicos aparecen en la adolescencia (RP juvenil) (Ayuso y Millan, 2010), también existen casos con síntomas desde los primeros años de vida (RP precoz) y casos en los que aparecen en la edad adulta (RP tardía). Estas diferencias pueden deberse a diversos factores entre los que encontramos el gen implicado en la enfermedad, el tipo de mutación o el patrón de herencia.

En cuanto al modo de herencia, lo más común es que la RP se comporte como una enfermedad mendeliana, heredándose de forma autosómica recesiva (RPAR) en un 39 % de los casos, autosómica dominante (RPAD) en un 12%, y ligada al cromosoma X (RPLX) en un 4% (Ayuso, y cols., 1995). Se considera que, en términos generales, las formas ligadas al cromosoma X presentan síntomas a edades más tempranas, seguidas de las formas autosómicas recesivas y, posteriormente, las autosómicas dominantes. No obstante, también se han descrito casos de herencia no mendeliana, como la herencia mitocondrial (Pieczenik y Neustadt, 2007), el digenismo (Dryja, y cols., 1997) y la disomía uniparental (Rivolta, y cols., 2002a). Hay que tener en cuenta que en estas cifras no se contemplan los casos en los que sólo existe un miembro afecto en la familia (casos aislados de RP, tradicionalmente conocidos como RP esporádica o RPe), ya que en estos casos no es posible determinar el modo de herencia sin tener un diagnóstico genético previo. Esto ha dificultado enormemente el estudio de este grupo de casos con RP y ha provocado que, a pesar de constituir el 41% de los casos según algunos estudios (Ayuso, y cols., 1995), sea el grupo menos estudiado dentro de esta enfermedad.

Hasta el momento, se han identificado mutaciones en más de 80 genes en pacientes con RP (ver apartado 1.2.2 y Anexo I), siendo el gen *EYS* (Abd El-Aziz, y cols., 2008; Abd El-Aziz, y cols., 2010; Audo, y cols., 2010; Barragan, y cols., 2010; Pieras, y cols., 2011) y el gen *USH2A* (Glockle, y cols., 2014) los más prevalentes en RPAR con una frecuencia comprendida entre el 10-15% y el 10-30%, respectivamente (Fahim, y cols., 1993). Por otro lado, el gen que codifica para la rodopsina (*RHO*) es el más prevalente en RPAD (20-30%) (Daiger, y cols., 2008), mientras que el gen *RPGR* es el responsable de, aproximadamente, el 70-90% de los casos de RPLX (Vervoort, y cols., 2000).



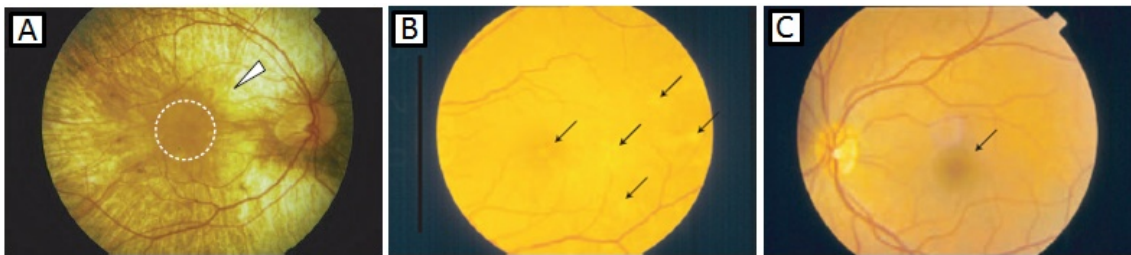
**Figura 6: Síntomas clínicos de RP.** A) Pérdida de visión periférica típica de RP (visión de túnel). En la imagen de la izquierda se muestra un paisaje visto por una persona sana y en la de la derecha visto por un paciente de RP. B) Comparación del fondo de ojo de un individuo sano (izquierda) con el fondo de ojo de un paciente de RP (derecha). Modificada de (Garin, 2014).

#### 1.2.1.1.2 Coroideremia

La Coroideremia (CHM; MIM #303100; ORPHA180) es una DHR que se caracteriza por la degeneración progresiva de la coroides, el EPR y los fotorreceptores. Esta enfermedad tiene una prevalencia de 1 de cada 50 000-10 000 individuos, está causada por mutaciones en el gen *CHM* y sigue un patrón de herencia ligado al cromosoma X, por lo que es más frecuente en varones (Sahel, y cols., 2015). No obstante, se ha descrito que las mujeres portadoras pueden presentar cierto grado de sintomatología, atribuyéndole un patrón de herencia dominante ligado al cromosoma X (Harris y Miller, 1968; Perez-Cano, y cols., 2009; Potter, y cols., 2004). Independientemente del grado de afectación de las mujeres portadoras, éstas suelen presentar un fondo de ojo con una pigmentación irregular que se agrava con la edad (Figura 7).

De forma general, el primer síntoma de esta enfermedad es la ceguera nocturna, que suele aparecer durante la infancia. Ésta es seguida por una pérdida progresiva de la visión periférica que da lugar a la característica visión de túnel. Finalmente, en los estadios más avanzados de la enfermedad se aprecia una disminución de la agudeza visual. Aunque el desarrollo de la enfermedad es similar al descrito para la RP ligada al cromosoma X, su

pronóstico es más favorable ya que, normalmente, los pacientes conservan la visión central hasta la quinta o sexta década (Zinkernagel y MacLaren, 2015). Un adecuado examen del fondo de ojo es crucial para un correcto diagnóstico diferencial que permita la distinción entre CHM y RP. Al contrario que la RP, los pacientes con CHM suelen presentar una gran atrofia coriorretiniana festoneada con poca o sin migración pigmentaria. Además, la papila del nervio óptico mantiene su color normal hasta estadios avanzados de la enfermedad y no suele observarse un estrechamiento de los vasos sanguíneos de la retina (Sahel, y cols., 2015) (Figura 7).



**Figura 7: Imagen de un fondo de ojo de:** A) un varón afecto de CHM que muestra atrofia coriorretiniana (cabeza de flecha blanca) y preservación de la mácula (círculo discontinuo); B) Mujer portadora de CHM que muestra áreas con pérdida del EPR (flechas negras) en la mácula central y en la retina temporal; C) una persona sana cuya mácula se representa por una flecha negra. Modificada de (MacDonald, y cols., 2004).

#### 1.2.1.2 Formas centrales

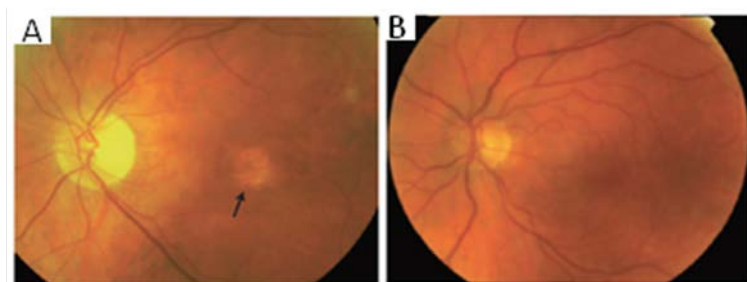
Como hemos visto en apartados anteriores, la región central de la retina (mácula) está especializada en la visión diurna y la discriminación de los colores, lo que es posible ya que está enriquecida con los fotorreceptores del tipo conos. De este modo, las DHR que afectan principalmente a la mácula presentan, de forma general, una alteración predominante en la función de los conos. Por este motivo, a estas formas de DHR se las conoce como distrofias de conos, de conos y bastones o, más ampliamente, maculopatías. Además, también se puede distinguir entre formas progresivas (ej: Distrofia de conos, distrofia de conos y bastones, enfermedad de Stargardt y retinosquiasis) y estacionarias (ej: Acromatopsia) pero, al igual que hicimos con las formas periféricas, en este caso también nos centraremos en las formas progresivas.

##### 1.2.1.2.1 Distrofia de conos y distrofia de conos y bastones.

Las enfermedades que implican una afectación primaria de los conos suelen ser más severas que las causadas por una alteración predominante de los bastones. Así pues, la distrofia de conos (DC; ORPHA1871) y la distrofia de conos y bastones (DCB; ORPHA1872)

suelen derivar en una ceguera legal antes de lo que lo hace la RP (Nash, y cols., 2015). De hecho, la mayoría de los pacientes con DCB alcanzan la ceguera total alrededor de los 40 años (Thiadens, y cols., 2012). La prevalencia de estas enfermedades se estima en 1 de cada 40 000 individuos (Hamel, 2007) y el primer síntoma más frecuente es la disminución de la agudeza visual, que tiende a aparecer durante la infancia o la adolescencia. Además, es frecuente que los pacientes con estas enfermedades presenten fotofobia intensa, diferentes grados de la alteración de la visión de los colores, escotoma central y nistagmo (Berger, y cols., 2010).

El fondo de ojo de la DC y DCB suele presentar depósitos pigmentarios y atrofia macular (Figura 8). Para saber si estamos ante una DC o una DCB es necesario realizar pruebas oftalmológicas que permitan discernir el grado de afectación de cada tipo de fotorreceptor, como son la angiografía fluoresceínica (AFG) y el ERG. La principal diferencia entre estos dos tipos de distrofias es que mientras que en la DC se produce la degeneración exclusiva de los conos, preservando zonas de la retina periférica, en la DCB esta degeneración va seguida de la afectación de los bastones. Actualmente se han asociado más 30 genes diferentes a la DC y DCB (ver apartado 1.2.2 y Anexo I), que pueden causar la enfermedad siguiendo un patrón de herencia autosómico recesivo, autosómico dominante o ligado al cromosoma X (Hamel, 2007). El gen *ABCA4* es el que más ampliamente se ha asociado a la DC y DCB con un modo de herencia autosómico recesivo, teniendo una frecuencia de 9% y 26%, respectivamente (Thiadens, y cols., 2012).



**Figura 8:** Comparación del fondo de ojo de un paciente de distrofia de conos (A) con atrofia macular (flecha negra) con el de una persona sin la enfermedad (B). Modificada de (Nash, y cols., 2015).

#### 1.2.1.2.2 Enfermedad de Stargardt

La enfermedad de Stargardt (STGD; MIM #248200; ORPHA827) es una forma de degeneración macular juvenil con una prevalencia estimada de 1 entre 10 000 individuos, por lo que está considerada como la distrofia macular hereditaria más común.

Esta distrofia macular se presenta entre la primera y la segunda década de vida, produciendo una severa disminución de la agudeza visual mientras que la visión periférica no

se ve alterada. Histológicamente, el rasgo más característico es la aparición de acúmulos de lipofucsina que se depositan en forma de motas amarillentas hacia el polo posterior del EPR y, en formas más avanzadas, se observa atrofia macular (Figura 9). El gen más ampliamente asociado a la forma recesiva de la STGD es *ABCA4*. Sin embargo, aunque en una menor proporción, también se han descrito formas autosómicas dominantes para esta enfermedad causadas por otros loci (ver apartado 1.2.2 y Anexo I). El gen *ABCA4* codifica para una proteína que interviene en el transporte de los derivados de la vitamina A durante el ciclo visual. De este modo, la alteración de la función de este gen lleva a la acumulación de todo-trans retinal, lo que favorece que estas moléculas interaccionen entre sí para dar lugar al compuesto A2PE (N-retinilideno-N-retinil-fosfatidiletanolamina), que al hidrolizarse origina un fluoróforo de la lipofucsina denominado A2E (N-retinilideno-N-retinil-etanolamina), cuya acumulación es tóxica para las células del EPR y, de forma secundaria, causa la muerte de los fotorreceptores. Por este motivo, en pacientes con STGD u otras enfermedades susceptibles de ser causadas por el gen *ABCA4* están contraindicados los tratamientos consistentes en un suplemento de vitamina A (retinol).

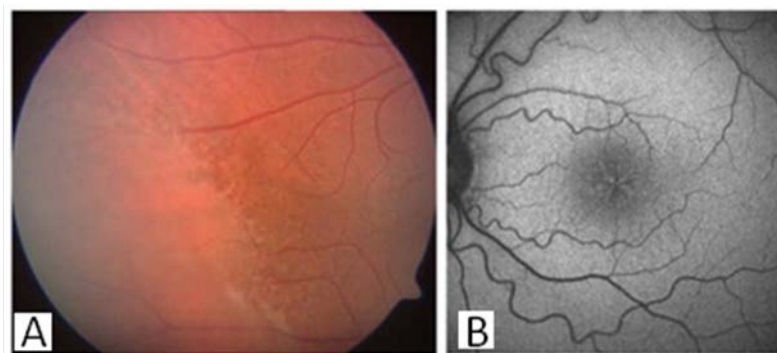


**Figura 9: Fondo de ojo de un paciente con la enfermedad de Stargardt.** A) imagen en color del fondo de ojo. B) imagen monocromática del fondo de ojo. Se observa una atrofia central y los clásicos depósitos amarillentos en la región peripapilar. Modificada de (Hwang, y cols., 2009).

#### 1.2.1.2.3 Retinosquiasis juvenil ligada al cromosoma X

La retinosquiasis juvenil ligada al cromosoma X (RS; MIM #312700; ORPHA792) es una de las causas más comunes de degeneración macular juvenil en varones, con una prevalencia que oscila entre 1:5000 y 1:25 000 (Mooy, y cols., 2002). La RS sigue un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X y está causada, de forma mayoritaria, por mutaciones en el gen *RS1* (>90% de los casos). La manifestación clínica más común suele ser la pérdida de visión central en la primera década de vida, que va acompañada de una disminución de la agudeza visual que suele estabilizarse durante la segunda década. A pesar de su aparición

temprana, la ceguera legal no suele alcanzarse hasta, aproximadamente, los 70 años de edad (Sieving, y cols., 1993). El fondo de ojo se caracteriza por una degeneración macular microquística que presenta una distribución radial típica desde la fovea hasta la periferia (patrón en “rueda de carro”) (Figura 10). También se produce degeneración vitreorretiniana y rotura de la capa de fibras nerviosas, lo que genera grandes hendiduras denominadas “*schisis*” que suelen aparecer de forma bilateral en la fovea y constituyen el hallazgo clínico más común en estos pacientes (Tantri, y cols., 2004). Este desgarramiento de las capas superficiales de la retina ocasiona degeneración de los fotorreceptores, disminución de la capa ganglionar y alteraciones en el EPR. La progresión de la enfermedad es muy variable incluso dentro de una misma familia y suele ir determinada por la existencia de complicaciones secundarias como la hemorragia del vítreo, que puede manifestarse con estrabismo o nistagmo, y el desprendimiento de retina, que se produce en un 40% de los casos (Molday, y cols., 2012).



**Figura 10: Apariencia de un fondo de ojo en individuos afectados de retinosquiasis.** A) Imagen a color del fondo de ojo de un varón de 20 años con RS. B) Imagen de autofluorescencia del fondo de ojo de un paciente de 12 años con RS, en el que se observa degeneración macular en un patrón en rueda de carro. Modificada de (Molday, y cols., 2012).

#### 1.2.1.3 Formas mixtas

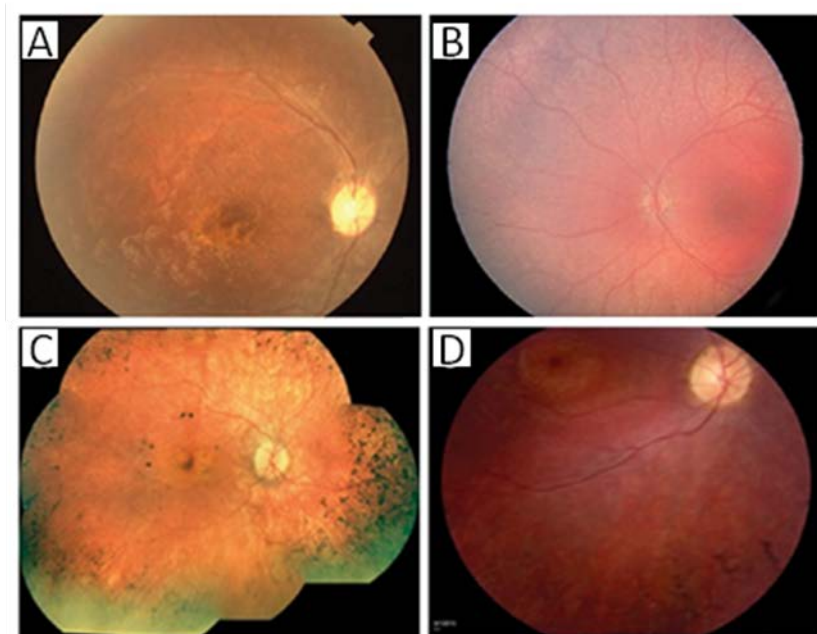
En algunas formas de DHR se produce la afectación simultánea de los dos tipos de fotorreceptores, por lo que son conocidas como formas mixtas. La mayoría de estos casos suelen presentar un deterioro de la visión severo y progresivo.

##### 1.2.1.3.1 Amaurosis Congénita de Leber

La amaurosis congénita de Leber (ACL; ORPHA65) está considerada la forma de DHR más grave y suele estar presente desde el nacimiento en los pacientes que la padecen. Esta enfermedad es la DHR mixta más común, con una prevalencia de 1:35 000 individuos y, aunque existen formas autosómicas dominantes, en la mayoría de los casos se presenta siguiendo un patrón de herencia autosómico recesivo (Koenekoop, 2004). En la actualidad

existen más de 20 genes asociados a esta enfermedad (ver apartado 1.2.2 y Anexo I), los cuales pueden expresarse tanto en los fotorreceptores como en el EPR.

Las manifestaciones clínicas de la ACL suelen desarrollarse durante los primeros años de vida. Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de, al menos, las siguientes tres características: deterioro temprano y severo de la visión, respuestas pupilares lentas o casi ausentes y ERG disminuido o abolido. El fondo de ojo puede ser variable en las primeras etapas de la enfermedad, pudiendo mostrar desde una retina poco afectada a una maculopatía severa, movilización pigmentaria en forma de espículas óseas, fondo en sal y pimienta, etc (Figura 11). Además, otros síntomas frecuentes son miopía, fotofobia, queratocono, cataratas, estrabismo, palidez del disco óptico, ceguera nocturna y nistagmo (Hufnagel, y cols., 2012). Aunque se han sugerido correlaciones genotipo-fenotipo para algunos de los genes responsables de la enfermedad (ej: *RPE65* y *CEP290*), el solapamiento fenotípico y genético con otras DHR sigue constituyendo un problema para el diagnóstico de esta enfermedad (Chacon-Camacho y Zenteno, 2015). Por último, aunque la mayoría de las veces aparece de forma aislada, la ACL ha sido asociada con otros problemas no confinados al ojo, como son la discapacidad intelectual, movimientos estereotipados y la disfunción olfatoria.



**Figura 11: Diferentes fenotipos en pacientes con ACL.** A) Atrofia perimacular y acumulación pigmentaria. B) Hipopigmentación del fondo de ojo con gránulos difusos del EPR. C) Aglutinamiento y atrofia del EPR macular acompañado de pigmentación en forma de espículas óseas. D) Atrofia macular y depósitos de pigmentos en forma de espículas óseas. Modificada de (Hufnagel, y cols., 2012).

#### 1.2.1.4 Formas sindrómicas

En la mayoría de los casos, las DHR se manifiestan como una enfermedad no sindrómica cuyos síntomas están confinados al ojo. Sin embargo, en un 20-30% de los casos, estas enfermedades se encuentran asociadas a otras alteraciones sistémicas (casos sindrómicos), dando lugar a más de 30 síndromes diferentes (Hartong, y cols., 2006). A la hora de diagnosticar a un paciente es importante determinar si se trata de una degeneración exclusivamente ocular o bien si forma parte de un trastorno sistémico ya que algunas retinopatías son un síntoma frecuente de distintos errores metabólicos congénitos, especialmente en alteraciones del sistema peroxisomal, errores del metabolismo de los ácidos grasos y defectos de la cadena respiratoria mitocondrial. Entre las formas sindrómicas más frecuentes se encuentran el síndrome de Usher y el síndrome de Bardet-Biedl.

##### 1.2.1.4.1 Síndrome de Usher

El síndrome de Usher (USH; ORPHA886) se caracteriza por la asociación de hipoacusia neurosensorial, retinosis pigmentaria y, en algunas ocasiones, disfunción vestibular. Esta enfermedad tiene una prevalencia entre 1-4 por cada 25 000 individuos (Mathur y Yang, 2015) y es considerada la forma más común de sordo-ceguera de origen genético, siendo responsable de más del 50% de los individuos sordo-ciegos (Vernon, 1969). Se trata de una enfermedad monogénica de herencia autosómica recesiva, aunque también se han descrito casos de digenismo (Ebermann, y cols., 2010). Hasta la fecha, se han identificado al menos 14 genes implicados en la aparición de la enfermedad (ver apartado 1.2.2 y Anexo I) aunque algunos de ellos pueden causar también RP sin pérdida auditiva (Rivolta, y cols., 2002a) o sordera profunda sin RP (Weil, y cols., 1997). Además, el USH es clasificado en tres grandes grupos en función del grado de severidad que presente (USH1, USH2 y USH3) (Reiners, y cols., 2006), tal y como puede observarse en la tabla 1.

**Tabla 1: Tipos clínicos del síndrome de Usher.** \*: En algunas poblaciones como la finlandesa o la población de judíos Ashkenazi, este tipo clínico alcanza una frecuencia del 40 % debido a un efecto fundador.

	USH tipo I	USH tipo II	USH tipo III
<b>Pérdida auditiva</b>	Congénita	Congénita	Postlingual
	Severa a profunda	Moderada a Severa	Variable
	Estable	Estable	Progresiva
<b>Inicio de la RP</b>	Prepuberal	Peri-postpuberal	Variable



<b>Función vestibular</b>	Alterada	Normal	Variable
<b>Lenguaje</b>	Ininteligible	Inteligible	Inteligible
<b>Frecuencia</b>	10-35%	50-65%	2-5%*

#### 1.2.1.4.2 Síndrome de Bardet-Biedl

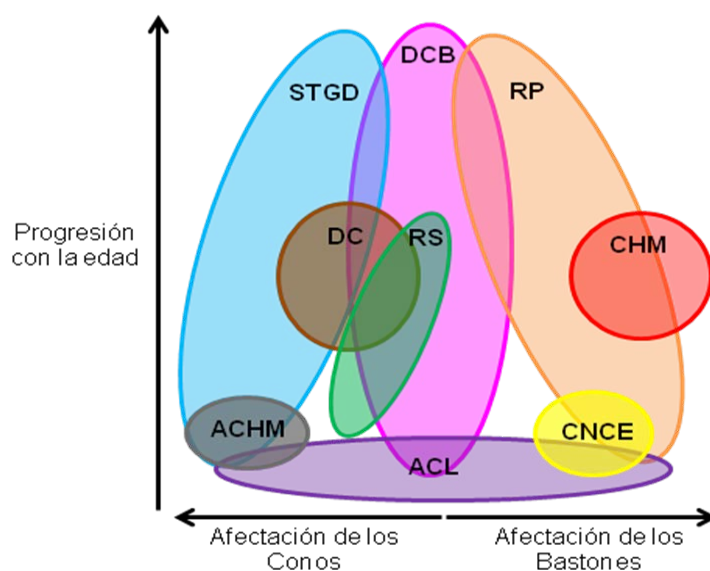
El síndrome de Bardet-Biedl (SBB; ORPHA110) es un trastorno pleiotrópico autosómico recesivo, englobado dentro de las llamadas ciliopatías, caracterizado por un amplio rango de síntomas clínicos de expresión variable. Su prevalencia en poblaciones europeas y norteamericanas se encuentra entre 1:140 000-160 000 nacidos vivos (M'Hamdi, y cols., 2014). Los principales síntomas o síntomas primarios que caracterizan a este síndrome son: distrofia progresiva de la retina, obesidad, trastornos de aprendizaje, anomalías renales, polidactilia postaxial e hipogenitalismo (Forsythe y Beales, 2013). En varios casos de SBB también se han observado otros síntomas secundarios menos frecuentes, como son: defectos metabólicos, cardiopatía congénita, estrabismo, cataratas, astigmatismo, déficits del habla, pérdida auditiva, hipertensión, defectos hepáticos, braquidactilia, sindactilia, ataxia, alteraciones en la dentición y diabetes mellitus entre otros (Khan, y cols., 2016). Para el diagnóstico clínico de esta enfermedad es necesario un mínimo de 4 de los síntomas primarios o 3 síntomas primarios y 2 secundarios (Beales, y cols., 1999), consiguiendo evitar así, en la medida de lo posible, los diagnósticos erróneos debidos al solapamiento fenotípico con otras formas de DHR.

Hasta la fecha, se han descrito un total de 24 genes asociados a esta enfermedad (ver apartado 1.2.2 y Anexo I), cuyas mutaciones permiten explicar aproximadamente el 70-80% de los casos (M'Hamdi, y cols., 2014; Muller, y cols., 2010; Zaghoul y Katsanis, 2009). No obstante, en un 5% de los casos se ha propuesto la existencia de herencia trialélica (Katsanis, y cols., 2001; Leitch, y cols., 2008; Zaghoul, y cols., 2010) y también se ha demostrado que otras variantes pueden actuar como modificadores del fenotipo de la enfermedad (Badano, y cols., 2006; Gonzalez-Del Pozo, y cols., 2014). Además, se han reportado casos en los que mutaciones en genes que causan SBB (*BBS1*, *BBS2*, *BBS3*, *BBS8* y *CEP290*) son responsables de un amplio rango de fenotipos que van desde la DHR no sindrómica al SBB (Aldahmesh, y cols., 2009; den Hollander, y cols., 2006; Estrada-Cuzcano, y cols., 2012a; Riazuddin, y cols., 2010; Shevach, y cols., 2015).

El espectro fenotípico y la edad de aparición de los síntomas son altamente variables en el SBB, pudiendo aparecer algunas manifestaciones clínicas durante la infancia y otras en la etapa adulta. Respecto a la sintomatología ocular, ésta ocurre en un 90% de los casos de SBB y suele aparecer durante la infancia o adolescencia, llevando de forma general a una ceguera total antes de los 20 años (Mockel, y cols., 2011). Se han descrito diferentes formas de distrofias retinianas asociadas al SBB, entre las que se encuentran la distrofia de conos y bastones (DCB), de bastones y conos (RP) y distrofia coroidal (M'Hamdi, y cols., 2014). Actualmente, sigue siendo necesario esclarecer las correlaciones genotipo-fenotipo para esta enfermedad (Beales, y cols., 1999; Gerth, y cols., 2008; Riise, y cols., 2002).

### 1.2.2 Heterogeneidad clínica y genética

Como hemos visto anteriormente, las DHR se pueden clasificar en base al tipo de fotorreceptor que se vea predominantemente afectado y su progresión con la edad. Sin embargo, dada la alta heterogeneidad de este grupo de enfermedades, no existe una clasificación aceptada de forma uniforme y otros criterios como la edad de aparición de los síntomas son igualmente válidos. Esta variabilidad clínica deriva en un considerable solapamiento fenotípico entre las distintas entidades clínicas tanto en etapas tempranas como tardías de la enfermedad (Estrada-Cuzcano, y cols., 2012b; Neveling, y cols., 2013) (Figura 12). De hecho, esta variabilidad fenotípica puede estar presente incluso entre miembros de la misma familia (Gonzalez-Del Pozo, y cols., 2014).



**Figura 12: Solapamiento fenotípico entre distintas formas de DHR no sindrómicas.** ACHM: Acromatopsia; ACL: Amaurosis congénita de Leber; CHM: Coroideremia; CNCE: Ceguera nocturna congénita estacionaria; DC: Distrofia de conos; DCB: Distrofia de conos y bastones; RS: Retinosquisis; RP: Retinosis pigmentaria; STGD: Enfermedad de Stargardt. Modificada de (den Hollander, y cols., 2010).

Por otro lado, las DHR presentan una extremada heterogeneidad genética con un importante solapamiento entre los genes asociados (Berger, y cols., 2010) (Figura 13) que, unido al solapamiento clínico y a la gran cantidad de genes asociados a este grupo de enfermedades, constituye el principal obstáculo para establecer correlaciones genotipo-fenotipo y desentrañar las bases etiopatogénicas de este grupo de patologías. Las DHR muestran tanto heterogeneidad alélica como no alélica. La heterogeneidad alélica hace referencia a la existencia de mutaciones diferentes en el mismo gen que producen el mismo o distintos fenotipos. Por otra parte, la heterogeneidad no alélica o de *locus* hace referencia a que la alteración de diversos genes puede converger en el desarrollo de la misma enfermedad (Figura 14).



**Figura 13: Solapamiento genético entre las distintas DHR.** Se representa una gran colección de los genes implicados en las diferentes formas de DHR, ya sean sindrómicas como el síndrome de Usher (USH) y el síndrome de Bardet-Biedl (SBB), o no sindrómicas: Retinosis pigmentaria (RP), Ceguera nocturna congénita estacionaria (CNCE), Distrofia de conos (DC), Distrofia de conos y bastones (DCB), Amaurosis congénita de Leber (ACL), Distrofia macular (DM), Distrofia macular asociada a la edad (DME) y otras retinopatías (OR). Modificada de (Berger, y cols., 2010).

Aunque la gran heterogeneidad de las DHR ha sido un problema constante en su larga trayectoria de estudio, todavía no se conocen con exactitud las causas subyacentes. No obstante, en muchos casos esta variabilidad ha sido atribuida a genes y/o alelos modificadores de la penetrancia y modificadores del fenotipo (Badano, y cols., 2003; Beales, y cols., 2003; Vithana, y cols., 2003). La identificación de estos modificadores, incluso con las técnicas más novedosas, es especialmente complicada al necesitar de un análisis más meticuloso y no disponer de herramientas que evalúen su implicación en la enfermedad de una forma rápida y sencilla. Otros factores como la epigenética o los microRNAs (miRNAs) también podrían jugar un papel importante en las redes de regulación génica que controlan específicamente la función y el mantenimiento de los fotorreceptores (Damiani, y cols., 2008), al tiempo que podrían constituir nuevas dianas terapéuticas (Nadeau, 2001).

Por todo lo anterior, la extrema heterogeneidad de las DHR dificulta enormemente esclarecer las correlaciones genotipo-fenotipo. Varios estudios señalan que, de forma general, las mutaciones que provocan una pérdida de función están asociadas a un patrón de herencia recesivo a no ser que exista haploinsuficiencia (Griffiths, y cols., 2000), mientras que las asociadas con una herencia autosómica dominante suelen producir una ganancia de función o un efecto dominante negativo de la proteína mutada (Mendes, y cols., 2005). Se ha descrito que algunos genes implicados en DHR pueden actuar siguiendo una herencia recesiva o dominante según el tipo de mutación que porten, asumiendo que aquéllas más leves darán lugar a herencias recesivas y las más deletéreas a herencias dominantes (Al-Rashed, y cols., 2012; Kaiserman, y cols., 2007; Kumaramanickavel, y cols., 1994; Neidhardt, y cols., 2006). Esto es particularmente interesante en los genes con una herencia ligada al cromosoma X semidominante (ej: *RPGR*) para los que, además de la naturaleza más o menos severa de la mutación, se ha propuesto una relación con la inactivación no aleatoria del cromosoma X en mujeres en el tejido afecto (Koenekoop, y cols., 2003). Sin embargo, en la mayoría de los casos, los mecanismos mutacionales de estos genes no se conocen con exactitud.

### **1.2.3 Genes asociados a DHR**

Las alteraciones genéticas responsables de las DHR pueden afectar a casi todos los aspectos de la estructura y función celular. Las mutaciones que afectan a funciones específicas de los fotorreceptores como la fototransducción o el ciclo visual, son sólo algo más numerosas que las mutaciones que afectan a funciones más generales de la célula como el mecanismo de corte y empalme de ARNm (*splicing*), el metabolismo lipídico, la matriz extracelular o la

función ciliar (Wright, y cols., 2010). Además, un correcto desarrollo de la retina es decisivo para establecer y mantener una adecuada función visual. Resulta particularmente interesante cómo la alteración de genes ampliamente expresados por otros tipos celulares, causa un fenotipo restringido a la función visual. Tal es el caso de los genes que se encargan de regular la maquinaria de *splicing* (ej: *PRPF3*, *PRPF8* y *PRPF31*) ya que, aunque es una función imprescindible para la correcta formación del ARN mensajero en todos los tipos celulares, sus mutaciones dan lugar a formas dominantes de RP no sindrómica. Aunque todavía no existe una respuesta consensuada a este respecto, se ha postulado que este intrigante comportamiento puede deberse a que los factores de *splicing* alterados actúen de forma específica sobre genes altamente expresados en la retina (Yuan, y cols., 2005), o bien, que el efecto de estas alteraciones sea más severo en células muy activas transcripcionalmente, como es el caso de los fotorreceptores (Travis, 1998).

Hasta el momento, se han identificado más de 200 genes asociados a las DHR (Daiger, y cols., 2016) y, sin embargo, se estima que aproximadamente un tercio de los genes causantes y alrededor de un 70% de las mutaciones responsables permanecen aún sin identificar (den Hollander, y cols., 2010; Neveling, y cols., 2012). Tal y como indica la genética poblacional, este gran número de genes implicados se traduce en una elevada frecuencia de individuos asintomáticos portadores de mutaciones patogénicas. De hecho, se estima que 1 de cada 4-5 individuos de la población general puede ser portador de mutaciones nulas responsables de DHR, lo que constituye la frecuencia de portadores más alta asociada a una enfermedad mendeliana (Nishiguchi y Rivolta, 2012). Diversos estudios mutacionales han señalado que el gen *ABCA4* puede ser el gen más polimórfico implicado en DHR (Lewis, y cols., 1999; Rivera, y cols., 2000). De hecho, algunas de las mutaciones descritas como patogénicas en este gen se han encontrado en una elevada frecuencia en poblaciones de Europa y Estados Unidos, sugiriendo un efecto fundador (Maugeri, y cols., 1999).

A excepción de algunos casos, la mayoría de genes asociados a DHR se han reportado sólo en unas pocas familias, por lo que su contribución a la frecuencia total de este grupo de enfermedades es relativamente pequeña. Además, la mayoría de las mutaciones patogénicas identificadas tienen una frecuencia del alelo menor (*Minor Allele Frequency*, MAF) muy baja (<0.01) y son específicas de una determinada población (den Hollander, y cols., 2010). Esto lleva a que la prevalencia de los distintos genes y mutaciones causantes de las DHR varíe notablemente entre distintos grupos poblacionales (Dopazo, y cols., 2016). En el Anexo I

quedan recogidos los genes identificados hasta la fecha responsables de DHR, así como sus tipos de herencia, funciones celulares, fenotipos asociados y prevalencias mutacionales.

#### **1.2.4 Aproximaciones para la identificación de nuevos genes candidatos**

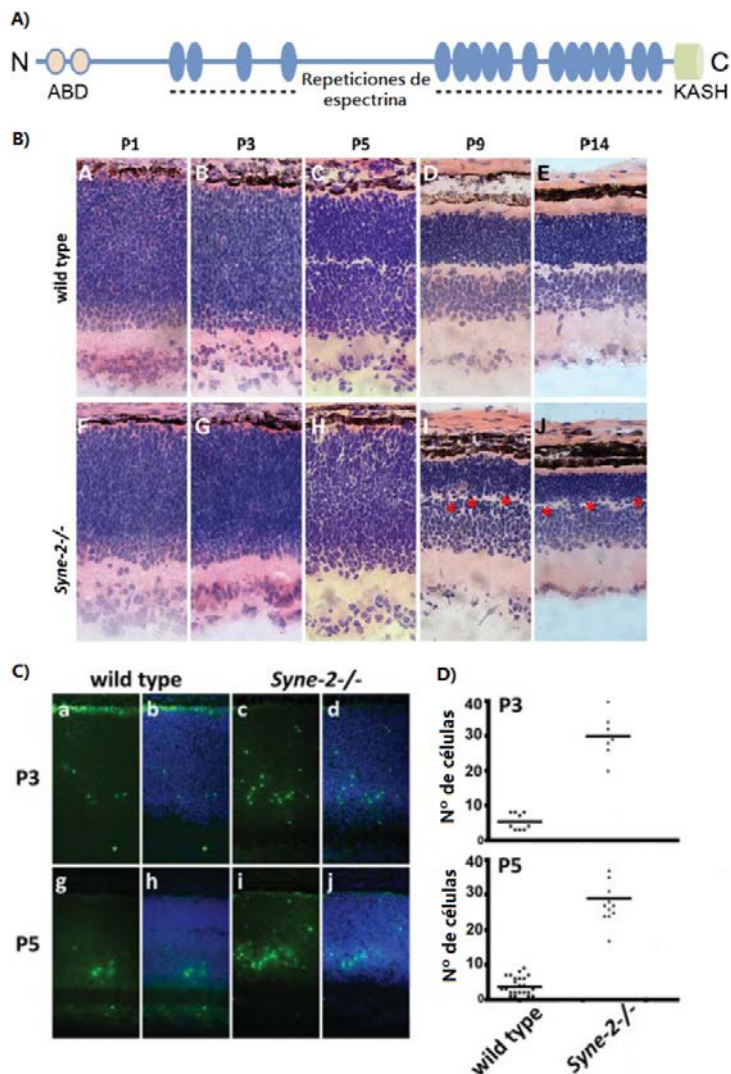
En los últimos años se han llevado a cabo múltiples aproximaciones para identificar nuevos genes asociados a las DHR. Entre ellas podemos encontrar los análisis de ligamiento, mapeos de homocigosidad, ensayos realizados en modelos animales, estudios del interactoma y, más recientemente, las técnicas de secuenciación de nueva generación (ver más adelante, apartado 1.3). En la mayoría de los casos, la mejor estrategia a seguir es la combinación de varias de estas aproximaciones. Respecto a los estudios realizados con modelos animales, un gen es susceptible de ser estudiado como responsable de DHR en humanos, entre otras opciones, cuando muestra una expresión diferencial en modelos animales que presentan la enfermedad (Demos, y cols., 2008) o ha sido identificado como el gen causante de la misma (Audo, y cols., 2012; McLaughlin, y cols., 1993). Para evaluar el grado de implicación del gen candidato es necesario realizar estudios funcionales y para verificar su asociación con la DHR es preciso identificar casos familiares cuya causa genética quede sustentada por mutaciones en el gen pertinente.

La correlación fenotípica entre alteraciones génicas en modelos animales y humanos no siempre es posible debido a las diferencias entre especies en la estructura y fisiología visual (Kostic y Arsenijevic, 2016). En otras ocasiones, la ausencia de esta correlación puede deberse a que la mayoría de los genes asociados a DHR, y aún más aquellos que quedan por descubrir, presentan una prevalencia extremadamente baja que dificulta su hallazgo y posterior reporte.

Son varios los modelos animales que señalan a un determinado gen como posible causa de DHR. Uno de los más recientes es el modelo de ratón *cpfl8* (cone photoreceptor function loss 8) en el que la causa de la degeneración de la retina se ha atribuido a una mutación espontánea (c.13978C>T; p.Gln4660\*) en el gen *Syne2* (*Synaptic nuclear envelope protein 2*), también conocido como *Nesprin2* (*Nuclear envelope spectrin repeat protein 2*) (Maddox, y cols., 2015). Este gen codifica para una proteína que se localiza en la membrana nuclear externa y forma parte del complejo LINC (*Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton*), por lo que juega un papel crucial en las interacciones entre el núcleo y el citoesqueleto durante diversos procesos celulares y de desarrollo (Yu, y cols., 2011). La isoforma larga de este gen codifica para una de las proteínas más grandes del genoma humano y está compuesta por dos dominios amino-terminales que se unen a la F-actina citoplasmática (ABDs, *actin-binding*

*domains*), múltiples repeticiones de espectrina y un dominio KASH (Klarsicht, ANC-1, Syne/NesprinHomology) transmembrana en el extremo carboxi-terminal que se encarga de interactuar con la familia de proteínas SUN para regular la posición nuclear (Autore, y cols., 2013) (Figura 14A). En humanos, *SYNE2* es fundamental para el correcto desarrollo de procesos como la ciliogénesis y migración celular (Dawe, y cols., 2009; King, y cols., 2014). Además, algunas mutaciones en este gen han sido previamente relacionadas con otras enfermedades de base genética como es la distrofia muscular de Emery-Dreifuss tipo 5 (MIM #612999; ORPHA261) (Zhang, y cols., 2007).

Otros estudios con modelos animales han puesto de manifiesto la implicación de este gen en la retinogénesis, donde tiene un papel crucial en el movimiento nuclear intercinético y en la migración de las células fotorreceptoras (Del Bene, y cols., 2008; Patterson, y cols., 2004; Razafsky, y cols., 2013; Yu, y cols., 2011). Estas funciones son claves para un correcto desarrollo de la retina ya que éste se produce en una secuencia temporal bien organizada que implica procesos de proliferación, diferenciación y migración celular (Razafsky, y cols., 2013). Todo esto explica que en previos estudios (Yu, y cols., 2011) se haya visto que los ratones en los que se ha inactivado el gen *Syne2* presentan una reducción severa en el grosor de la membrana nuclear externa de la retina, una deslocalización del núcleo de los fotorreceptores y una disfunción electrofisiológica de la retina caracterizada por una reducción de la amplitud de las ondas a y b del ERG. Además, estos autores también observaron una excesiva tasa de apoptosis en la retina de los ratones mutantes, explicando así la disminución del grosor de la membrana nuclear externa (Figura 14B-D).



**Figura 14: Estudios funcionales de la proteína Syne2.** A) Representación de la estructura proteica de Syne2. B) Secciones de retina teñidas con hematoxilina-eosina pertenecientes a ratones *wild type* (A-E) y *knockout* para *Syne2* (*Syne2*<sup>-/-</sup>) (F-J) en estadios comprendidos entre P1 y P14, en los que se observa la reducción de la membrana nuclear externa y la deslocalización de los núcleos celulares (asteriscos rojos) durante la retinogénesis de los ratones mutantes. C) Imágenes de las retinas de ratones (*wild type* y *Syne2*<sup>-/-</sup>) a P3 y P5 marcadas con la técnica TUNEL, en las que se observan un incremento en células TUNEL positivas en la retina del ratón mutante, lo que pone de manifiesto una mayor tasa de apoptosis ligada a la alteración del gen *Syne2*. D) Representación del número medio de células TUNEL positivas en las retinas de los ratones *wild type* y *knockout*. Modificada de (Maddox, y cols., 2015; Yu, y cols., 2011).

Por todo lo anterior, el gen *SYNE2* cumple los requisitos para ser considerado gen candidato de DHR en humanos, aunque su asociación con esta enfermedad depende del hallazgo de mutaciones en muestras de ADN de pacientes afectados. La estrategia de gen candidato se ha usado con éxito en la identificación de un gran número de genes asociados a DHR aunque en la mayoría de los casos ha implicado una gran inversión de tiempo y dinero. Actualmente, nuevas tecnologías (ver apartado 1.3) están agilizando enormemente este proceso al permitir el análisis simultáneo de diferentes regiones del genoma. Tanto es así, que en los últimos años es relativamente frecuente que un gen sea asociado a DHR sin haber sido previamente un gen candidato por otras técnicas, lo que está suponiendo un cambio de paradigma en lo que respecta al descubrimiento de nuevos genes asociados a enfermedad.



### **1.2.5 Terapias y tratamientos**

Tal y como se ha mencionado anteriormente, las DHR no tienen, a día de hoy, un tratamiento paliativo ni curativo. Sin embargo, las características anatómicas y fisiológicas de la retina (accesibilidad quirúrgica, barreras hematorretinianas y posibilidad de monitorización no invasiva) hacen que los avances desarrollados a lo largo de los últimos años sean muy prometedores. En cualquier caso, la mayoría de estos ensayos se encuentran aún en fase pre-clínica y la elección de cada uno de ellos dependerá del grado de afectación de la retina y de la progresión de la enfermedad.

En un primer lugar, cabe destacar la importancia de detectar la enfermedad en etapas tempranas previas a la degeneración de los fotorreceptores ya que según la fase de la enfermedad se podrán llevar a cabo un tipo de tratamiento u otro y, además, esto permitiría la monitorización de los pacientes antes de que se manifiesten todos los síntomas acordes a su enfermedad. Para ello, el ERG puede ser de gran ayuda ya que permite poner de manifiesto anomalías precoces en la fototransducción y dar una información aproximada del progreso de la enfermedad (Vincent, y cols., 2013). Esta información permitirá aplicar diversos tratamientos ampliamente utilizados para retrasar la muerte de los fotorreceptores, como son los antioxidantes, ácidos grasos y factores neutróficos. La administración de estos compuestos, aún en etapas tempranas, no se considera optimizada a día de hoy y su efectividad se ve cuestionada por algunos autores dada su variabilidad y limitaciones (Berson, y cols., 1993; Birch, y cols., 2013; Grover y Samson, 2014; Talcott, y cols., 2011). Junto a estos tratamientos clásicos, también se recomienda una dieta equilibrada, un ritmo de vida saludable y una protección adecuada de los ojos contra la radiación solar.

Sin duda, más recientemente, la terapia génica ha sido la gran protagonista para la búsqueda de tratamientos para este grupo de enfermedades (Jacobson, y cols., 2012). Básicamente, este tipo de terapias consisten en la introducción en las células de la retina de una copia funcional del elemento genético afectado en el paciente a tratar. Así pues, la proteína funcional, sintetizada por las propias células retinianas, sustituiría a la proteína alterada, lo que permitiría tratar la causa de la enfermedad en lugar de limitarse a paliar sus síntomas. Los vehículos más estudiados para transportar e integrar el transgen en las células diana son los adenovirus y diferentes tipos de nanopartículas. La principal limitación de estas aproximaciones es la necesidad de conocer con exactitud el gen y mutación responsable de la enfermedad, lo que lleva a tener que diseñar una terapia diferente para cada paciente de forma casi exclusiva (Petrus-Silva y Linden, 2014). En 2008, tres grupos de investigación

independientes, entre Filadelfia, Florida y Londres, publicaron el tratamiento con éxito de una serie de pacientes afectados de LCA con mutaciones en el gen *RPE65* utilizando protocolos de terapia génica (Bainbridge, y cols., 2008; Hauswirth, y cols., 2008; Maguire, y cols., 2008). Estudios similares también se han llevado a cabo en pacientes afectados de CHM (MacLaren, y cols., 2014) y de distrofia macular asociada a la edad (DME).

La técnica de ingeniería genética más prometedora en estos momentos consiste en la modificación de genes por nucleasas dirigidas por ARN del sistema CRISPR/Cas9. Actualmente, esta tecnología está revolucionando diversos campos de la biología molecular y, aunque todavía no ha sido optimizada, se espera que pueda tener un alto impacto en el ámbito clínico. No obstante, es importante mencionar que para que este tipo de técnicas tengan la esperada representación en la práctica clínica será crucial conseguir un correcto abordaje de las diversas repercusiones éticas que éstas implican (Hung, y cols., 2016).

En fases más avanzadas de la enfermedad donde se produce una apoptosis generalizada de las células de la retina, las aproximaciones anteriores no son las más adecuadas y se tiende a recurrir a técnicas más invasivas como son los trasplantes de fotorreceptores, implantes de células troncales y retinas artificiales. La principal limitación de los dos primeros métodos es que ambos requieren ser combinados con la adición de factores neurotróficos que, en el primer caso, protejan a los fotorreceptores recién introducidos (Pearson, y cols., 2012) y, en el segundo caso, impidan la muerte de los fotorreceptores del paciente para posibilitar las conexiones entre estos y los fotorreceptores diferenciados de las células transplantadas (Tucker, y cols., 2014). Respecto a las retinas artificiales, éstas consisten en implantes artificiales que se encargan de recibir la información lumínica del mundo exterior y poner en marcha el sistema visual. Estas prótesis están diseñadas para transmitir el estímulo lumínico sin pasar por aquéllas partes que estén afectadas, permitiendo que individuos con una severa pérdida de visión consigan percibir la luz. No obstante, hay que tener en cuenta que es prácticamente imposible que estos pacientes consiguieran una visión perfecta, pero sí la suficiente para poder realizar tareas rutinarias necesarias para el día a día y, por consiguiente, mejorar sustancialmente su calidad de vida. Para que todo esto sea posible, es obligatorio contar con un equipo multidisciplinar que permita la colaboración entre los especialistas clínicos e ingenieros (Maghami, y cols., 2014).

Como vemos, conseguir un adecuado tratamiento para los pacientes afectados de DHR no es una tarea sencilla. La dependencia de muchas de estas estrategias de un diagnóstico molecular preciso hace que el proceso sea aún más complicado y requiera de una mayor

inversión de tiempo y dinero. Esto es así ya que, debido a la alta heterogeneidad clínica y genética de estas enfermedades, las técnicas convencionales como la secuenciación Sanger o los microarrays de genotipado (APEX) tienen una baja tasa diagnóstica y suponen un gran coste económico. Además, estas tecnologías son a su vez dependientes del diagnóstico clínico previo que haya recibido el paciente, el cual no es acertado en algunas ocasiones debido al solapamiento fenotípico de este tipo de patologías. Todo esto complica que se lleve a cabo un correcto consejo genético y manejo de los pacientes y hace necesario el desarrollo de nuevas técnicas moleculares que sirvan en el diagnóstico genético de enfermedades altamente heterogéneas.

### 1.3 Secuenciación de Nueva Generación

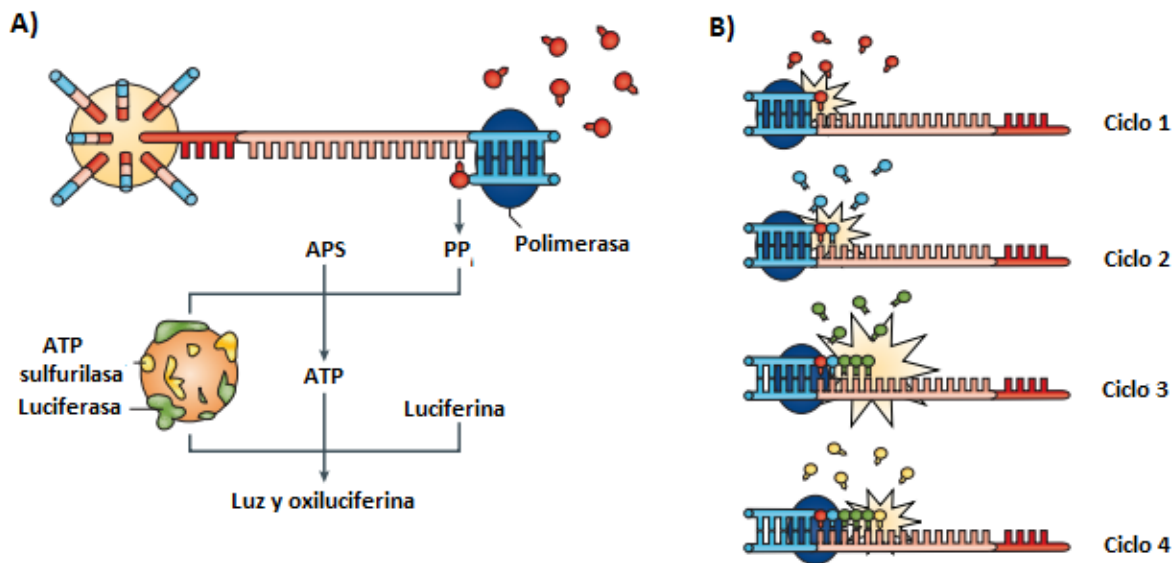
Desde su publicación en 1977 (Sanger, y cols., 1977), la secuenciación Sanger, que ha transformado la biología de nuestros días, ha evolucionado de forma vertiginosa permitiendo alcanzar hitos tan relevantes para la Genética Humana como la secuenciación del primer genoma humano en el año 2001 (Lander, y cols., 2001; Venter, y cols., 2001). Sin embargo, esta técnica requiere una gran inversión de tiempo y dinero, lo que hizo necesario desarrollar nuevas tecnologías de secuenciación más costo-eficientes. De esta manera, surgieron un conjunto de nuevas tecnologías de secuenciación conocidas como secuenciación de nueva generación (*Next generation sequencing*, NGS), también llamadas secuenciación masiva o megasecuenciación. Las técnicas de NGS presentan un rendimiento muy superior al de técnicas convencionales como la secuenciación Sanger (Glenn, 2011; Metzker, 2010) ya que permiten la secuenciación a una velocidad sin precedentes, con un bajo coste por base nucleotídica y una tasa diagnóstica elevada en circunstancias en las que otras aproximaciones han fallado. Por todo esto, en los últimos años, la NGS está revolucionando el campo de la genética y de la genómica, y está ofreciendo soluciones en el abordaje de enfermedades heterogéneas al poder analizar de manera simultánea todos los genes de interés.

#### 1.3.1 Principales plataformas basadas en la NGS

Actualmente, existen múltiples plataformas diferentes de NGS de distintas compañías comerciales, que difieren en su capacidad, longitud de lecturas, tiempo de protocolo, precio y en el tipo de reacciones químicas que llevan a cabo (Goodwin, y cols., 2016; Liu, y cols., 2012). Sin embargo, la mayor parte de estas plataformas se basan en la secuenciación masiva de moléculas de ADN amplificadas de forma paralela. Entre ellas podemos encontrar: Roche 454 (GS FLX Titanium y GS Junior), Life Technologies (ej: SOLiD 5500xl, Ion Torrent PGM) e Illumina (ej: HiSeq, MiSeq, NextSeq).

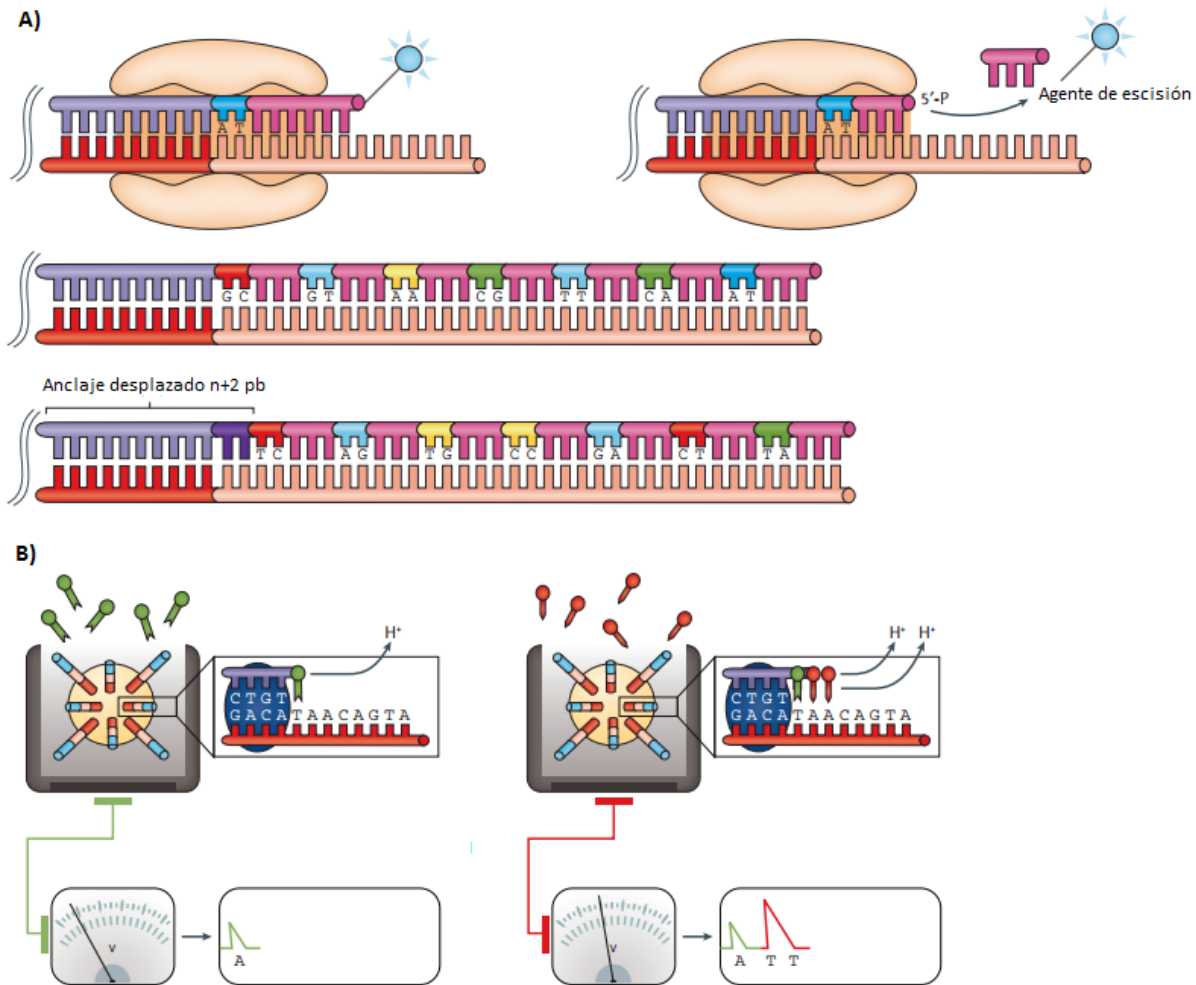
Los secuenciadores 454 de Roche fueron los primeros en salir al mercado y su mecanismo de secuenciación está basado en la pirosecuenciación, que consiste en la detección de señales luminosas generadas a partir de grupos pirofosfato liberados tras la polimerización de un nuevo nucleótido complementario a una hebra de ADN molde (Figura 15). Además de las ventajas propias de la NGS (un menor coste y mayor cantidad de datos generados), estos secuenciadores se basan en lecturas largas que facilitan su alineamiento con el genoma de referencia, mientras que su principal limitación está basada en su relativamente alta tasa de

error en regiones con homopolímeros de más de 6 pb, lo que puede poner en duda la fiabilidad de las secuencias obtenidas.



**Figura 15: Pirosecuenciación 454.** A) La adición de un nucleótido a la nueva hebra de ADN a través de una polimerasa de ADN tiene como resultado la liberación de una molécula de pirofosfato ( $PP_i$ ) que, junto a la ATP sulfurilasa, permite la transformación de adenosina 5' fosfosulfato (APS) en ATP. El ATP es a su vez un cofactor de la conversión de luciferina a oxiluciferina a través de la enzima luciferasa, lo que produce una señal lumínica que, en último lugar, será captada por una cámara. B) Durante cada ciclo de secuenciación sólo está presente un tipo de dNTP. Varios dNTPs idénticos pueden ser incorporados durante un mismo ciclo, lo que lleva a un incremento proporcional de la luz emitida. Modificada de (Goodwin, y cols., 2016).

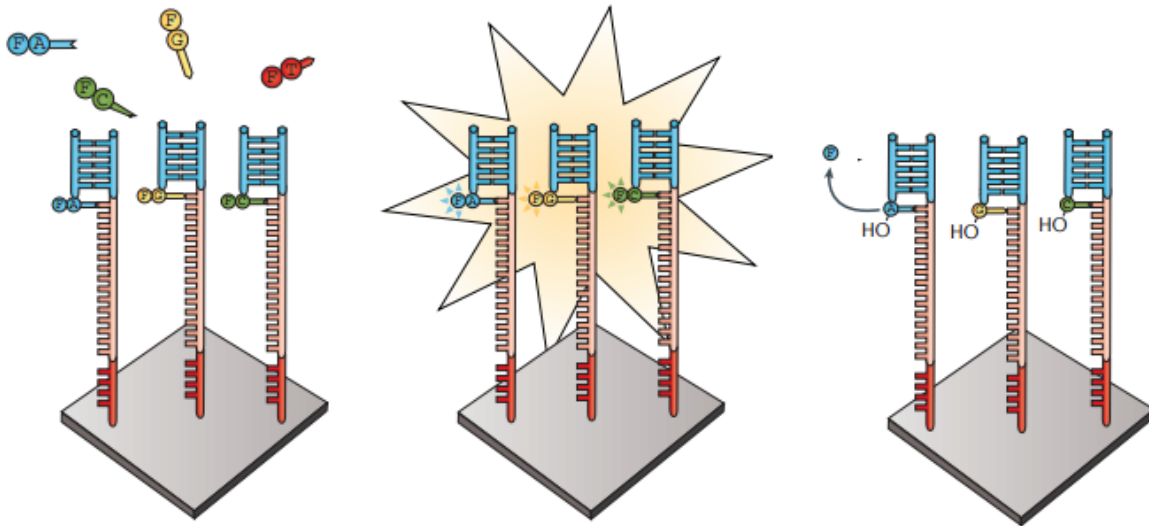
Por otro lado, los secuenciadores SOLiD emplean una tecnología de ligación de oligonucleótidos marcados capaz de interrogar dos bases al mismo tiempo, de manera que tras varias rondas de ligación y detección de los fluoróforos, cada nucleótido es leído dos veces, dando lugar a un nuevo tipo de codificación que se denomina “código de colores” en el que cada color identifica dos bases consecutivas (Figura 16A). Su principal desventaja viene dada por el pequeño tamaño de sus lecturas que dificulta su alineamiento pudiendo llevar a errores de secuencia. Años más tarde pudimos conocer el secuenciador Ion Torrent PGM, que fue el primer secuenciador de mesa (*benchtop sequencers*) en salir al mercado. Su tecnología está basada en la detección de iones  $H^+$  en lugar de marcadores fluorescentes (Secuenciación *poslight*) (Figura 16B), lo que permite reducir los costes de manufactura mediante el uso de micromatrices comerciales de diseño estándar que no necesitan cámaras, láser ni fluoróforos. Al igual que ocurría con la pirosecuenciación, la principal desventaja de esta tecnología es su baja fiabilidad en regiones con homopolimeros. Además, es importante mencionar que tanto el código de colores de SOLiD como la detección de  $H^+$  de Ion Torrent complican el posterior análisis bioinformático.



**Figura 16. Representación esquemática de las dos tecnologías de NGS de Life Technologies.** A) Secuenciación SOLiD. Los fragmentos son secuenciados por un método basado en la ligación. Una sonda marcada con un fluoróforo que está compuesta por dos nucleótidos conocidos en la primera y segunda posición (azul oscuro) seguidos de varias bases universales (rosa) se une al ADN resultante de la librería preparada. Las dos bases conocidas se ligan al anclaje (violeta) que es complementario al adaptador (rojo). En este momento se captura la imagen para identificar las dos primeras bases de cada fragmento. Tras esto, las bases terminales de la secuencia universal junto con el fluoróforo se escinden de la sonda, dejando libre un extremo 5' fosfato y permitiendo que se produzca la siguiente ronda. El resultado de varias rondas de hibridación, ligación, captura de imagen y escisión será la identificación de 2 de cada 5 bases de la secuencia. Una vez que las sondas se han extendido a lo largo de toda la secuencia, todas las sondas y anclajes son eliminados y el ciclo comienza de nuevo con un desplazamiento del anclaje de +2 pb. B) Secuenciación Ion Torrent. En cada ciclo de secuenciación se añade sólo una especie de dNTP y la reacción de elongación del ADN se produce de forma convencional. Con la incorporación de cada una de las bases se genera un ion  $H^+$  que resulta en un cambio de pH de 0,02 unidades, que es detectado por un semiconductor complementario de óxido metálico y un transistor de efecto campo sensible a iones. Varios dNTPs idénticos pueden ser añadidos en un mismo ciclo de secuenciación, produciendo un incremento en la emisión de iones. Una vez añadidos los nucleótidos en un ciclo, éstos son lavados y se procede a la adición de la especie de nucleótido de la siguiente ronda. Modificada de (Goodwin, y cols., 2016).

Por último, los secuenciadores de Illumina lideran actualmente la NGS de lecturas cortas, lo que se debe a la robustez de su tecnología (secuenciación por síntesis) y a la disponibilidad de diversas plataformas que se adecuan a las distintas necesidades. Esta secuenciación se basa

en la incorporación de nucleótidos marcados con terminadores reversibles de manera que en cada ciclo de ligación solamente uno de los cuatro nucleótidos posibles se une de forma complementaria al ADN molde, emitiendo una señal luminosa que es captada por un sistema óptico altamente sensible (Figura 17). Posteriormente, el terminador se elimina para permitir la incorporación del siguiente nucleótido en ciclos sucesivos de secuenciación. En este sentido, el fundamento de la técnica es muy similar al de la secuenciación Sanger.



**Figura 17: Secuenciación por síntesis (Illumina).** Cada nucleótido está bloqueado de forma reversible con un grupo 3'-O-azidometil y está etiquetado con un fluoróforo específico para cada una de las bases. Durante cada ciclo de secuenciación, los fragmentos incorporan sólo un nucleótido debido a que el grupo -OH en el extremo 3' previene la incorporación de otros nucleótidos. Una vez añadida la base, aquéllas no incorporadas son lavadas y acto seguido se captura la imagen que permitirá identificar el nucleótido añadido según el fluoróforo del mismo. Tras esto, el fluoróforo es escindido y el extremo 3'-OH se regenera con un agente reductor, permitiendo así que el ciclo de adición de un nucleótido, elongación y escisión pueda comenzar de nuevo. Modificada de (Goodwin, y cols., 2016).

### 1.3.2 Aplicaciones de la NGS

El uso de la NGS permite incluso el análisis de la secuencia genómica completa de un individuo (*Whole genome sequencing, WGS*), por lo que el abanico de aplicaciones que ofrecen este grupo de tecnologías es inmenso. Debido al alto coste que aún hoy presenta la WGS y a la complejidad de manejar tal cantidad de datos, esta aproximación no suele ser la primera opción para la búsqueda de variantes genéticas asociadas a una determinada enfermedad. En su lugar, se tiende a utilizar métodos alternativos referidos a una fracción más concreta del genoma humano como puede ser el exoma completo (*Whole exome sequencing, WES*) o paneles de un número determinado de genes de interés.

Los paneles de genes asociados a una determinada enfermedad o a un número limitado de éstas, son la opción más usada para el diagnóstico de enfermedades de base genética, ya que su tamaño relativamente pequeño permite disminuir el coste por muestra secuenciada, acelera el proceso diagnóstico, facilita el posterior análisis bioinformático y almacenaje de los datos y reduce notablemente las implicaciones éticas al disminuir notablemente el número de hallazgos inesperados (Consugar, y cols., 2015; Nash, y cols., 2015). En patologías como las DHR, la tasa diagnóstica de esta aproximación ronda el 50%, y es preciso mencionar que en la mayoría de los casos se trata de pacientes analizados previamente por otras técnicas con las que no se obtuvo un diagnóstico genético (Neveling, y cols., 2012). Además, esta estrategia puede servir como primer filtro para seleccionar aquellas familias susceptibles de tener una causa genética que implique a una región o mecanismo molecular no asociado previamente a la enfermedad. No obstante, hay que tener en cuenta que analizar un número tan específico de genes también presenta limitaciones, entre las que encontramos una cierta dependencia del diagnóstico clínico previo, poca capacidad para el descubrimiento de nuevos genes, la necesidad de una actualización periódica y una menor eficiencia en la detección de variantes estructurales como las variaciones en el número de copias (CNVs, del inglés *Copy Number Variations*) y grandes reordenamientos (Eisenberger, y cols., 2013; Jin, y cols., 2014).

Por otro lado, la WES también presenta un alto impacto en el diagnóstico molecular de distintas entidades clínicas y a día de hoy suele ser la técnica de elección en el campo de la investigación clínica para la búsqueda de nuevos genes de enfermedad (Avila-Fernandez, y cols., 2015; Gilissen, y cols., 2011; Kastner, y cols., 2015). Dado que el conjunto de regiones exónicas constituye entre el 1-2% de todo el genoma, la WES permite interrogar todos los genes del genoma con una reducción notable de los costes frente a la WGS. Sin embargo, aunque varios autores han puesto de manifiesto que la mayoría de variaciones funcionales están en regiones codificantes del genoma (Botstein y Risch, 2003; Horner, y cols., 2010), se estima que un gran porcentaje de los casos que quedan por resolver tras ser sometidos a WES serán portadores de mutaciones en zonas no codificantes (intrones, regiones reguladoras, etc.) (Chiang y Trzuppek, 2015; Ku, y cols., 2011; Taneri, y cols., 2012). En este sentido, la WGS sería la única aproximación que permitiría el diagnóstico molecular de estos casos no resueltos por otras estrategias. De hecho, dada la sorprendente rapidez con la que están evolucionando estas tecnologías, muchos autores mantienen que una vez que el coste de la WGS llegue a valores más asumibles por los centros de investigación y/o de diagnóstico, esta secuenciación desbancará a la WES ya que es capaz de conseguir valores de calidad



superiores o similares con una mayor homogeneidad en el número de lecturas a lo largo de toda la secuencia genómica (Lelieveld, y cols., 2015), mostrando una mayor capacidad para la detección de CNVs y otras variantes estructurales (Zhao, y cols., 2013). Esto es así debido a que la detección de CNVs mediante NGS, todavía considerada un reto en muchas aproximaciones, básicamente consiste en la cuantificación del número de lecturas y su comparación con otras muestras secuenciadas en la misma carrera, lo que puede estar influenciado notablemente por la cobertura media de la muestra y, en definitiva, por la calidad de los datos de secuenciación (Eisenberger, y cols., 2013). Tanto en la WES como en la WGS, hay que tener en cuenta que las variantes en genes *a priori* no relevantes para el estudio en cuestión, pueden ser filtradas mediante diversas herramientas bioinformáticas para reducir los hallazgos inesperados.

Aunque las aplicaciones anteriormente mencionadas destinadas a la búsqueda de variantes de secuencia han sido las más utilizadas en los últimos años, diferentes tecnologías de NGS también permiten abordar otros objetivos que cada vez cobran más importancia. Entre ellos, cabe destacar la secuenciación de transcriptomas completos (RNA-seq) (Mutz, y cols., 2013), la identificación de microRNAs (Mills y Janitz, 2012), los estudios de interacción proteína-ADN (ChIP-seq) o los estudios de metilación (Meaburn y Schulz, 2012).

Como ya se ha indicado, la principal característica común de todas estas técnicas es la generación masiva de datos, que se ha convertido en una de las principales limitaciones de la NGS debido a los problemas de análisis, interpretación y almacenaje que conlleva. Por este motivo, la instauración de la NGS ha ido ligada al desarrollo de la bioinformática como rama científica. Diversas herramientas bioinformáticas han sido diseñadas hasta la fecha para ayudar en los diferentes pasos del análisis de los datos generados por NGS, que básicamente consiste en el alineamiento de las lecturas, llamada de variantes con respecto al genoma de referencia y filtrado y anotación de las mismas. Además, diversos proyectos derivados de la secuenciación del exoma/genoma humano como HapMap, 1000 genomas, Exome Variant Server (EVS), Exome Aggregation Consortium (ExAC) o Ciberer Spanish Variant Server (CSVS), que han sido facilitados en mayor o menor medida por la NGS, son de gran utilidad para dicho análisis bioinformático ya que dan información sobre la frecuencia del alelo menor (minor allele frequency, MAF) permitiendo utilizar estos valores en el filtrado y priorización de las distintas variantes, lo que es especialmente relevante para el estudio de enfermedades raras. No obstante, la idea de que existen diferencias específicas de cada población en las frecuencias alélicas de variaciones genéticas asociadas a enfermedad, ha hecho que actualmente se tienda

a incluir una base de datos de variantes específica de la población en estudio en la ruta de análisis de los datos, lo que está permitiendo distinguir entre variantes realmente asociadas a enfermedad y polimorfismos específicos de la población en estudio (Dopazo, y cols., 2016).

La tendencia actual es que este grupo de tecnologías consigan implantarse de forma rutinaria en el proceso diagnóstico de los hospitales que competa. Sin embargo, para alcanzar este objetivo es imprescindible implementar guías consensuadas para el manejo de la enorme cantidad de datos generada, la interpretación biológica y clínica de estos datos y la información al paciente y su familia. Además, es crucial definir los aspectos bioéticos respecto al derecho a conocer los hallazgos inesperados que impliquen a genes que, *a priori*, no son diana en el diseño del estudio. En esta transición entre la secuenciación tradicional y la NGS aún queda por determinar si es necesario validar las variantes identificadas usando métodos convencionales caracterizados por su fiabilidad diagnóstica (secuenciación Sanger). La verificación de cada variante serviría a modo de comprobación pero encarecería y enlentecería enormemente el proceso diagnóstico, haciendo mínima la reducción del coste producida por estas tecnologías. Algunos autores mantienen que esta comprobación es innecesaria y que la probabilidad de tener falsos positivos con las técnicas actuales es mínima e incluso inferior a la de tener falsos negativos por secuenciación Sanger (Beck, y cols., 2016).

### **1.3.3 Desarrollo de nuevas tecnologías: Secuenciación de lecturas largas**

Como hemos visto en el apartado 1.3.1, existen diferencias en la longitud de las lecturas generadas por las distintas plataformas actuales de NGS. Aún así, éstas siguen siendo demasiado cortas para permitir el estudio de regiones repetitivas (imprescindible para el estudio de enfermedades causadas por expansiones de nucleótidos) y la detección de variantes estructurales (especialmente inversiones y traslocaciones). Esto ha llevado al desarrollo de las llamadas lecturas largas sintéticas (Voskoboynik, y cols., 2013) que básicamente consisten en repartir fragmentos de ADN de gran tamaño en múltiples particiones de forma que queden muy pocas moléculas de ADN en cada una de ellas. Tras esto, los fragmentos de cada partición son cortados, etiquetados, y secuenciados acorde a los sistemas de secuenciación de lecturas cortas. Después, los datos se dividen en función de la etiqueta que han recibido y son ensamblados en función de las mismas, asumiendo que todos los fragmentos que comparten la misma etiqueta derivan del mismo fragmento original (McCoy, y cols., 2014). Los principales sistemas disponibles actualmente para la generación de estas lecturas largas sintéticas son la plataforma de secuenciación de lecturas largas sintéticas de Illumina y el sistema basado en emulsión 10X Genomics. Es importante mencionar que

aunque esta aproximación se lleve a cabo en los secuenciadores actuales, es necesario contar con una cobertura mayor a la requerida para otras aplicaciones, lo que conlleva un incremento en el coste de esta tecnología.

Además, esta problemática en cuanto al tamaño de las lecturas ha llevado al lanzamiento al mercado de nuevas plataformas, denominadas secuenciadores de tercera generación, que permiten la secuenciación de una única molécula de ADN (*single-molecule sequencing*). Esto permite que no sean necesarias estrategias previas de enriquecimiento, evitando así las desviaciones generadas durante el proceso de amplificación y reduciendo la inversión total de tiempo y dinero. Una segunda característica de este grupo de nuevas tecnologías es que la señal, independientemente de si es fluorescente (PacBio, ver más adelante) o eléctrica (ONT, ver más adelante), es capturada en tiempo real, es decir, es monitorizada durante la reacción enzimática de adición de un nucleótido a la cadena complementaria de ADN (Liu, y cols., 2012).

Entre estas nuevas tecnologías encontramos, por un lado, la desarrollada por Oxford Nanopore Technologies (ONT), que es capaz de detectar nucleótidos individuales a través de su paso por un nanoporo con unas características similares a los canales proteicos embebidos en la bicapa lipídica que facilitan el intercambio iónico entre ambos lados de la membrana. Durante esta secuenciación se aplica un flujo iónico constante que se ve afectado por el paso de moléculas a través del poro. Estas alteraciones son captadas por técnicas electrofisiológicas estándar y son diferentes en función del nucleótido que pase debido a las diferencias de tamaño de los mismos. Esta tecnología permite obtener lecturas largas de más de 5 Kpb y, al ser prácticamente libre de reacciones enzimáticas, su fiabilidad es poco sensible a los cambios de temperatura (Branton, y cols., 2008; Timp, y cols., 2010).

Sin embargo, la tecnología de tercera generación que despierta más expectativas actualmente es la secuenciación a tiempo real de una única molécula de ADN (*Single Molecule Real Time*, SMRT) de la empresa Pacific Biosciences (PacBio), que explota el proceso natural de replicación del ADN y permite que la síntesis de ADN pueda observarse en tiempo real (Eid, y cols., 2009). Esta técnica está basada en el uso de chips que contienen miles de pocillos que se iluminan desde un fondo transparente, y esta luz atenuada actúa como un potente microscopio. A diferencia de las aproximaciones actuales en las que se une el ADN mientras la polimerasa avanza a través de éste, en este caso la polimerasa se fija en la parte inferior de estos pocillos y es el ADN, derivado de la librería realizada, el que se desplaza. De esta manera la adición de los fosfonucleótidos a la cadena de ADN se produce siempre en una misma

localización del pocillo, permitiendo que el sistema se centre en una única molécula de ADN. Esta adición provoca la liberación de una señal fluorescente, diferente para cada uno de los cuatro nucleótidos, que es captada de forma continuada por un detector. Todo esto permite obtener lecturas largas y homogéneas con un tamaño medio de, aproximadamente, 10 Kb (Rhoads y Au, 2015), que es el motivo principal por el que ha conseguido superar algunas de las limitaciones que presentan los secuenciadores actuales. No obstante, este sistema también presenta debilidades que han de ser tenidas en cuenta. Por un lado, PacBio presenta un bajo rendimiento ya que, de forma general, sólo un 25-45% de los pocillos producen lecturas válidas debido al fallo en el anclaje de la polimerasa o a la presencia de más de una molécula de ADN por pocillo. De esta manera, esta aproximación es capaz de producir alrededor de 0,5-1 billón de bases por chip utilizado, lo que está muy lejos del rendimiento ofrecido por tecnologías de secuenciación por síntesis como la de Illumina, que es capaz de presentar un rendimiento diario de aproximadamente 167 billones de bases. Además, la secuenciación mediante PacBio produce una tasa de error alrededor del 11-15% (Carneiro, y cols., 2012), aunque este porcentaje puede ser reducido si se utilizan secuencias consenso circulares generadas por múltiples lecturas de un mismo chip (Koren, y cols., 2012). Por todo esto, la secuenciación de las tecnologías de NGS actuales y las llamadas de tercera generación son complementarias y no sustitutivas entre sí, por lo que la estrategia más eficiente es utilizar ambas de forma integrada.

---

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---



## 2.1 Hipótesis

- 1) El número de genes de interés que se quiera interrogar mediante técnicas de NGS va directamente relacionado con un mayor coste y una mayor inversión de tiempo en el análisis e interpretación de los datos. Esto cobra especial interés en el ámbito clínico, donde es crucial conseguir el balance más costo-eficiente. Aunque las DHR presentan una alta heterogeneidad genética con más de 250 genes descritos hasta la fecha, muchos de estos genes, y sus mutaciones, son privados de una determinada población. Por este motivo, un panel de genes específicos de población podría facilitar y abaratar el proceso sin comprometer su rendimiento diagnóstico.
- 2) Tanto las técnicas oftalmológicas como las moleculares han avanzado enormemente en los últimos años, permitiendo que, a día de hoy, los pacientes puedan contar con un diagnóstico clínico y genético más preciso. Además, estas nuevas tecnologías también pueden poner de manifiesto los casos que han sido erróneamente diagnosticados con anterioridad, bien por presentar una clínica difusa compatible con varias DHR o por portar mutaciones de dudosa patogenicidad. De este modo, una aproximación basada en la información previa puede sesgar los resultados y ser menos eficaz que una libre de hipótesis prefijadas.
- 3) Aproximadamente un 50% de los casos de RP son casos aislados en los que sólo hay un miembro afecto en la familia. Este hecho dificulta conocer el patrón de herencia subyacente y ha hecho que de forma convencional estos casos sean tratados como autosómicos recesivos a pesar del riesgo de estar subestimando otros tipos de herencia con una mayor repercusión familiar (autosómicos dominantes y ligados al cromosoma X).
- 4) Se estima que en torno al 50% de las familias con RP portan mutaciones en genes todavía no asociados con la enfermedad. Por ello, entre los casos no resueltos mediante técnicas que sólo abarcan genes conocidos sería posible identificar familias cuya causa genética esté en un nuevo gen candidato.
- 5) Un flujo de trabajo personalizado para el análisis bioinformático de los datos generados por NGS conlleva un mayor control sobre la naturaleza de los mismos. Este control podría llevar a una mayor flexibilidad del sistema y, además, podría ser crítico para la aplicación de esta tecnología en la práctica clínica.

## 2.2 Objetivos

- 1) Diseñar, validar e implementar un panel de genes específico de población española que permita el diagnóstico rutinario de las familias afectas de DHR obteniendo una proporción de casos resueltos similar o superior a la de otros paneles que contienen un mayor número de genes, aumentando así la costo-eficiencia del mismo.
- 2) Llevar a cabo una estrategia que no esté determinada por los estudios clínicos y moleculares previos, pudiendo así rectificar el diagnóstico clínico de los pacientes cuando sea necesario y dilucidar la asociación de mutaciones clasificadas como patogénicas que no son claramente deletéreas, como p.Cys759Phe de *USH2A*, con las DHR.
- 3) Determinar la proporción de los casos aislados de RP que tienen una herencia autosómica recesiva, autosómica dominante y ligada al cromosoma X para poder ofrecer un adecuado manejo y consejo genético en cada uno de los casos.
- 4) Identificar nuevos genes asociados a DHR mediante la secuenciación del exoma completo de los casos no resueltos por técnicas de menor alcance.
- 5) Desarrollar un sistema personalizado de análisis de los datos generados por NGS que sea eficiente y flexible para ajustarse a las necesidades específicas de nuestro laboratorio a lo largo del tiempo.



---

## **3. ESTUDIOS REALIZADOS**

---



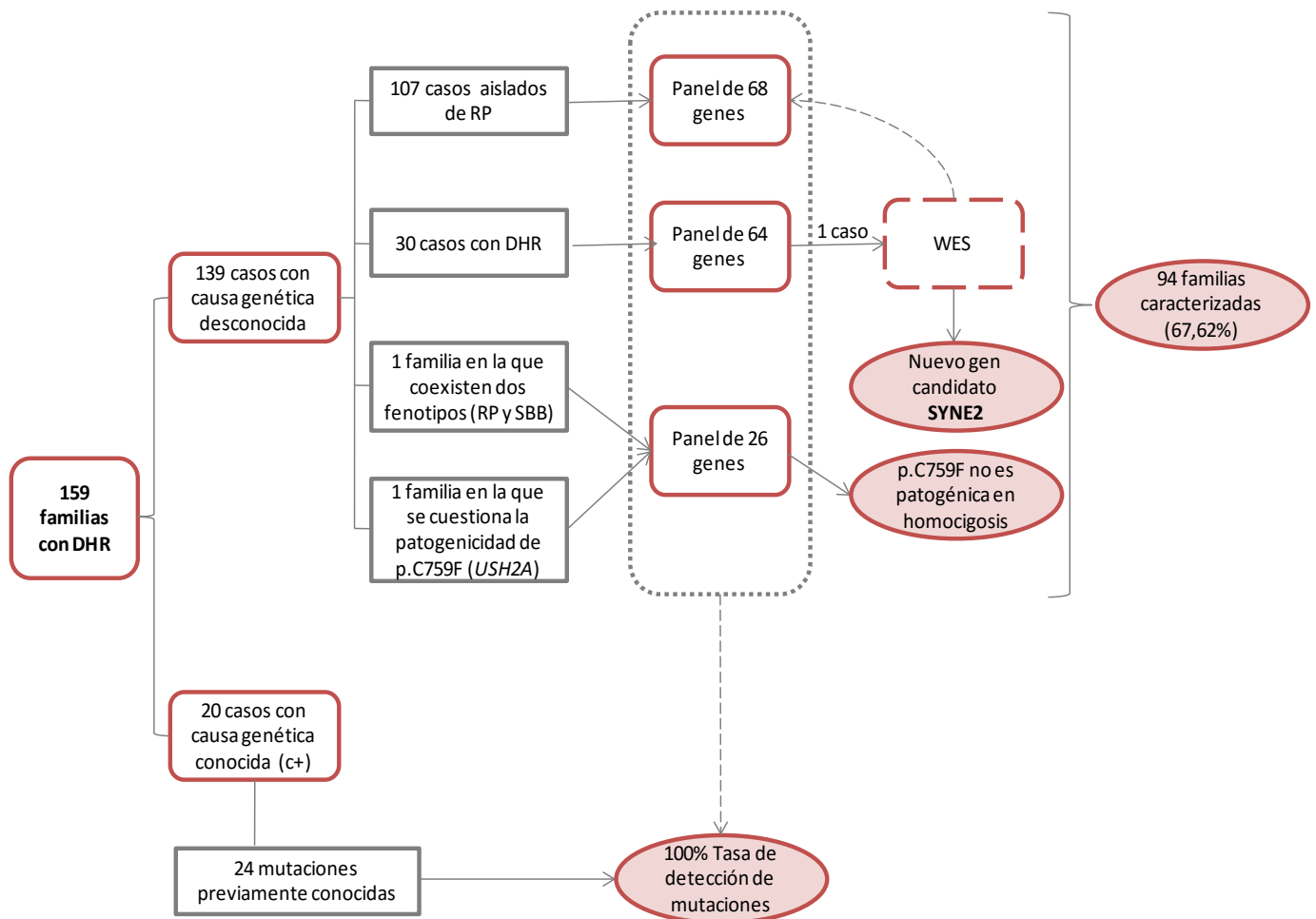
---

## **4. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---



En el presente trabajo se han secuenciado por NGS un total de 159 pacientes afectados de DHRs, de los cuales 20 tenían un diagnóstico molecular previo y fueron utilizados como controles positivos para evaluar la fiabilidad de la estrategia llevada a cabo. Todas las variantes patogénicas presentes en estas muestras utilizadas para la validación del sistema fueron identificadas tras el análisis de los datos, obteniendo así una tasa de detección de mutaciones del 100%. De las 139 familias restantes que no contaban con un diagnóstico genético con anterioridad a este estudio, se consiguió diagnosticar a 94 de ellas, dando una tasa diagnóstica del 67,62%. Este porcentaje es similar e incluso superior al obtenido en otros estudios donde el número de genes analizado era más elevado (Wang, y cols., 2013), confirmando así la eficiencia de los paneles de genes específicos de población. En la figura 18 se muestra una representación global de los resultados obtenidos en los diferentes estudios realizados.



**Figura 18: Representación de los distintos estudios realizados y principales resultados obtenidos.**

Es importante destacar que los datos generados por NGS han llevado a la rectificación del diagnóstico clínico en 26 de las 94 familias resueltas (27,66%). Este resultado evidencia el alto grado de solapamiento fenotípico presente en este grupo de enfermedades, lo que convencionalmente también ha complicado el diagnóstico genético en este grupo de pacientes (Anexo II). En la mayoría de estos casos, el diagnóstico inicial que recibieron los pacientes fue de RP mientras que el diagnóstico final, basado en el diagnóstico genético y la reevaluación clínica, varió desde otras formas de DHR no sindrómicas (DC/DCB, ACL, CHM y STGD) hasta formas sindrómicas como el síndrome de Usher. De todas ellas, la reclasificación más común consistió en la modificación de un diagnóstico inicial de RP por un diagnóstico final de ACL (11 de los 26 casos), lo que concuerda con las manifestaciones clínicas ambiguas que pueden presentar ambas entidades clínicas (Koenekoop, 2004; Rivolta, y cols., 2002b). Es importante tener en cuenta que la mayoría de estos casos reclasificados no hubieran sido diagnosticados mediante aproximaciones dependientes del diagnóstico clínico previo, como pueden ser los paneles de genes diseñados para un único fenotipo. De ser así, la tasa diagnóstica en este estudio hubiera sido significativamente inferior pasando de un 67,62% a menos de un 50%. Por este motivo, esta visión se considera hoy día obsoleta y demuestra que el abordaje más eficiente para enfermedades heterogéneas es el uso de estrategias libres de hipótesis prefijadas. Del mismo modo, contar con este tipo de aproximaciones puede facilitar la identificación de nuevas correlaciones genotipo-fenotipo y ampliar el espectro fenotípico y mutacional de genes ya asociados con la enfermedad.

La alta heterogeneidad clínica y genética de las DHR dificulta enormemente establecer estas correlaciones genotipo-fenotipo (Huang, y cols., 2015). Además, la existencia de herencias oligogénicas en las que intervienen alelos modificadores del fenotipo puede complicar aún más esta ardua tarea (Markand, y cols., 2016). En este trabajo, se han identificado un total de 51 mutaciones nunca antes asociadas a enfermedad. Además, los resultados aquí presentados han llevado a cuestionar la patogenicidad de dos variantes previamente consideradas como patogénicas. Por un lado, la falta de cosegregación del alelo común p.Cys759Phe de *USH2A* en una familia española (Bernal, y cols., 2003) y la identificación de otra mutación potencialmente patogénica en *PDE6B* (p.Arg560Cys) (Chang, y cols., 2002; Chang, y cols., 2007) en esta misma familia, nos ha permitido plantear que esta mutación frecuente de *USH2A* no es patogénica en homocigosis y que su patogenicidad depende de la presencia de una segunda mutación deletérea en el otro alelo. Esta hipótesis fundada en nuestros resultados conlleva la necesidad de reevaluar genéticamente aquellas

familias diagnosticadas con esta mutación en homocigosis que, dado que esta variante se considera causante del 4,5% de los casos de RPAR (Rivolta, y cols., 2000), estimamos que afectará a un número elevado de casos. Por otro lado, la patogenicidad de la variante c.206G>A del gen *CA4* se vio cuestionada tras la falta de cosegregación en una familia con dos hermanos afectos de síndrome de Usher. Además, el fenotipo asociado a la variante (RPAD) (Alvarez, y cols., 2007) no concordaba con el que presentaba la familia (USH) y, además, se detectaron otras mutaciones en el gen *USH2A* que fueron consideradas como la causa más probable de la enfermedad en esta familia. Por último, la posibilidad de que la variante en *CA4* estuviera actuando como alelo modificador del fenotipo fue descartada debido a que la clínica de ambos pacientes afectos era similar a pesar de que sólo uno de ellos era portador de dicha mutación. Del mismo modo que con el caso anterior, aunque las mutaciones en *CA4* sólo han sido relacionadas con DHR en unos pocos casos, estos resultados invitan a la reevaluación de las familias diagnosticadas con esta variante. Por todo lo anterior, hay que tener en cuenta que puede que sea relativamente común que variantes descritas como patogénicas no lo sean realmente, ya que, especialmente en los últimos años, se están identificando una gran cantidad de variantes asociadas a enfermedad que, en la mayoría de los casos, no van acompañadas de estudios funcionales.

Una proporción relativamente alta de los genes asociados a DHR ha sido asociada con más de una de las entidades clínicas recogidas dentro de este grupo de patologías y/o con diferentes modos de herencia (Daiger, y cols., 2007). Aunque a día de hoy no se sabe con exactitud qué mecanismos llevan a esta gran heterogeneidad, se han propuesto varias explicaciones como son el tipo de mutación y su localización en isoformas específicas de tejido (Al-Rashed, y cols., 2012). Esta variabilidad cobra especial interés cuando ocurre entre miembros de una misma familia (variabilidad fenotípica intrafamiliar) o entre familias no relacionadas que portan la misma mutación patogénica (variabilidad fenotípica interfamiliar). En estos casos, la hipótesis más ampliamente aceptada es la presencia de alelos modificadores que atenúen o agraven una determinada enfermedad (Cooper, y cols., 2013; Fahim, y cols., 2011). En los estudios que aquí se presentan se detectaron 2 casos con variabilidad fenotípica intrafamiliar y tres casos con variabilidad fenotípica interfamiliar. En uno de los casos con variabilidad clínica dentro de una misma familia se detectaron dos causas genéticas diferentes para cada una de ellas, siendo el gen *RP1* responsable de la RP y el gen *BBS1* responsable del SBB. En el otro caso, la reevaluación de los datos permitió identificar un tercer alelo en otro gen de DHR que podría estar modificando el fenotipo en uno de los pacientes. Esta variante se

corresponde con la mutación patogénica c.3988G>T de *CRB1* (Avila-Fernandez, y cols., 2010), que agravaría la RP de la paciente índice de una familia portadora de dos mutaciones en *USH2A*.

Por otro lado, los casos en los que se observó variabilidad fenotípica interfamiliar implicaban a las mutaciones previamente descritas p.Met390Arg de *BBS1*, p.Arg257\* de *CERKL* y p.Arg1129Leu de *ABCA4*. Aunque en los dos primeros casos no se encontró una explicación para esta variabilidad, en el tercero de ellos se detectó un tercer alelo que podría estar actuando como modificador del fenotipo (mutación p.Arg396\* de *RPI1*). De esta manera, esta mutación patogénica sería responsable de que la paciente índice muestre una clínica acorde con RP a pesar de que la mutación en *ABCA4* ha sido clásicamente asociada con STGD (Valverde, y cols., 2006). Además de lo anterior, en este trabajo también se han propuesto nuevas correlaciones genotipo-fenotipo para los genes *PDE6B*, *PROM1* y *GUCY2D*. Sin embargo, estos datos no son aún concluyentes debido a la falta de segregación familiar y datos clínicos.

A pesar de que la secuenciación de paneles de genes ha resultado ser una buena herramienta para fines diagnósticos, el estudio de los casos que no han sido resueltos por esta aproximación requiere de otras estrategias que impliquen a un mayor número de regiones génicas. La WES es actualmente la técnica más utilizada para interrogar otras zonas del genoma para el descubrimiento de nuevos genes de enfermedad y/o nuevas regiones relacionadas (Bamshad, y cols., 2011; Mendez-Vidal, y cols., 2013). Sin embargo, aunque esta herramienta permite la identificación de mutaciones en las regiones exónicas de todos los genes del genoma, mutaciones en otras zonas de interés como intrones o regiones reguladoras no podrían ser detectadas. Por este motivo, la WGS está cobrando cada vez más importancia en la investigación de este grupo de enfermedades, aunque su aún elevado coste ha impedido su uso extendido en un mayor número de laboratorios (Ellingford, y cols., 2016).

En este trabajo, se llevó a cabo la WES de una familia previamente analizada, sin resultados positivos, por nuestro panel de 64 genes. Esta secuenciación permitió identificar dos variantes en *SYNE2* (c.20140G>A; p.Asp6714Asn y c.20339G>A; p.Arg6780Gln) que cosegregaban con la enfermedad (RPAR). Este resultado nos llevó a incluir este gen en la siguiente actualización de nuestro panel (panel de 68 genes), lo que hizo que pudiéramos encontrar otras dos mutaciones en este gen (c.3235A>G; p.Thr1079Ala y c.15800A>T; p.Gln5267Leu) que cosegregaban con la RPAR en una segunda familia no relacionada. Estos

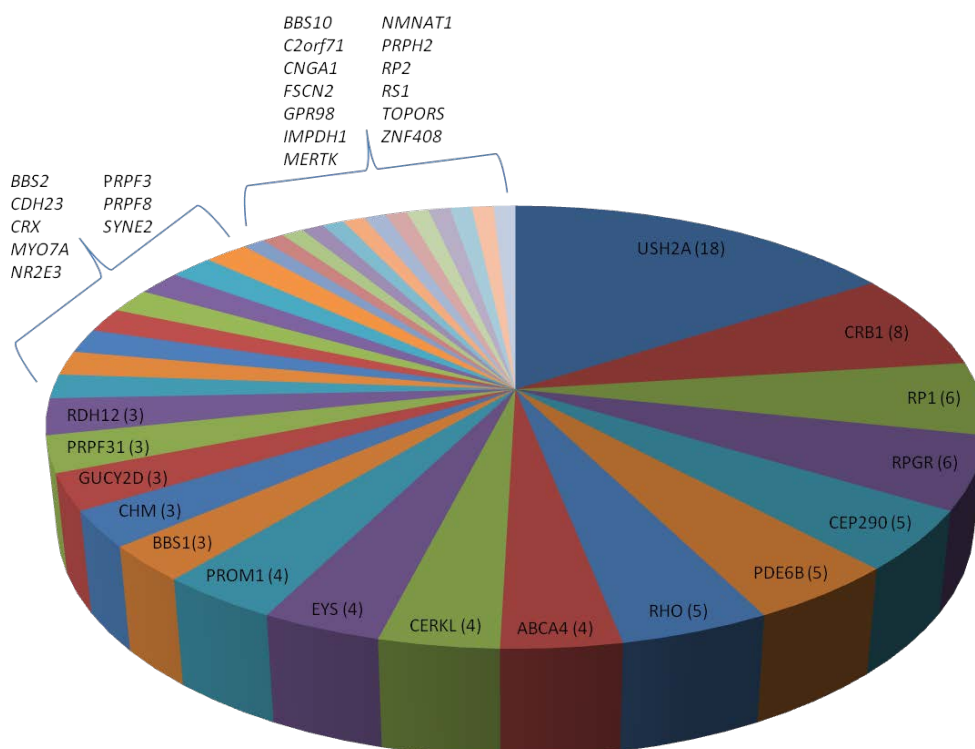


resultados, unidos al hecho de que otros autores han puesto de manifiesto la implicación de este gen en la retinogénesis y ciliogénesis (Dawe, y cols., 2009; Razafsky, y cols., 2013) y que ha sido asociado a anomalías visuales en modelos animales como pez cebra, mosca de la fruta y ratón (Del Bene, y cols., 2008; Patterson, y cols., 2004; Yu, y cols., 2011), nos llevó a considerar este gen como un nuevo candidato de RPAR en humanos y, por tanto, considerar resueltas estas dos familias. Para comprobar si la disminución de expresión correlacionaba con la aparición de un fenotipo (tal y como ocurre en ratones en los que se ha inactivado *Syne2*), llevamos a cabo el silenciamiento de este gen mediante shRNAs en células comerciales del EPR humanas (hTERT-RPE1). Este silenciamiento no causó ningún tipo de efecto, lo que puede deberse a que el porcentaje de silenciamiento obtenido (60%) sea insuficiente para producir un fenotipo de enfermedad. De este modo, sería recomendable probar con otras técnicas que nos permitan obtener una bajada o pérdida de expresión más eficiente, como puede ser la tecnología de modificación de genes por nucleasas dirigidas por ARN del sistema CRISPR/Cas9. También es posible que el modelo celular utilizado no sea el más adecuado y que las células del EPR no se vean afectadas por alteraciones en este gen, para lo que sería conveniente contar, por ejemplo, con fotorreceptores (en los que se ha demostrado que *Syne2* juega un papel fundamental para su supervivencia) derivados de fibroblastos de los pacientes afectados de RP causada por mutaciones en este gen.

Es importante destacar que la mutación espontánea en *Syne2*, c.13978C>T; p.Gln4660\*, ha sido identificada como la causa de la enfermedad del modelo de ratón *cpfl8* (Maddox, y cols., 2015). Además, los ratones mutantes *Syne2*<sup>-/-</sup> presentan unas características visuales acordes a una degeneración retiniana (Yu, y cols., 2011). Esta correspondencia entre el fenotipo presentado en distintas especies por un determinado genotipo no es un hallazgo común debido a las diferencias estructurales y funcionales de las distintas retinas (Kostic y Arsenijevic, 2016). Sin embargo, además de la ya mencionada asociación entre el fenotipo encontrado y las mutaciones en *SYNE2*, en este trabajo se ha observado una correspondencia fenotípica entre humanos y ratón asociada a la mutación p.Arg560Cys de *PDE6B*, ya que es la causa genética responsable de la DHR del modelo de ratón *rd10* (Chang, y cols., 2002) y de la RPAR en una de las familias analizadas en este estudio. Estas similitudes entre distintas especies pueden ser un indicio de la relevancia de estas proteínas en la función visual.

En conjunto, los diversos estudios presentados en este trabajo han permitido determinar la prevalencia de los genes mutados en nuestra población. De las 159 familias analizadas, un total de 114 familias contaron con un diagnóstico molecular tras la finalización

de este trabajo, entre las que encontramos las 20 muestras utilizadas como control positivo. Se detectaron mutaciones patogénicas en 37 de los genes analizados (Figura 19), siendo el gen *USH2A* el más frecuentemente mutado en nuestra población y la principal causa de RPAR, seguido de los genes *CRB1*, *EYS* y *RP1*. Por otro lado, los genes *RHO* y *PRPF31* fueron los más prevalentes en RPAD tal y como se había descrito en estudios previos (Sullivan, y cols., 2006) y, del mismo modo, *RPGR* fue la causa más frecuente de RPLX (Shu, y cols., 2007). Respecto a otras DHR, también hubo concordancias con las frecuencias observadas en otras poblaciones, de forma que el gen *CEP290* fue el que mostró una mayor prevalencia en ACL (den Hollander, y cols., 2006), *ABCA4* fue considerado causal en la mayoría de los casos con STGD (Zernant, y cols., 2014), *BBS1* fue el más frecuente en el SBB (Mykytyn, y cols., 2002) y los genes *USH2A*, *MYO7A* y *CDH3* fueron los más mutados en el síndrome de Usher (Millan, y cols., 2011). Aunque otros estudios también apoyan que *USH2A* es el gen más frecuente causante de RPAR (Glockle, y cols., 2014), es importante tener en cuenta que en gran parte de los pacientes que integran esta cohorte se descartó previamente la implicación del gen *EYS* mediante secuenciación directa de sus 43 exones (Barragan, y cols., 2010), lo que puede explicar que los datos obtenidos de prevalencia de este gen sean inferiores a lo esperado (Abd El-Aziz, y cols., 2008).



**Figura 19: Contribución de cada uno de los genes en nuestra cohorte de DHR.** Se representan el total de casos resueltos con mutaciones en cada uno de los genes. Dos de los casos considerados resueltos no están representados en esta figura ya que sus mutaciones afectaban a más de un gen (*RPGR/RP2* y *OFD1/RS1*, respectivamente) y no es posible saber con seguridad cuál de ellos es el responsable de la enfermedad.

La mayoría de mutaciones causantes de DHR son raras e incluso privadas de una determinada familia. No obstante, existen algunas excepciones de mutaciones que tienen una recurrencia relativamente alta. Uno de los ejemplos más representativos de ello es la ya mencionada mutación p.Cys759Phe de *USH2A*, que ha sido detectada en este trabajo en un total de 7 familias. Del mismo modo, aunque en una menor frecuencia, otras 11 mutaciones han sido identificadas en más de una de las familias incluidas en este estudio (Tabla 2).

**Tabla2: Mutaciones recurrentes en los distintos estudios llevados a cabo.**

Gen	Mutación	Nº Familias
<b>USH2A</b>	p.Cys759Phe	7
<b>CERKL</b>	p.Arg257*	4
<b>ABCA4</b>	p.Arg1129Leu	3
<b>BBS1</b>	p.Met390Arg	3
<b>USH2A</b>	p.Arg303His	3
<b>USH2A</b>	p.Thr3571Met	3
<b>CRB1</b>	p.Cys948Tyr	2
<b>CRB1</b>	p.Ile205Aspfs*13	2
<b>CRB1</b>	p.Arg764Cys	2
<b>CRX</b>	c.(100+1_101-1)(*1097_?)	2
<b>RP1</b>	p.Ser542*	2
<b>USH2A</b>	p.Glu767Serfs*21	2

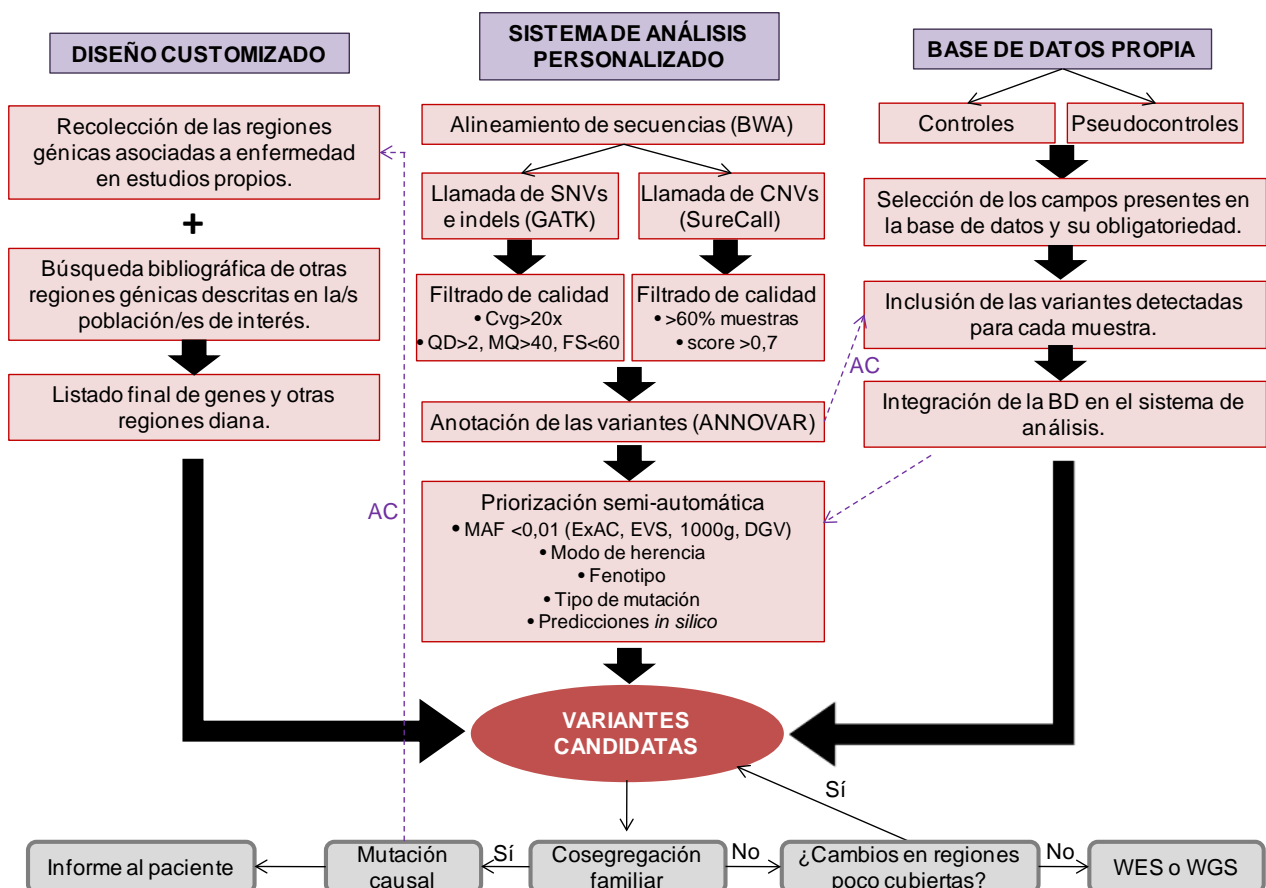
Once de estas 12 mutaciones encontradas de forma recurrente en nuestra cohorte han mostrado ser también frecuentes en otras poblaciones, ya que habían sido asociadas a DHR con anterioridad a este trabajo. Sin embargo, la CNV en *CRX* no había sido previamente descrita a pesar de mostrar, *a priori*, una frecuencia similar a otras mutaciones ampliamente conocidas. Esto puede deberse a la dificultad intrínseca de la detección de este tipo de mutaciones y, junto a las otras 4 CNVs detectadas, apoya la idea de que la implicación de este tipo de mutaciones en este y otros grupo de patologías puede estar subestimada (Almal y Padh, 2012). Algo parecido podría estar ocurriendo con las mutaciones intrónicas o situadas en regiones reguladoras, ya que quedan fuera de la mayoría de aproximaciones que se llevan a cabo (Weisschuh, y cols., 2016). Por este motivo, nuestros paneles han sido diseñados para cubrir las regiones intrónicas flanqueantes a los exones y algunas de las mutaciones intrónicas patogénicas que se conocen actualmente. Esto nos ha permitido detectar una mutación patogénica previamente descrita en un intrón de *CEP290* (c.2991+1655A>G) y sugerir dos nuevas mutaciones patogénicas en los intrones de *IMPDH1* (c.402+57G>A) y *PRPF3* (c.1283-60\_1283-57delATAT). No obstante, en estos diseños no se han incluido

regiones potencialmente interesantes que deberán ser incluidas en posteriores actualizaciones del panel, como pueden ser las regiones intrónicas de *ABCA4* dada su importancia según diversos estudios (Braun, y cols., 2013; Zernant, y cols., 2014).

Como hemos visto, tener un control total de las regiones diana de nuestro panel de genes nos ha permitido conocer las ventajas y limitaciones de nuestro diseño, así como hallar por nosotros mismos la solución a los problemas que han ido surgiendo en la práctica y postular posibles mejoras para nuestro sistema. Además, al tratarse de un diseño personalizado hemos tenido la oportunidad de ir realizando diversas actualizaciones, basadas en los resultados obtenidos, que han ido mejorando progresivamente nuestro diseño. Esta flexibilidad no es posible en diseños cerrados disponibles en múltiples casas comerciales en los que, en muchos casos, la información de los paneles no está disponible públicamente. Además, estos paneles comerciales no permiten adaptar el diseño a las características específicas de cada población, lo que ha sido crucial a la hora de optimizar la relación costo-eficiencia en la práctica clínica. Entre la información obtenida de los diseños realizados durante el desarrollo de este trabajo, cabe destacar que regiones repetitivas tradicionalmente difíciles de estudiar mediante otras aproximaciones, consiguen una cobertura aceptable. Tal es el caso del exón 15 de *RPGR* (*ORF15*), donde hemos sido capaces de identificar mutaciones patogénicas a pesar de ser un dominio cuya secuenciación suele ser problemática debido a su alto contenido en bases nucleotídicas del tipo GC (Vervoort, y cols., 2000). Además, la inclusión de esta región repetitiva tampoco altera la armonía del resto del diseño, ya que un panel de prueba puso de manifiesto que su eliminación no afecta a los datos de calidad obtenidos.

Del mismo modo, desarrollar un algoritmo bioinformático ajustado a las características y necesidades de nuestro proyecto nos ha permitido disponer de un sistema de análisis productivo que proporciona un control absoluto sobre la naturaleza de los datos generados por NGS y, por tanto, de la calidad del proceso. Este hecho es sumamente prioritario para la práctica clínica por razones médico-legales (Gullapalli, y cols., 2012a; Gullapalli, y cols., 2012b). Además, este control también implica una gran versatilidad ya que, al igual que ocurría con los diseños no comerciales, ofrece la posibilidad de realizar modificaciones en función de los resultados obtenidos. La decisión de utilizar un sistema de análisis personalizado, basado en la combinación de paquetes de programas disponibles públicamente, en lugar de un sistema de análisis comercial, puede tener un efecto favorable sobre la efectividad del proceso y facilitar la interpretación de los datos (Gullapalli, y cols.,

2012a). Esta hipótesis se confirmó al llevar a cabo un ensayo comparativo entre el sistema de análisis desarrollado en esta tesis doctoral y el programa SureCall (Agilent, v2.1). El resultado mostró que aunque ninguna de las aproximaciones dio lugar a falsos positivos, SureCall obtuvo una tasa de falsos negativos alrededor del 7% frente al 0% de nuestra estrategia basada en la secuencia de pasos mostrada en la figura 20. Como se ha mencionado anteriormente, este flujo de trabajo ha ido desarrollándose y optimizándose conforme a los resultados obtenidos en los estudios aquí presentados, lo que explica las diferencias entre el algoritmo de análisis final, reflejado en la figura 20, y el inicial, presentado en el primer artículo científico de esta tesis doctoral. Aunque existen considerables diferencias, hay que destacar el hecho de que la secuenciación Sanger pasaría de ser necesaria a prescindible para la validación de las variantes encontradas ya que, como se ha comentado anteriormente (ver apartado 1.3.2.), las nuevas tecnologías de secuenciación masiva están mostrando tener una sensibilidad incluso superior a las técnicas convencionales (Beck, y cols., 2016). Esto supone un importante abaratamiento del proceso diagnóstico.



**Figura 20: Algoritmo diagnóstico y bioinformático actual para las DHR.** AC: Actualización continua; BD: Base de datos; Cvg: Cobertura media; DGV: *Database of Genomic Variants*; EVS: *Exome Variant Server*; ExAC: *Exome Aggregation Consortium*; FS: p-valor del test exacto de Fisher en escala Phred, usado para identificar variantes que no hayan sido detectadas de forma equitativa en las dos cadenas de ADN (*strand-bias*); MQ: Parámetro de calidad del alineamiento; 1000g: Proyecto 1000 genomas; QD: Parámetro de calidad normalizado según la cobertura.

En último lugar, hay que mencionar que más allá del diagnóstico genético que se ha hecho posible gracias a las estrategias que aquí se han llevado a cabo, los datos genéticos que se han generado pueden ser en sí mismos una herramienta útil para futuros estudios ya que, en conjunto, contienen información sobre variantes comunes de nuestra población y artefactos frecuentes. Para ello, es importante desarrollar una base de datos que contenga toda la información genómica generada y que permita acceder a ella de una forma fácil y segura. De esta manera, la base de datos nos permitirá, según crezca, extraer frecuencias cada vez más exactas de variantes de población por lo que sería cada vez más precisa y útil como herramienta de priorización de otras variantes identificadas. Esta base de datos ya está en funcionamiento (Figura 20) y se ha ido completando a medida que se han ido realizando los diferentes estudios que comprende esta tesis doctoral, de forma que actualmente contiene casi 8000 variantes, de las cuales en torno al 10% son variantes exónicas. Su implementación en el análisis de los datos aquí presentados ha puesto de manifiesto su eficacia como herramienta de priorización, aunque ésta será mayor conforme la cantidad de información vaya aumentando. A este respecto, sería de gran utilidad que la base de datos incluyera la información resultante de estudios que impliquen a diferentes patologías y/o individuos control, pudiendo conseguir finalmente una base de datos propia de población control y pseudo-control (enfermos con otras patologías). No obstante, la máxima eficiencia de este sistema se conseguiría si todo el algoritmo aquí desarrollado fuera integrado en los servicios telemáticos de los sistemas de salud (historia clínica digitalizada). Esta integración sería una aplicación futura de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral y permitiría culminar el proceso al permitir llevar a cabo una medicina traslacional con aplicaciones clínicas de medicina personalizada.

---

# 5. CONCLUSIONES

---





1. La NGS es una herramienta poderosa para el diagnóstico molecular de enfermedades heterogéneas como las DHR, y nos ha permitido identificar la causa genética de este grupo de patologías en el 67.6% de los casos.
2. La secuenciación de un panel de genes ha permitido la identificación del defecto genético subyacente en dos familias no resueltas mediante la secuenciación del exoma completo, lo que pone de manifiesto su eficiencia como primera opción del proceso diagnóstico, al suponer un menor coste económico, agilizar el análisis e interpretación de los datos, facilitar el almacenamiento de los datos y disminuir la frecuencia de falsos negativos debidos a una baja cobertura.
3. El uso de paneles de genes específicos de una determinada población es una aproximación eficaz para el diagnóstico de las DHR y permite obtener una tasa diagnóstica elevada y similar a la de paneles de mayor tamaño a un menor coste.
4. La secuenciación de una cohorte de DHR no clasificada clínica o genéticamente mediante un panel de genes asociados a distintos fenotipos constituye una aproximación libre de hipótesis prefijadas que ha permitido la reclasificación clínica y reasignación del modo de herencia en el 27,6% de los casos.
5. Los hallazgos encontrados en una familia española en la que la mutación homocigota p.Cys759Phe del gen *USH2A* no cosegregaba cuestionan la patogenicidad de esta mutación y hace necesaria la reevaluación de los casos diagnosticados con esta mutación en homocigosis.
6. Aunque el modo de herencia más común de los casos aislados de RP es el autosómico recesivo (~62% en este estudio), se deberían tener en cuenta otros patrones de herencia que implican una mayor repercusión familiar (autosómico dominante y ligado al cromosoma X) y que podrían estar siendo subestimados (~38% en este estudio).
7. Nuestra aproximación basada en NGS ha mostrado ser eficaz para la identificación de CNVs ya que este tipo de mutaciones han sido identificadas como la causa de la enfermedad en un total de 6 casos, lo que indica que la implicación de estas variantes en la aparición y desarrollo de las DHR podría haber sido subestimada debido a la dificultad inherente a su detección.

8. La gran variabilidad fenotípica intra- e inter- familiar observada en dos de las familias analizadas podría ser explicada, en parte, por la presencia de alelos modificadores del fenotipo localizados en otros genes de DHR como *CRB1* y *RP1*, respectivamente.
9. La detección de variantes potencialmente patogénicas en el gen *SYNE2* en dos familias no relacionadas, así como la asociación de este gen con anomalías visuales en modelos animales, sugieren que podría ser un nuevo gen candidato de RPAR.
10. Los genes más comúnmente mutados en nuestra población son *USH2A*, *CRB1*, *EYS* y *RP1* para los casos de RPAR, *RHO* y *PRPF31* para los casos de RPAD, *RPGR* para los casos de RPLX, *CEP290* para los casos de ACL, *ABCA4* para los casos de STGD, *BBS1* para los casos de SBB y *USH2A*, *CDH23* y *MYO7A* para los casos de USH.
11. El desarrollo de nuevos algoritmos diagnósticos y bioinformáticos, ajustados a las necesidades propias de nuestro laboratorio, nos ha permitido conseguir un mayor control sobre los datos generados, facilitando la interpretación de los resultados y permitiendo obtener una mayor eficiencia y flexibilidad.
12. Aquellos casos no diagnosticados mediante las técnicas utilizadas en este estudio serán susceptibles de ser analizados mediante otras estrategias que impliquen un mayor número de genes o de regiones génicas, permitiendo así identificar mutaciones en zonas no codificantes del genoma o en *loci* no previamente asociados con la enfermedad.

---

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

---



- Abd El-Aziz MM, Barragan I, O'Driscoll CA, Goodstadt L, Prigmore E, Borrego S, Mena M, Pieras JI, El-Ashry MF, Safieh LA, Shah A, Cheetham ME, Carter NP, Chakarova C, Ponting CP, Bhattacharya SS, Antinolo G. EYS, encoding an ortholog of *Drosophila* spacemaker, is mutated in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 40(11):1285-7. **2008**.
- Abd El-Aziz MM, O'Driscoll CA, Kaye RS, Barragan I, El-Ashry MF, Borrego S, Antinolo G, Pang CP, Webster AR, Bhattacharya SS. Identification of novel mutations in the ortholog of *Drosophila* eyes shut gene (EYS) causing autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(8):4266-72. **2010**.
- Al-Rashed M, Abu Safieh L, Alkuraya H, Aldahmesh MA, Alzahrani J, Diya M, Hashem M, Hardcastle AJ, Al-Hazaa SA, Alkuraya FS. RP1 and retinitis pigmentosa: report of novel mutations and insight into mutational mechanism. *Br J Ophthalmol* 96(7):1018-22. **2012**.
- Aldahmesh MA, Safieh LA, Alkuraya H, Al-Rajhi A, Shamseldin H, Hashem M, Alzahrani F, Khan AO, Alqahtani F, Rahbeeni Z, Alowain M, Khalak H, Al-Hazaa S, Meyer BF, Alkuraya FS. Molecular characterization of retinitis pigmentosa in Saudi Arabia. *Mol Vis* 15:2464-9. **2009**.
- Almal SH, Padh H. Implications of gene copy-number variation in health and diseases. *J Hum Genet* 57(1):6-13. **2012**.
- Alvarez BV, Vithana EN, Yang Z, Koh AH, Yeung K, Yong V, Shandro HJ, Chen Y, Kolatkar P, Palasingam P, Zhang K, Aung T, Casey JR. Identification and characterization of a novel mutation in the carbonic anhydrase IV gene that causes retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(8):3459-68. **2007**.
- Audo I, Bujakowska KM, Leveillard T, Mohand-Said S, Lancelot ME, Germain A, Antonio A, Michiels C, Saraiva JP, Letexier M, Sahel JA, Bhattacharya SS, Zeitz C. Development and application of a next-generation-sequencing (NGS) approach to detect known and novel gene defects underlying retinal diseases. *Orphanet J Rare Dis* 7:8. **2012**.
- Audo I, Sahel JA, Mohand-Said S, Lancelot ME, Antonio A, Moskova-Doumanova V, Nandrot EF, Doumanov J, Barragan I, Antinolo G, Bhattacharya SS, Zeitz C. EYS is a major gene for rod-cone dystrophies in France. *Hum Mutat* 31(5):E1406-35. **2010**.
- Autore F, Pfuhl M, Quan X, Williams A, Roberts RG, Shanahan CM, Fraternali F. Large-scale modelling of the divergent spectrin repeats in nesprins: giant modular proteins. *PLoS One* 8(5):e63633. **2013**.
- Avila-Fernandez A, Cantalapiedra D, Aller E, Vallespin E, Aguirre-Lamban J, Blanco-Kelly F, Corton M, Riveiro-Alvarez R, Allikmets R, Trujillo-Tiebas MJ, Millan JM, Cremers FP, Ayuso C. Mutation analysis of 272 Spanish families affected by autosomal recessive retinitis pigmentosa using a genotyping microarray. *Mol Vis* 16:2550-8. **2010**.
- Avila-Fernandez A, Corton M, Nishiguchi KM, Munoz-Sanz N, Benavides-Mori B, Blanco-Kelly F, Riveiro-Alvarez R, Garcia-Sandoval B, Rivolta C, Ayuso C. Identification of an RP1 prevalent founder mutation and related phenotype in Spanish patients with early-onset autosomal recessive retinitis. *Ophthalmology* 119(12):2616-21. **2012**.
- Avila-Fernandez A, Perez-Carro R, Corton M, Lopez-Molina MI, Campello L, Garanto A, Fernandez-Sanchez L, Duijkers L, Lopez-Martinez MA, Riveiro-Alvarez R, Da Silva LR, Sanchez-Alcudia R, Martin-Garrido E, Reyes N, Garcia-Garcia F, Dopazo J, Garcia-Sandoval B, Collin RW, Cuenca N, Ayuso C. Whole-exome sequencing reveals ZNF408 as a new gene associated with autosomal recessive retinitis pigmentosa with vitreal alterations. *Hum Mol Genet* 24(14):4037-48. **2015**.
- Ayuso C, Garcia-Sandoval B, Najera C, Valverde D, Carballo M, Antinolo G. Retinitis pigmentosa in Spain. The Spanish Multicentric and Multidisciplinary Group for Research into Retinitis Pigmentosa. *Clin Genet* 48(3):120-2. **1995**.

- Ayuso C, Millan JM. Retinitis pigmentosa and allied conditions today: a paradigm of translational research. *Genome Med* 2(5):34. **2010**.
- Ayuso C, Trujillo MJ, Sanz R, García-Sandoval B. Genetic epidemiology of retinitis pigmentosa in Spain. *Med Genetik* 9:33. **1997**.
- Badano JL, Kim JC, Hoskins BE, Lewis RA, Ansley SJ, Cutler DJ, Castellan C, Beales PL, Leroux MR, Katsanis N. Heterozygous mutations in BBS1, BBS2 and BBS6 have a potential epistatic effect on Bardet-Biedl patients with two mutations at a second BBS locus. *Hum Mol Genet* 12(14):1651-9. **2003**.
- Badano JL, Leitch CC, Ansley SJ, May-Simera H, Lawson S, Lewis RA, Beales PL, Dietz HC, Fisher S, Katsanis N. Dissection of epistasis in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 439(7074):326-30. **2006**.
- Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N, Petersen-Jones S, Bhattacharya SS, Thrasher AJ, Fitzke FW, Carter BJ, Rubin GS, Moore AT, Ali RR. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358(21):2231-9. **2008**.
- Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, Shendure J. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 12(11):745-55. **2011**.
- Barragan I, Borrego S, Pieras JI, Gonzalez-del Pozo M, Santoyo J, Ayuso C, Baiget M, Millan JM, Mena M, Abd El-Aziz MM, Audo I, Zeitz C, Littink KW, Dopazo J, Bhattacharya SS, Antinolo G. Mutation spectrum of EYS in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Mutat* 31(11):E1772-800. **2010**.
- Beales PL, Badano JL, Ross AJ, Ansley SJ, Hoskins BE, Kirsten B, Mein CA, Froguel P, Scambler PJ, Lewis RA, Lupski JR, Katsanis N. Genetic interaction of BBS1 mutations with alleles at other BBS loci can result in non-Mendelian Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet* 72(5):1187-99. **2003**.
- Beales PL, Elcioglu N, Woolf AS, Parker D, Flinter FA. New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J Med Genet* 36(6):437-46. **1999**.
- Beck TF, Mullikin JC, Biesecker LG. Systematic Evaluation of Sanger Validation of Next-Generation Sequencing Variants. *Clin Chem* 62(4):647-54. **2016**.
- Berger W, Kloeckener-Gruissem B, Neidhardt J. The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res* 29(5):335-75. **2010**.
- Bernal S, Ayuso C, Antinolo G, Gimenez A, Borrego S, Trujillo MJ, Marcos I, Calaf M, Del Rio E, Baiget M. Mutations in USH2A in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa: high prevalence and phenotypic variation. *J Med Genet* 40(1):e8. **2003**.
- Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Hayes KC, Nicholson BW, Weigel-DiFranco C, Willett W. Vitamin A supplementation for retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 111(11):1456-9. **1993**.
- Birch DG, Weleber RG, Duncan JL, Jaffe GJ, Tao W. Randomized trial of ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol* 156(2):283-292 e1. **2013**.
- Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet* 33 Suppl:228-37. **2003**.
- Branton D, Deamer DW, Marziali A, Bayley H, Benner SA, Butler T, Di Ventra M, Garaj S, Hibbs A, Huang X, Jovanovich SB, Krstic PS, Lindsay S, Ling XS, Mastrangelo CH, Meller A, Oliver JS, Pershin YV, Ramsey JM, Riehn R, Soni GV, Tabard-Cossa V, Wanunu M, Wiggin M, Schloss JA. The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol* 26(10):1146-53. **2008**.

- Braun TA, Mullins RF, Wagner AH, Andorf JL, Johnston RM, Bakall BB, Deluca AP, Fishman GA, Lam BL, Weleber RG, Cideciyan AV, Jacobson SG, Sheffield VC, Tucker BA, Stone EM. Non-exomic and synonymous variants in ABCA4 are an important cause of Stargardt disease. *Hum Mol Genet* 22(25):5136-45. **2013**.
- Bridges CD. 11-Cis vitamin A in dark-adapted rod outer segments is a probable source of prosthetic groups for rhodopsin biosynthesis. *Nature* 259(5540):247-8. **1976**.
- Carneiro MO, Russ C, Ross MG, Gabriel SB, Nusbaum C, DePristo MA. Pacific biosciences sequencing technology for genotyping and variation discovery in human data. *BMC Genomics* 13:375. **2012**.
- Consugar MB, Navarro-Gomez D, Place EM, Bujakowska KM, Sousa ME, Fonseca-Kelly ZD, Taub DG, Janessian M, Wang DY, Au ED, Sims KB, Sweetser DA, Fulton AB, Liu Q, Wiggs JL, Gai X, Pierce EA. Panel-based genetic diagnostic testing for inherited eye diseases is highly accurate and reproducible, and more sensitive for variant detection, than exome sequencing. *Genet Med* 17(4):253-61. **2015**.
- Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C, Tyler-Smith C, Kehrer-Sawatzki H. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum Genet* 132(10):1077-130. **2013**.
- Chacon-Camacho OF, Zenteno JC. Review and update on the molecular basis of Leber congenital amaurosis. *World J Clin Cases* 3(2):112-24. **2015**.
- Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Heckenlively JR. Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res* 42(4):517-25. **2002**.
- Chang B, Hawes NL, Pardue MT, German AM, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Rengarajan K, Boyd AP, Sidney SS, Phillips MJ, Stewart RE, Chaudhury R, Nickerson JM, Heckenlively JR, Boatright JH. Two mouse retinal degenerations caused by missense mutations in the beta-subunit of rod cGMP phosphodiesterase gene. *Vision Res* 47(5):624-33. **2007**.
- Chen J, Simon MI, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM. Increased susceptibility to light damage in an arrestin knockout mouse model of Oguchi disease (stationary night blindness). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(12):2978-82. **1999**.
- Chen LJ, Lai TY, Tam PO, Chiang SW, Zhang X, Lam S, Lai RY, Lam DS, Pang CP. Compound heterozygosity of two novel truncation mutations in RP1 causing autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(4):2236-42. **2010**.
- Chiang JP, Trzuppek K. The current status of molecular diagnosis of inherited retinal dystrophies. *Curr Opin Ophthalmol* 26(5):346-51. **2015**.
- Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 125(2):151-8. **2007**.
- Daiger SP, Sullivan LS, Bowne S. **2016**. Retinal Information Network: The University of Texas Health Science Center, Houston, Texas. <http://www.retnet.org>.
- Daiger SP, Sullivan LS, Gire AI, Birch DG, Heckenlively JR, Bowne SJ. Mutations in known genes account for 58% of autosomal dominant retinitis pigmentosa (adRP). *Adv Exp Med Biol* 613:203-9. **2008**.
- Damiani D, Alexander JJ, O'Rourke JR, McManus M, Jadhav AP, Cepko CL, Hauswirth WW, Harfe BD, Strettoi E. Dicer inactivation leads to progressive functional and structural degeneration of the mouse retina. *J Neurosci* 28(19):4878-87. **2008**.
- Dawe HR, Adams M, Wheway G, Szymanska K, Logan CV, Noegel AA, Gull K, Johnson CA. Nesprin-2 interacts with meckelin and mediates ciliogenesis via remodelling of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 122(Pt 15):2716-26. **2009**.
- de Vries SE, Baccus SA, Meister M. The projective field of a retinal amacrine cell. *J Neurosci* 31(23):8595-604. **2011**.

- Del Bene F, Wehman AM, Link BA, Baier H. Regulation of neurogenesis by interkinetic nuclear migration through an apical-basal notch gradient. *Cell* 134(6):1055-65. **2008**.
- Demos C, Bandyopadhyay M, Rohrer B. Identification of candidate genes for human retinal degeneration loci using differentially expressed genes from mouse photoreceptor dystrophy models. *Mol Vis* 14:1639-49. **2008**.
- den Hollander AI, Black A, Bennett J, Cremers FP. Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies. *J Clin Invest* 120(9):3042-53. **2010**.
- den Hollander AI, Koenekoop RK, Yzer S, Lopez I, Arends ML, Voesenek KE, Zonneveld MN, Strom TM, Meitinger T, Brunner HG, Hoyng CB, van den Born LI, Rohrschneider K, Cremers FP. Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* 79(3):556-61. **2006**.
- Dopazo J, Amadoz A, Bleda M, Garcia-Alonso L, Aleman A, Garcia-Garcia F, Rodriguez JA, Daub JT, Muntane G, Rueda A, Vela-Boza A, Lopez-Domingo FJ, Florido JP, Arce P, Ruiz-Ferrer M, Mendez-Vidal C, Arnold TE, Spleiss O, Alvarez-Tejado M, Navarro A, Bhattacharya SS, Borrego S, Santoyo-Lopez J, Antinolo G. 267 Spanish Exomes Reveal Population-Specific Differences in Disease-Related Genetic Variation. *Mol Biol Evol* 33(5):1205-18. **2016**.
- Dowling JE. *The Retina: An Approachable Part of the Brain*: Belknap Press of Harvard University Press. **1987**.
- Dryja TP, Hahn LB, Kajiwara K, Berson EL. Dominant and digenic mutations in the peripherin/RDS and ROM1 genes in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(10):1972-82. **1997**.
- Dvir L, Srour G, Abu-Ras R, Miller B, Shalev SA, Ben-Yosef T. Autosomal-recessive early-onset retinitis pigmentosa caused by a mutation in PDE6G, the gene encoding the gamma subunit of rod cGMP phosphodiesterase. *Am J Hum Genet* 87(2):258-64. **2010**.
- Ebermann I, Phillips JB, Liebau MC, Koenekoop RK, Schermer B, Lopez I, Schafer E, Roux AF, Dafinger C, Bernd A, Zrenner E, Claustres M, Blanco B, Nurnberg G, Nurnberg P, Ruland R, Westerfield M, Benzing T, Bolz HJ. PDZD7 is a modifier of retinal disease and a contributor to digenic Usher syndrome. *J Clin Invest* 120(6):1812-23. **2010**.
- Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, Peluso P, Rank D, Baybayan P, Bettman B, Bibillo A, Bjornson K, Chaudhuri B, Christians F, Cicero R, Clark S, Dalal R, Dewinter A, Dixon J, Foquet M, Gaertner A, Hardenbol P, Heiner C, Hester K, Holden D, Kearns G, Kong X, Kuse R, Lacroix Y, Lin S, Lundquist P, Ma C, Marks P, Maxham M, Murphy D, Park I, Pham T, Phillips M, Roy J, Sebra R, Shen G, Sorenson J, Tomaney A, Travers K, Trulson M, Vieceli J, Wegener J, Wu D, Yang A, Zaccarin D, Zhao P, Zhong F, Korlach J, Turner S. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science* 323(5910):133-8. **2009**.
- Eisenberger T, Neuhaus C, Khan AO, Decker C, Preising MN, Friedburg C, Bieg A, Gliem M, Charbel Issa P, Holz FG, Baig SM, Hellenbroich Y, Galvez A, Platzer K, Wollnik B, Laddach N, Ghaffari SR, Rafati M, Botzenhart E, Tinschert S, Borger D, Bohring A, Schreml J, Kortge-Jung S, Schell-Apacik C, Bakur K, Al-Aama JY, Neuhann T, Herkenrath P, Nurnberg G, Nurnberg P, Davis JS, Gal A, Bergmann C, Lorenz B, Bolz HJ. Increasing the yield in targeted next-generation sequencing by implicating CNV analysis, non-coding exons and the overall variant load: the example of retinal dystrophies. *PLoS One* 8(11):e78496. **2013**.
- Ellingford JM, Barton S, Bhaskar S, Williams SG, Sergouniotis PI, O'Sullivan J, Lamb JA, Perveen R, Hall G, Newman WG, Bishop PN, Roberts SA, Leach R, Tearle R, Bayliss S, Ramsden SC, Nemeth AH, Black GC. Whole Genome Sequencing Increases Molecular Diagnostic



- Yield Compared with Current Diagnostic Testing for Inherited Retinal Disease. *Ophthalmology* 123(5):1143-50. **2016**.
- Estrada-Cuzcano A, Koenekoop RK, Senechal A, De Baere EB, de Ravel T, Banfi S, Kohl S, Ayuso C, Sharon D, Hoyng CB, Hamel CP, Leroy BP, Ziviello C, Lopez I, Bazinet A, Wissinger B, Sliesoraityte I, Avila-Fernandez A, Littink KW, Vingolo EM, Signorini S, Banin E, Mizrahi-Meissonnier L, Zrenner E, Kellner U, Collin RW, den Hollander AI, Cremers FP, Klevering BJ. BBS1 mutations in a wide spectrum of phenotypes ranging from nonsyndromic retinitis pigmentosa to Bardet-Biedl syndrome. *Arch Ophthalmol* 130(11):1425-32. **2012a**.
- Estrada-Cuzcano A, Roepman R, Cremers FP, den Hollander AI, Mans DA. Non-syndromic retinal ciliopathies: translating gene discovery into therapy. *Hum Mol Genet* 21(R1):R111-24. **2012b**.
- Fahim AT, Bowne SJ, Sullivan LS, Webb KD, Williams JT, Wheaton DK, Birch DG, Daiger SP. Allelic heterogeneity and genetic modifier loci contribute to clinical variation in males with X-linked retinitis pigmentosa due to RPGR mutations. *PLoS One* 6(8):e23021. **2011**.
- Fahim AT, Daiger SP, Weleber RG. Retinitis Pigmentosa Overview. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Fong CT, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, editors. GeneReviews(R). Seattle (WA). **1993**.
- Fain GL, Matthews HR, Cornwall MC, Koutalos Y. Adaptation in vertebrate photoreceptors. *Physiol Rev* 81(1):117-151. **2001**.
- Ferrari S, Di Iorio E, Barbaro V, Ponzin D, Sorrentino FS, Parmeggiani F. Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Curr Genomics* 12(4):238-49. **2011**.
- Forsythe E, Beales PL. Bardet-Biedl syndrome. *Eur J Hum Genet* 21(1):8-13. **2013**.
- Fu Y, Yau KW. Phototransduction in mouse rods and cones. *Pflugers Arch* 454(5):805-19. **2007**.
- Garin M. Retinitis Pigmentosa: Symptoms, Treatment and Risks. **2014**. <http://www.eyehalthweb.com/retinitis-pigmentosa/>.
- Gerth C, Zawadzki RJ, Werner JS, Heon E. Retinal morphology in patients with BBS1 and BBS10 related Bardet-Biedl Syndrome evaluated by Fourier-domain optical coherence tomography. *Vision Res* 48(3):392-9. **2008**.
- Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA. Unlocking Mendelian disease using exome sequencing. *Genome Biol* 12(9):228. **2011**.
- Glenn TC. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol Ecol Resour* 11(5):759-69. **2011**.
- Glockle N, Kohl S, Mohr J, Scheurenbrand T, Sprecher A, Weisschuh N, Bernd A, Rudolph G, Schubach M, Poloschek C, Zrenner E, Biskup S, Berger W, Wissinger B, Neidhardt J. Panel-based next generation sequencing as a reliable and efficient technique to detect mutations in unselected patients with retinal dystrophies. *Eur J Hum Genet* 22(1):99-104. **2014**.
- Gonzalez-Del Pozo M, Mendez-Vidal C, Santoyo-Lopez J, Vela-Boza A, Bravo-Gil N, Rueda A, Garcia-Alonso L, Vazquez-Marouschek C, Dopazo J, Borrego S, Antinolo G. Deciphering intrafamilial phenotypic variability by exome sequencing in a Bardet-Biedl family. *Mol Genet Genomic Med* 2(2):124-33. **2014**.
- González R. 2014. Histología retina.
- Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 17(6):333-51. **2016**.
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. An Introduction to Genetic Analysis. New York: W.H. Freeman. **2000**.

- Grover AK, Samson SE. Antioxidants and vision health: facts and fiction. *Mol Cell Biochem* 388(1-2):173-83. **2014**.
- Gullapalli RR, Desai KV, Santana-Santos L, Kant JA, Becich MJ. Next generation sequencing in clinical medicine: Challenges and lessons for pathology and biomedical informatics. *J Pathol Inform* 3:40. **2012a**.
- Gullapalli RR, Lyons-Weiler M, Petrosko P, Dhir R, Becich MJ, LaFramboise WA. Clinical integration of next-generation sequencing technology. *Clin Lab Med* 32(4):585-99. **2012b**.
- Hamel C. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis* 1:40. **2006**.
- Hamel CP. Cone rod dystrophies. *Orphanet J Rare Dis* 2:7. **2007**.
- Hargrave PA, McDowell JH, Feldmann RJ, Atkinson PH, Rao JK, Argos P. Rhodopsin's protein and carbohydrate structure: selected aspects. *Vision Res* 24(11):1487-99. **1984**.
- Harris GS, Miller JR. Choroideremia. Visual defects in a heterozygote. *Arch Ophthalmol* 80(4):423-9. **1968**.
- Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368(9549):1795-809. **2006**.
- Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L, Conlon TJ, Boye SL, Flotte TR, Byrne BJ, Jacobson SG. Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther* 19(10):979-90. **2008**.
- Heckenlively JR, Rodriguez JA, Daiger SP. Autosomal dominant sectoral retinitis pigmentosa. Two families with transversion mutation in codon 23 of rhodopsin. *Arch Ophthalmol* 109(1):84-91. **1991**.
- Horner DS, Pavesi G, Castrignano T, De Meo PD, Liuni S, Sammeth M, Picardi E, Pesole G. Bioinformatics approaches for genomics and post genomics applications of next-generation sequencing. *Brief Bioinform* 11(2):181-97. **2010**.
- Huang XF, Huang F, Wu KC, Wu J, Chen J, Pang CP, Lu F, Qu J, Jin ZB. Genotype-phenotype correlation and mutation spectrum in a large cohort of patients with inherited retinal dystrophy revealed by next-generation sequencing. *Genet Med* 17(4):271-8. **2015**.
- Hufnagel RB, Ahmed ZM, Correa ZM, Sisk RA. Gene therapy for Leber congenital amaurosis: advances and future directions. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 250(8):1117-28. **2012**.
- Hung SS, McCaughey T, Swann O, Pebay A, Hewitt AW. Genome engineering in ophthalmology: Application of CRISPR/Cas to the treatment of eye disease. *Prog Retin Eye Res*. **2016**.
- Hwang JC, Zernant J, Allikmets R, Barile GR, Chang S, Smith RT. Peripapillary atrophy in Stargardt disease. *Retina* 29(2):181-6. **2009**.
- Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, Heon E, Schwartz SB, Roman AJ, Peden MC, Aleman TS, Boye SL, Sumaroka A, Conlon TJ, Calcedo R, Pang JJ, Erger KE, Olivares MB, Mullins CL, Swider M, Kaushal S, Feuer WJ, Iannaccone A, Fishman GA, Stone EM, Byrne BJ, Hauswirth WW. Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Arch Ophthalmol* 130(1):9-24. **2012**.
- Jin X, Qu LH, Meng XH, Xu HW, Yin ZQ. Detecting genetic variations in hereditary retinal dystrophies with next-generation sequencing technology. *Mol Vis* 20:553-60. **2014**.
- Jin ZB, Mandai M, Yokota T, Higuchi K, Ohmori K, Ohtsuki F, Takakura S, Itabashi T, Wada Y, Akimoto M, Ooto S, Suzuki T, Hiramami Y, Ikeda H, Kawagoe N, Oishi A, Ichiyama S, Takahashi M, Yoshimura N, Kosugi S. Identifying pathogenic genetic background of simplex or multiplex retinitis pigmentosa patients: a large scale mutation screening study. *J Med Genet* 45(7):465-72. **2008**.
- Junqueira LC, Carneiro J. Histología básica. Barcelona: Salvat Editores. **1987**.

- Kaiserman N, Obolensky A, Banin E, Sharon D. Novel USH2A mutations in Israeli patients with retinitis pigmentosa and Usher syndrome type 2. *Arch Ophthalmol* 125(2):219-24. **2007**.
- Kastner S, Thiemann IJ, Dekomien G, Petrasch-Parwez E, Schreiber S, Akkad DA, Gerding WM, Hoffjan S, Gunes S, Bagci H, Epplen JT. Exome Sequencing Reveals AGBL5 as Novel Candidate Gene and Additional Variants for Retinitis Pigmentosa in Five Turkish Families. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56(13):8045-53. **2015**.
- Katsanis N, Ansley SJ, Badano JL, Eichers ER, Lewis RA, Hoskins BE, Scambler PJ, Davidson WS, Beales PL, Lupski JR. Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science* 293(5538):2256-9. **2001**.
- Kauppinen A, Paterno JJ, Blasiak J, Salminen A, Kaarniranta K. Inflammation and its role in age-related macular degeneration. *Cell Mol Life Sci* 73(9):1765-86. **2016**.
- Kawamura S. Rhodopsin phosphorylation as a mechanism of cyclic GMP phosphodiesterase regulation by S-modulin. *Nature* 362(6423):855-7. **1993**.
- Kawamura S, Takamatsu K, Kitamura K. Purification and characterization of S-modulin, a calcium-dependent regulator on cGMP phosphodiesterase in frog rod photoreceptors. *Biochem Biophys Res Commun* 186(1):411-7. **1992**.
- Kefalov VJ, Cornwall MC, Fain GL. Physiological studies of the interaction between opsin and chromophore in rod and cone visual pigments. *Methods Mol Biol* 652:95-114. **2010**.
- Khan SA, Muhammad N, Khan MA, Kamal A, Rehman ZU, Khan S. Genetics of Human Bardet-Biedl Syndrome, an Updates. *Clin Genet*. **2016**.
- King SJ, Nowak K, Suryavanshi N, Holt I, Shanahan CM, Ridley AJ. Nesprin-1 and nesprin-2 regulate endothelial cell shape and migration. *Cytoskeleton (Hoboken)* 71(7):423-34. **2014**.
- Koenekoop RK. An overview of Leber congenital amaurosis: a model to understand human retinal development. *Surv Ophthalmol* 49(4):379-98. **2004**.
- Koenekoop RK, Loyer M, Hand CK, Al Mahdi H, Dembinska O, Beneish R, Racine J, Rouleau GA. Novel RPGR mutations with distinct retinitis pigmentosa phenotypes in French-Canadian families. *Am J Ophthalmol* 136(4):678-87. **2003**.
- Koren S, Schatz MC, Walenz BP, Martin J, Howard JT, Ganapathy G, Wang Z, Rasko DA, McCombie WR, Jarvis ED, Adam MP. Hybrid error correction and de novo assembly of single-molecule sequencing reads. *Nat Biotechnol* 30(7):693-700. **2012**.
- Kostic C, Arsenijevic Y. Animal modelling for inherited central vision loss. *J Pathol* 238(2):300-10. **2016**.
- Ku CS, Naidoo N, Pawitan Y. Revisiting Mendelian disorders through exome sequencing. *Hum Genet* 129(4):351-70. **2011**.
- Kumaramanickavel G, Maw M, Denton MJ, John S, Srikumari CR, Orth U, Oehlmann R, Gal A. Missense rhodopsin mutation in a family with recessive RP. *Nat Genet* 8(1):10-1. **1994**.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann Y, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P,

- Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsieck G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korfi I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822):860-921. **2001**.
- Larhammar D, Nordstrom K, Larsson TA. Evolution of vertebrate rod and cone phototransduction genes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364(1531):2867-80. **2009**.
- Leitch CC, Zaghoul NA, Davis EE, Stoetzel C, Diaz-Font A, Rix S, Alfadhel M, Lewis RA, Eyaid W, Banin E, Dollfus H, Beales PL, Badano JL, Katsanis N. Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 40(4):443-8. **2008**.
- Lelieveld SH, Spielmann M, Mundlos S, Veltman JA, Gilissen C. Comparison of Exome and Genome Sequencing Technologies for the Complete Capture of Protein-Coding Regions. *Hum Mutat* 36(8):815-22. **2015**.
- Lewis RA, Shroyer NF, Singh N, Allikmets R, Hutchinson A, Li Y, Lupski JR, Leppert M, Dean M. Genotype/Phenotype analysis of a photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, in Stargardt disease. *Am J Hum Genet* 64(2):422-34. **1999**.
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* 2012:251364. **2012**.
- Lombardi ML, Lammerding J. Keeping the LINC: the importance of nucleocytoskeletal coupling in intracellular force transmission and cellular function. *Biochem Soc Trans* 39(6):1729-34. **2011**.
- M'Hamdi O, Ouertani I, Chaabouni-Bouhamed H. Update on the genetics of bardet-biedl syndrome. *Mol Syndromol* 5(2):51-6. **2014**.
- MacDonald IM, Sereda C, McTaggart K, Mah D. Choroideremia gene testing. *Expert Rev Mol Diagn* 4(4):478-84. **2004**.
- MacLaren RE, Groppe M, Barnard AR, Cottrill CL, Tolmachova T, Seymour L, Clark KR, During MJ, Cremers FP, Black GC, Lotery AJ, Downes SM, Webster AR, Seabra MC. Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet* 383(9923):1129-37. **2014**.
- Maddox DM, Collin GB, Ikeda A, Pratt CH, Ikeda S, Johnson BA, Hurd RE, Shopland LS, Naggert JK, Chang B, Krebs MP, Nishina PM. A Mutation in Syne2 Causes Early Retinal Defects in

- Photoreceptors, Secondary Neurons, and Muller Glia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56(6):3776-87. **2015**.
- Maghami MH, Sodagar AM, Lashay A, Riazi-Esfahani H, Riazi-Esfahani M. Visual prostheses: the enabling technology to give sight to the blind. *J Ophthalmic Vis Res* 9(4):494-505. **2014**.
- Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Jr., Mingozzi F, Bennicelli J, Banfi S, Marshall KA, Testa F, Surace EM, Rossi S, Lyubarsky A, Arruda VR, Konkle B, Stone E, Sun J, Jacobs J, Dell'Osso L, Hertle R, Ma JX, Redmond TM, Zhu X, Hauck B, Zelenaia O, Shindler KS, Maguire MG, Wright JF, Volpe NJ, McDonnell JW, Auricchio A, High KA, Bennett J. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358(21):2240-8. **2008**.
- Markand S, Saul A, Tawfik A, Cui X, Rozen R, Smith SB. Mthfr as a modifier of the retinal phenotype of Crb1(rd8/rd8) mice. *Exp Eye Res* 145:164-72. **2016**.
- Mathur P, Yang J. Usher syndrome: Hearing loss, retinal degeneration and associated abnormalities. *Biochim Biophys Acta* 1852(3):406-20. **2015**.
- Maugeri A, Flothmann K, Hemmrich N, Ingvast S, Jorge P, Paloma E, Patel R, Rozet JM, Tammur J, Testa F, Balcells S, Bird AC, Brunner HG, Hoyng CB, Metspalu A, Simonelli F, Allikmets R, Bhattacharya SS, D'Urso M, Gonzalez-Duarte R, Kaplan J, te Meerman GJ, Santos R, Schwartz M, Van Camp G, Wadelius C, Weber BH, Cremers FP. The ABCA4 2588G>C Stargardt mutation: single origin and increasing frequency from South-West to North-East Europe. *Eur J Hum Genet* 10(3):197-203. **2002**.
- Maugeri A, van Driel MA, van de Pol DJ, Klevering BJ, van Haren FJ, Tijmes N, Bergen AA, Rohrschneider K, Blankenagel A, Pinckers AJ, Dahl N, Brunner HG, Deutman AF, Hoyng CB, Cremers FP. The 2588G-->C mutation in the ABCR gene is a mild frequent founder mutation in the Western European population and allows the classification of ABCR mutations in patients with Stargardt disease. *Am J Hum Genet* 64(4):1024-35. **1999**.
- McCoy RC, Taylor RW, Blauwkamp TA, Kelley JL, Kertesz M, Pushkarev D, Petrov DA, Fiston-Lavier AS. Illumina TruSeq synthetic long-reads empower de novo assembly and resolve complex, highly-repetitive transposable elements. *PLoS One* 9(9):e106689. **2014**.
- McLaughlin ME, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP. Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 4(2):130-4. **1993**.
- Meaburn E, Schulz R. Next generation sequencing in epigenetics: insights and challenges. *Semin Cell Dev Biol* 23(2):192-9. **2012**.
- Megaw RD, Soares DC, Wright AF. RPGR: Its role in photoreceptor physiology, human disease, and future therapies. *Exp Eye Res* 138:32-41. **2015**.
- Mendes HF, van der Spuy J, Chapple JP, Cheetham ME. Mechanisms of cell death in rhodopsin retinitis pigmentosa: implications for therapy. *Trends Mol Med* 11(4):177-85. **2005**.
- Mendez-Vidal C, Gonzalez-Del Pozo M, Vela-Boza A, Santoyo-Lopez J, Lopez-Domingo FJ, Vazquez-Marouschek C, Dopazo J, Borrego S, Antinolo G. Whole-exome sequencing identifies novel compound heterozygous mutations in USH2A in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Mol Vis* 19:2187-95. **2013**.
- Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11(1):31-46. **2010**.
- Micheau A, Hoa D, Hoa D. **2014**. Anatomía del ojo: ilustraciones: IMAIOS. <https://www.imaios.com/es/e-Anatomy/Cabeza-y-cuello/Ojo-Ilustraciones?structureID=7688&frame=32>.
- Millan JM, Aller E, Jaijo T, Blanco-Kelly F, Gimenez-Pardo A, Ayuso C. An update on the genetics of usher syndrome. *J Ophthalmol* 2011:417217. **2011**.

- Mills JD, Janitz M. Alternative splicing of mRNA in the molecular pathology of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 33(5):1012 e11-24. **2012**.
- Mockel A, Perdomo Y, Stutzmann F, Letsch J, Marion V, Dollfus H. Retinal dystrophy in Bardet-Biedl syndrome and related syndromic ciliopathies. *Prog Retin Eye Res* 30(4):258-74. **2011**.
- Molday RS, Kellner U, Weber BH. X-linked juvenile retinoschisis: clinical diagnosis, genetic analysis, and molecular mechanisms. *Prog Retin Eye Res* 31(3):195-212. **2012**.
- Mooy CM, Van Den Born LI, Baarsma S, Paridaens DA, Kraaijenbrink T, Bergen A, Weber BH. Hereditary X-linked juvenile retinoschisis: a review of the role of Muller cells. *Arch Ophthalmol* 120(7):979-84. **2002**.
- Muller J, Stoetzel C, Vincent MC, Leitch CC, Laurier V, Danse JM, Helle S, Marion V, Bennouna-Greene V, Vicaire S, Megarbane A, Kaplan J, Drouin-Garraud V, Hamdani M, Sigaudy S, Francannet C, Roume J, Bitoun P, Goldenberg A, Philip N, Odent S, Green J, Cossee M, Davis EE, Katsanis N, Bonneau D, Verloes A, Poch O, Mandel JL, Dollfus H. Identification of 28 novel mutations in the Bardet-Biedl syndrome genes: the burden of private mutations in an extensively heterogeneous disease. *Hum Genet* 127(5):583-93. **2010**.
- Mustafi D, Engel AH, Palczewski K. Structure of cone photoreceptors. *Prog Retin Eye Res* 28(4):289-302. **2009**.
- Mutz KO, Heilkenbrinker A, Lonne M, Walter JG, Stahl F. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Curr Opin Biotechnol* 24(1):22-30. **2013**.
- Mykytyn K, Nishimura DY, Searby CC, Shastri M, Yen HJ, Beck JS, Braun T, Streb LM, Cornier AS, Cox GF, Fulton AB, Carmi R, Luleci G, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Jacobson SG, Heckenlively JR, Weleber RG, Stone EM, Sheffield VC. Identification of the gene (BBS1) most commonly involved in Bardet-Biedl syndrome, a complex human obesity syndrome. *Nat Genet* 31(4):435-8. **2002**.
- Nadeau JH. Modifier genes in mice and humans. *Nat Rev Genet* 2(3):165-74. **2001**.
- Nash BM, Wright DC, Grigg JR, Bennetts B, Jamieson RV. Retinal dystrophies, genomic applications in diagnosis and prospects for therapy. *Transl Pediatr* 4(2):139-63. **2015**.
- Neidhardt J, Barthelmes D, Farahmand F, Fleischhauer JC, Berger W. Different amino acid substitutions at the same position in rhodopsin lead to distinct phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(4):1630-5. **2006**.
- Neveling K, Collin RW, Gilissen C, van Huet RA, Visser L, Kwint MP, Gijsen SJ, Zonneveld MN, Wieskamp N, de Ligt J, Siemiatkowska AM, Hoefsloot LH, Buckley MF, Kellner U, Branham KE, den Hollander AI, Hoischen A, Hoyng C, Klevering BJ, van den Born LI, Veltman JA, Cremers FP, Scheffer H. Next-generation genetic testing for retinitis pigmentosa. *Hum Mutat* 33(6):963-72. **2012**.
- Neveling K, den Hollander AI, Cremers FP, Collin RW. Identification and analysis of inherited retinal disease genes. *Methods Mol Biol* 935:3-23. **2013**.
- Nicoletti A, Wong DJ, Kawase K, Gibson LH, Yang-Feng TL, Richards JE, Thompson DA. Molecular characterization of the human gene encoding an abundant 61 kDa protein specific to the retinal pigment epithelium. *Hum Mol Genet* 4(4):641-9. **1995**.
- Nishiguchi KM, Rivolta C. Genes associated with retinitis pigmentosa and allied diseases are frequently mutated in the general population. *PLoS One* 7(7):e41902. **2012**.
- Patterson K, Molofsky AB, Robinson C, Acosta S, Cater C, Fischer JA. The functions of Klarsicht and nuclear lamin in developmentally regulated nuclear migrations of photoreceptor cells in the Drosophila eye. *Mol Biol Cell* 15(2):600-10. **2004**.
- Pearson RA, Barber AC, Rizzi M, Hippert C, Xue T, West EL, Duran Y, Smith AJ, Chuang JZ, Azam SA, Luhmann UF, Benucci A, Sung CH, Bainbridge JW, Carandini M, Yau KW, Sowden JC, Ali RR. Restoration of vision after transplantation of photoreceptors. *Nature* 485(7396):99-103. **2012**.

- Perez-Cano HJ, Garnica-Hayashi RE, Zenteno JC. CHM gene molecular analysis and X-chromosome inactivation pattern determination in two families with choroideremia. *Am J Med Genet A* 149A(10):2134-40. **2009**.
- Petrs-Silva H, Linden R. Advances in gene therapy technologies to treat retinitis pigmentosa. *Clin Ophthalmol* 8:127-36. **2014**.
- Phelan JK, Bok D. A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes. *Mol Vis* 6:116-24. **2000**.
- Piecznik SR, Neustadt J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol* 83(1):84-92. **2007**.
- Pieras JI, Barragan I, Borrego S, Audo I, Gonzalez-Del Pozo M, Bernal S, Baiget M, Zeitz C, Bhattacharya SS, Antinolo G. Copy-number variations in EYS: a significant event in the appearance of arRP. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(8):5625-31. **2011**.
- Potter MJ, Wong E, Szabo SM, McTaggart KE. Clinical findings in a carrier of a new mutation in the choroideremia gene. *Ophthalmology* 111(10):1905-9. **2004**.
- Rajgor D, Mellad JA, Autore F, Zhang Q, Shanahan CM. Multiple novel nesprin-1 and nesprin-2 variants act as versatile tissue-specific intracellular scaffolds. *PLoS One* 7(7):e40098. **2012**.
- Razafsky DS, Ward CL, Kolb T, Hodzic D. Developmental regulation of linkers of the nucleoskeleton to the cytoskeleton during mouse postnatal retinogenesis. *Nucleus* 4(5):399-409. **2013**.
- Reiners J, Nagel-Wolfrum K, Jurgens K, Marker T, Wolfrum U. Molecular basis of human Usher syndrome: deciphering the meshes of the Usher protein network provides insights into the pathomechanisms of the Usher disease. *Exp Eye Res* 83(1):97-119. **2006**.
- Rhoads A, Au KF. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 13(5):278-89. **2015**.
- Riazuddin SA, Iqbal M, Wang Y, Masuda T, Chen Y, Bowne S, Sullivan LS, Waseem NH, Bhattacharya S, Daiger SP, Zhang K, Khan SN, Riazuddin S, Hejtmancik JF, Sieving PA, Zack DJ, Katsanis N. A splice-site mutation in a retina-specific exon of BBS8 causes nonsyndromic retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 86(5):805-12. **2010**.
- Riise R, Tornqvist K, Wright AF, Mykytyn K, Sheffield VC. The phenotype in Norwegian patients with Bardet-Biedl syndrome with mutations in the BBS4 gene. *Arch Ophthalmol* 120(10):1364-7. **2002**.
- Rinner O, Makhankov YV, Biehlmaier O, Neuhauss SC. Knockdown of cone-specific kinase GRK7 in larval zebrafish leads to impaired cone response recovery and delayed dark adaptation. *Neuron* 47(2):231-42. **2005**.
- Rivera A, White K, Stohr H, Steiner K, Hemmrich N, Grimm T, Jurklies B, Lorenz B, Scholl HP, Apfelstedt-Sylla E, Weber BH. A comprehensive survey of sequence variation in the ABCA4 (ABCR) gene in Stargardt disease and age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 67(4):800-13. **2000**.
- Rivolta C, Berson EL, Dryja TP. Paternal uniparental heterodisomy with partial isodisomy of chromosome 1 in a patient with retinitis pigmentosa without hearing loss and a missense mutation in the Usher syndrome type II gene USH2A. *Arch Ophthalmol* 120(11):1566-71. **2002a**.
- Rivolta C, Sharon D, DeAngelis MM, Dryja TP. Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns. *Hum Mol Genet* 11(10):1219-27. **2002b**.
- Rivolta C, Sweklo EA, Berson EL, Dryja TP. Missense mutation in the USH2A gene: association with recessive retinitis pigmentosa without hearing loss. *Am J Hum Genet* 66(6):1975-8. **2000**.

- Rizzolo LJ, Peng S, Luo Y, Xiao W. Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res* 30(5):296-323. **2011**.
- Ruiz A, Borrego S, Marcos I, Antiñolo G. Anatomía y fisiología de la retina. La retinosis pigmentaria en España. Estudio clínico y genético: Organización Nacional de Ciegos Españoles (ONCE) p11-38. **2001**.
- Sahel JA, Marazova K, Audo I. Clinical characteristics and current therapies for inherited retinal degenerations. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5(2):a017111. **2015**.
- Sakurai K, Chen J, Khani SC, Kefalov VJ. Regulation of mammalian cone phototransduction by recoverin and rhodopsin kinase. *J Biol Chem* 290(14):9239-50. **2015**.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12):5463-7. **1977**.
- Shevach E, Ali M, Mizrahi-Meissonnier L, McKibbin M, El-Asrag M, Watson CM, Inglehearn CF, Ben-Yosef T, Blumenfeld A, Jalas C, Banin E, Sharon D. Association between missense mutations in the BBS2 gene and nonsyndromic retinitis pigmentosa. *JAMA Ophthalmol* 133(3):312-8. **2015**.
- Shu X, Black GC, Rice JM, Hart-Holden N, Jones A, O'Grady A, Ramsden S, Wright AF. RPGR mutation analysis and disease: an update. *Hum Mutat* 28(4):322-8. **2007**.
- Sieving PA, MacDonald IM, Chan S. X-Linked Juvenile Retinoschisis. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Fong CT, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, editors. GeneReviews(R). Seattle (WA). **1993**.
- Stockman A, Sharpe LT, Merbs S, Nathans J. Spectral sensitivities of human cone visual pigments determined in vivo and in vitro. *Methods Enzymol* 316:626-50. **2000**.
- Sullivan LS, Bowne SJ, Birch DG, Hughbanks-Wheaton D, Heckenlively JR, Lewis RA, Garcia CA, Ruiz RS, Blanton SH, Northrup H, Gire AI, Seaman R, Duzkale H, Spellacy CJ, Zhu J, Shankar SP, Daiger SP. Prevalence of disease-causing mutations in families with autosomal dominant retinitis pigmentosa: a screen of known genes in 200 families. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(7):3052-64. **2006**.
- Talcott KE, Ratnam K, Sundquist SM, Lucero AS, Lujan BJ, Tao W, Porco TC, Roorda A, Duncan JL. Longitudinal study of cone photoreceptors during retinal degeneration and in response to ciliary neurotrophic factor treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(5):2219-26. **2011**.
- Taneri B, Asilmaz E, Gaasterland T. Biomedical impact of splicing mutations revealed through exome sequencing. *Mol Med* 18:314-9. **2012**.
- Tantri A, Vrabec TR, Cu-Unjieng A, Frost A, Annesley WH, Jr., Donoso LA. X-linked retinoschisis: a clinical and molecular genetic review. *Surv Ophthalmol* 49(2):214-30. **2004**.
- Thiadens AA, Phan TM, Zekveld-Vroon RC, Leroy BP, van den Born LI, Hoyng CB, Klaver CC, Roosing S, Pott JW, van Schooneveld MJ, van Moll-Ramirez N, van Genderen MM, Boon CJ, den Hollander AI, Bergen AA, De Baere E, Cremers FP, Lotery AJ. Clinical course, genetic etiology, and visual outcome in cone and cone-rod dystrophy. *Ophthalmology* 119(4):819-26. **2012**.
- Timp W, Mirsaidov UM, Wang D, Comer J, Aksimentiev A, Timp G. Nanopore Sequencing: Electrical Measurements of the Code of Life. *IEEE Trans Nanotechnol* 9(3):281-294. **2010**.
- Travis GH. Mechanisms of cell death in the inherited retinal degenerations. *Am J Hum Genet* 62(3):503-8. **1998**.
- Tucker BA, Mullins RF, Stone EM. Stem cells for investigation and treatment of inherited retinal disease. *Hum Mol Genet* 23(R1):R9-R16. **2014**.



- Umino Y, Herrmann R, Chen CK, Barlow RB, Arshavsky VY, Solessio E. The relationship between slow photoresponse recovery rate and temporal resolution of vision. *J Neurosci* 32(41):14364-73. **2012**.
- Valverde D, Riveiro-Alvarez R, Bernal S, Jaakson K, Baiget M, Navarro R, Ayuso C. Microarray-based mutation analysis of the ABCA4 gene in Spanish patients with Stargardt disease: evidence of a prevalent mutated allele. *Mol Vis* 12:902-8. **2006**.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nuskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science* 291(5507):1304-51. **2001**.
- Vernon M. Sociological and psychological factors associated with hearing loss. *J Speech Hear Res* 12(3):541-63. **1969**.
- Vervoort R, Lennon A, Bird AC, Tulloch B, Axton R, Miano MG, Meindl A, Meitinger T, Ciccodicola A, Wright AF. Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 25(4):462-6. **2000**.
- Vincent A, Robson AG, Holder GE. Pathognomonic (diagnostic) ERGs. A review and update. *Retina* 33(1):5-12. **2013**.
- Vithana EN, Abu-Safieh L, Pelosini L, Winchester E, Hornan D, Bird AC, Hunt DM, Bustin SA, Bhattacharya SS. Expression of PRPF31 mRNA in patients with autosomal dominant

- retinitis pigmentosa: a molecular clue for incomplete penetrance? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(10):4204-9. **2003**.
- Voskoboynik A, Neff NF, Sahoo D, Newman AM, Pushkarev D, Koh W, Passarelli B, Fan HC, Mantalas GL, Palmeri KJ, Ishizuka KJ, Gissi C, Griggio F, Ben-Shlomo R, Corey DM, Penland L, White RA, 3rd, Weissman IL, Quake SR. The genome sequence of the colonial chordate, *Botryllus schlosseri*. *Elife* 2:e00569. **2013**.
- Wang JS, Kefalov VJ. The cone-specific visual cycle. *Prog Retin Eye Res* 30(2):115-28. **2011**.
- Wang X, Wang H, Sun V, Tuan HF, Keser V, Wang K, Ren H, Lopez I, Zaneveld JE, Siddiqui S, Bowles S, Khan A, Salvo J, Jacobson SG, Iannaccone A, Wang F, Birch D, Heckenlively JR, Fishman GA, Traboulsi EI, Li Y, Wheaton D, Koenekoop RK, Chen R. Comprehensive molecular diagnosis of 179 Leber congenital amaurosis and juvenile retinitis pigmentosa patients by targeted next generation sequencing. *J Med Genet* 50(10):674-88. **2013**.
- Wassle H, Boycott BB. Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev* 71(2):447-80. **1991**.
- Weil D, Kussel P, Blanchard S, Levy G, Levi-Acobas F, Drira M, Ayadi H, Petit C. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat Genet* 16(2):191-3. **1997**.
- Weisschuh N, Mayer AK, Strom TM, Kohl S, Glockle N, Schubach M, Andreasson S, Bernd A, Birch DG, Hamel CP, Heckenlively JR, Jacobson SG, Kamme C, Kellner U, Kunstmann E, Maffei P, Reiff CM, Rohrschneider K, Rosenberg T, Rudolph G, Vamos R, Varsanyi B, Weleber RG, Wissinger B. Mutation Detection in Patients with Retinal Dystrophies Using Targeted Next Generation Sequencing. *PLoS One* 11(1):e0145951. **2016**.
- Wright AF, Chakarova CF, Abd El-Aziz MM, Bhattacharya SS. Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat Rev Genet* 11(4):273-84. **2010**.
- Wright CB, Redmond TM, Nickerson JM. A History of the Classical Visual Cycle. *Prog Mol Biol Transl Sci* 134:433-48. **2015**.
- Xu J, Dodd RL, Makino CL, Simon MI, Baylor DA, Chen J. Prolonged photoresponses in transgenic mouse rods lacking arrestin. *Nature* 389(6650):505-9. **1997**.
- Yau KW. Cyclic nucleotide-gated channels: an expanding new family of ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9):3481-3. **1994a**.
- Yau KW. Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(1):9-32. **1994b**.
- Yau KW, Hardie RC. Phototransduction motifs and variations. *Cell* 139(2):246-64. **2009**.
- Young RW, Bok D. Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol* 42(2):392-403. **1969**.
- Yu J, Lei K, Zhou M, Craft CM, Xu G, Xu T, Zhuang Y, Xu R, Han M. KASH protein Synce-2/Nesprin-2 and SUN proteins SUN1/2 mediate nuclear migration during mammalian retinal development. *Hum Mol Genet* 20(6):1061-73. **2011**.
- Yuan L, Kawada M, Havlioglu N, Tang H, Wu JY. Mutations in PRPF31 inhibit pre-mRNA splicing of rhodopsin gene and cause apoptosis of retinal cells. *J Neurosci* 25(3):748-57. **2005**.
- Zaghloul NA, Katsanis N. Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. *J Clin Invest* 119(3):428-37. **2009**.
- Zaghloul NA, Liu Y, Gerdes JM, Gascue C, Oh EC, Leitch CC, Bromberg Y, Binkley J, Leibel RL, Sidow A, Badano JL, Katsanis N. Functional analyses of variants reveal a significant role for dominant negative and common alleles in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(23):10602-7. **2010**.

- Zernant J, Xie YA, Ayuso C, Riveiro-Alvarez R, Lopez-Martinez MA, Simonelli F, Testa F, Gorin MB, Strom SP, Bertelsen M, Rosenberg T, Boone PM, Yuan B, Ayyagari R, Nagy PL, Tsang SH, Gouras P, Collison FT, Lupski JR, Fishman GA, Allikmets R. Analysis of the ABCA4 genomic locus in Stargardt disease. *Hum Mol Genet* 23(25):6797-806. **2014**.
- Zhang Q, Bethmann C, Worth NF, Davies JD, Wasner C, Feuer A, Ragnauth CD, Yi Q, Mellad JA, Warren DT, Wheeler MA, Ellis JA, Skepper JN, Vorgerd M, Schlotter-Weigel B, Weissberg PL, Roberts RG, Wehnert M, Shanahan CM. Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Hum Mol Genet* 16(23):2816-33. **2007**.
- Zhao M, Wang Q, Jia P, Zhao Z. Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: features and perspectives. *BMC Bioinformatics* 14 Suppl 11:S1. **2013**.
- Zinkernagel MS, MacLaren RE. Recent advances and future prospects in choroideremia. *Clin Ophthalmol* 9:2195-200. **2015**.
- Zinn KM, Marmor MF. The retinal pigment epithelium. Cambridge; MA: Harvard University Press **1979**.



---

# 7. ANEXOS

---



## 7.1 ANEXO I

Listado de genes implicados en DHR, modos de herencia y fenotipos asociados según RetNet (<https://sph.uth.edu/retnet/>; 01/07/2016). La información relativa a la función de la proteína codificada se corresponde con la incluida en las bases de datos públicas *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) y *GeneCards: The Human Gene Database*. El número de mutaciones reportadas para cada gen se ha extraído de la versión pública de la base de datos *The Human Gene Mutation Database* (HGMD). ACL: Amaurosis congénita de Léber; AO: Atrofia óptica; AD: Autosómica dominante; AR: Autosómica recesiva; CNCE: Ceguera nocturna congénita estacionaria; DC: Distrofia de conos; DCB: Distrofia de conos y bastones; DCR: degeneración coriorretiniana; DM: distrofia macular; DME: distrofia macular asociada a la edad; LX: Ligada al cromosoma X; MIT: Mitocondrial; OESR: otras enfermedades sistémicas/sindrómicas que cursan con retinopatía; OR: otras retinopatías; RP: retinitis pigmentosa; SBB: Síndrome de Bardet-Biedl; USH: Síndrome de Usher.

Símbolo del gen	Tipo de herencia	Función	Fenotipos asociados	Mutaciones
<b>ABCA4</b>	AR	Ciclo visual	DC, DCB, DM, RP y DME	992
<b>ABCC6</b>	AR	Mantenimiento tisular	OESR	285
<b>ABHD12</b>	AR	Señalización celular	USH y OESR	14
<b>ACBD5</b>	AR	Señalización celular	OESR	2
<b>ADAM9</b>	AR	Interacción celular	DC y DCB	9
<b>ADAMTS18</b>	AR	Estructura y transporte celular	OESR	10
<b>ADGRV1</b>	AR	Señalización celular	USH	119
<b>ADIPOR1</b>	AR	Señalización celular	SBB y OESR	2
<b>AGBL5</b>	AR	Estructura celular	RP	ND
<b>AHI1</b>	AR	Estructura ciliar	OESR	55
<b>AIPL1</b>	AR y AD	Transporte celular	DC y DCB (ad) ACL (ar)	69
<b>ALMS1</b>	AR	Estructura ciliar	OESR	270
<b>ARL2BP</b>	AR	Función y mantenimiento de los fotorreceptores	RP	ND
<b>ARL3</b>	AD	Señalización y transporte celular	RP	ND
<b>ARL6</b>	AR	Tráfico intracelular	RP y SBB	17
<b>ATF6</b>	AR	Factor de transcripción	DC y DCB	13
<b>ATXN7</b>	AD	Factor de transcripción	OESR	5
<b>BBIP1</b>	AR	Ciliogénesis	SBB	ND
<b>BBS1</b>	AR	Ciliogénesis	RP y SBB	87
<b>BBS10</b>	AR	Ciliogénesis	SBB	94
<b>BBS12</b>	AR	Ciliogénesis y tráfico celular	SBB	59
<b>BBS2</b>	AR	Ciliogénesis	RP y SBB	75

<b>BBS4</b>	AR	Ciliogénesis	SBB	37
<b>BBS5</b>	AR	Ciliogénesis	SBB	23
<b>BBS7</b>	AR	Ciliogénesis	SBB	33
<b>BBS9</b>	AR	Ciliogénesis	SBB	37
<b>BEST1</b>	AR y AD	Señalización celular	RP, DM, OR	261
<b>C12orf65</b>	AR	Tráfico intracelular	OR	9
<b>C1QTNF5</b>	AD	Adhesión celular	DM	2
<b>C21orf2</b>	AR	Estructura celular	DC y DCB	ND
<b>C2orf71</b>	AR	Metabolismo celular	RP	33
<b>C8orf37</b>	AR	Desconocida	RP, DC, DCB y SBB	11
<b>CA4</b>	AD	Metabolismo celular	RP	8
<b>CABP4</b>	AR	Señalización celular	CNCE y ACL	7
<b>CACNA1F</b>	LX	Señalización celular	CNCE, DC, DCB y OR	140
<b>CACNA2D4</b>	AR	Señalización celular	DC y DCB	7
<b>CAPN5</b>	AD	Señalización celular	OR	ND
<b>CC2D2A</b>	AR	Estructura ciliar	OESR	63
<b>CDH23</b>	AR	Estructura ciliar	USH	247
<b>CDH3</b>	AR	Adhesión celular	OR	22
<b>CDHR1</b>	AR	Estructura de los fotorreceptores	DC y DCB	24
<b>CEP164</b>	AR	Estructura ciliar	OESR	ND
<b>CEP250</b>	AR	Ciclo celular	USH	ND
<b>CEP290</b>	AR	Estructura y tráfico ciliar	SBB, ACL y OESR	220
<b>CERKL</b>	AR	Supervivencia celular	DC, DCB y RP	23
<b>CFH</b>	AR	Regulación del sistema inmune	DM y DME	251
<b>CHM</b>	LX	Señalización celular	OR	209
<b>CIB2</b>	AR	Señalización celular	USH	ND
<b>CLN3</b>	AR	Función lisosomal	OESR	64
<b>CLRN1</b>	AR	Desarrollo y mantenimiento de la retina	RP y USH	30
<b>CLUAP1</b>	AR	Ciliogénesis	ACL	ND
<b>CNGA1</b>	AR	Fototransducción	RP	24
<b>CNGA3</b>	AR	Fototransducción	DC, DCB y OR	128
<b>CNGB1</b>	AR	Fototransducción	RP	26
<b>CNGB3</b>	AR	Fototransducción	DC, DCB y OR	57
<b>CNNM4</b>	AR	Transporte celular	DC, DCB y OR	16
<b>COL11A1</b>	AD	Estructura tisular	OESR	75
<b>COL2A1</b>	AD	Estructura tisular	OESR	510
<b>COL9A1</b>	AR	Estructura tisular	OESR	4
<b>CRB1</b>	AR y AD	Desarrollo y mantenimiento tisular	ACL y RP (ar) OR (ad)	267



<b>CRX</b>	AR y AD	Factor de transcripción	ACL, DC, DCB y RP (ad) ACL (ar)	76
<b>CSPP1</b>	AR	Ciclo celular	OESR	ND
<b>CTNNA1</b>	AD	Estructura y señalización celular	DM	ND
<b>CYP4V2</b>	AR	Metabolismo celular	RP y OR	70
<b>DFNB31</b>	AR	Desarrollo y estructura ciliar	USH	21
<b>DHDDS</b>	AR	Señalización celular	RP	1
<b>DHX38</b>	AR	<i>Splicing</i>	RP	ND
<b>DMD</b>	LX	Estructura tisular	OR	3228
<b>DRAM2</b>	AR	Supervivencia celular	DM	ND
<b>DTHD1</b>	AR	Señalización y supervivencia celular	ACL	ND
<b>EFEMP1</b>	AD	Adhesión celular y migración	DM	5
<b>ELOVL4</b>	AR y AD	Metabolismo celular	DM (ad) OESR (ar)	12
<b>EMC1</b>	AR	Desconocida	RP	ND
<b>EXOSC2</b>	AR	Metabolismo celular	OESR	ND
<b>EYS</b>	AR	Mantenimiento de los fotorreceptores	RP	228
<b>FAM161A</b>	AR	Retinogénesis y ciliogénesis	RP	12
<b>FLVCR1</b>	AR	Transporte celular	OESR	10
<b>FSCN2</b>	AD	Estructura celular	DM y RP	11
<b>FZD4</b>	AD	Señalización celular	OR	73
<b>GDF6</b>	AR	Señalización celular	ACL	17
<b>GNAT1</b>	AR y AD	Fototransducción	CNCE	5
<b>GNAT2</b>	AR	Fototransducción	DC y DCB	10
<b>GNB3</b>	AR	Fototransducción	CNCE	4
<b>GNPTG</b>	AR	Metabolismo celular	OESR	30
<b>GPR125</b>	AR	Señalización celular	RP	ND
<b>GPR179</b>	AR	Señalización celular	CNCE	14
<b>GRK1</b>	AR	Ciclo visual	CNCE	19
<b>GRM6</b>	AR	Señalización celular	CNCE	32
<b>GUCA1A</b>	AD	Fototransduction	DC y DCB	15
<b>GUCA1B</b>	AD	Fototransduction	DM y RP	6
<b>GUCY2D</b>	AR y AD	Fototransduction	DC y DCB (ad) ACL (ar)	187
<b>HARS</b>	AR	Traducción proteica	OESR y USH	6
<b>HGSNAT</b>	AR	Metabolismo celular	RP y OESR	66
<b>HK1</b>	AD	Metabolismo celular	RP	6
<b>HMCN1</b>	AD	Desconocida	DM y DME	7
<b>HMX1</b>	AR	Factor de transcripción	OESR	2
<b>IDH3B</b>	AR	Ciclo visual	RP	2
<b>IFT140</b>	AR	Estructura y tráfico ciliar	ACL, OESR y RP	37
<b>IFT172</b>	AR	Estructura y tráfico ciliar	RP y SBB	ND
<b>IFT27</b>	AR	Estructura y tráfico ciliar	SBB	ND

<b><i>IMPDH1</i></b>	AD	Ciclo celular	ACL y RP	19
<b><i>IMPG1</i></b>	AR y AD	Mantenimiento de los fotorreceptores	DM	ND
<b><i>IMPG2</i></b>	AR	Mantenimiento de los fotorreceptores	RP	18
<b><i>INPP5E</i></b>	AR	Metabolismo celular	OESR y SBB	28
<b><i>INVS</i></b>	AR	Señalización celular	OESR	29
<b><i>IQCB1</i></b>	AR	Función ciliar	ACL y OESR	33
<b><i>ITM2B</i></b>	AD	Metabolismo celular	OR	3
<b><i>JAG1</i></b>	AD	Señalización celular	OESR	543
<b><i>KCNJ13</i></b>	AR y AD	Señalización celular	ACL y SBB (ar) OESR (ad)	8
<b><i>KCNV2</i></b>	AR	Señalización celular	DC y DCB	85
<b><i>KIAA1549</i></b>	AR	Desconocida	RP	4
<b><i>KIF11</i></b>	AD	División celular	OESR	51
<b><i>KIZ</i></b>	AR	División celular	RP	ND
<b><i>KLHL7</i></b>	AD	Metabolismo celular	RP	3
<b><i>KSS</i></b>	MIT	Desconocida	OR	ND
<b><i>LAMA1</i></b>	AR	Adhesión y migración celular	OESR	16
<b><i>LCA5</i></b>	AR	Centrosoma y función ciliar	ACL	42
<b><i>LHON</i></b>	MIT	Desconocida	OR	ND
<b><i>LRAT</i></b>	AR	Ciclo visual	ACL y RP	17
<b><i>LRIT3</i></b>	AR	Señalización celular	CNCE	ND
<b><i>LRP5</i></b>	AR y AD	Señalización celular	OESR y OR (ar) OR (ad)	156
<b><i>LZTFL1</i></b>	AR	Tráfico ciliar	SBB	3
<b><i>MAK</i></b>	AR	Ciclo celular	RP	13
<b><i>MAPKAPK3</i></b>	AD	Señalización celular	OR	ND
<b><i>MERTK</i></b>	AR	Renovación de los fotorreceptores	RP	52
<b><i>MFN2</i></b>	AD	Funcionamiento mitocondrial	AO, OESR	191
<b><i>MFRP</i></b>	AR	Desarrollo ocular	OR	21
<b><i>MFSD8</i></b>	AR	Transporte celular	DM	38
<b><i>MIR204</i></b>	AD	Regulación de la expresión génica	OR	ND
<b><i>MKKS</i></b>	AR	Citocinesis y ciliogénesis	SBB	55
<b><i>MKS1</i></b>	AR	Estructura ciliar	OESR y SBB	42
<b><i>MT-ATP6</i></b>	MIT	Metabolismo mitocondrial	OR	ND
<b><i>MT-TH</i></b>	MIT	Traducción proteica	OR	ND
<b><i>MT-TL1</i></b>	MIT	Traducción proteica	OR	ND
<b><i>MTTP</i></b>	AR	Transporte celular	OESR	68
<b><i>MT-TP</i></b>	MIT	Traducción proteica	OR	ND
<b><i>MT-TS2</i></b>	MIT	Traducción proteica	OR	ND
<b><i>MVK</i></b>	AR	Metabolismo celular	OR y RP	160
<b><i>MYO7A</i></b>	AR	Estructura y funcionamiento de la retina y la cóclea	USH	349
<b><i>NBAS</i></b>	AR	Transporte intracelular	OR	26

<b>NDP</b>	LX	Señalización celular	OR	151
<b>NEK2</b>	AR	División celular	RP	ND
<b>NEUROD1</b>	AR	Factor de transcripción	RP	15
<b>NMNAT1</b>	AR	Metabolismo celular	ACL	ND
<b>NPHP1</b>	AR	División y señalización celular	OESR y SBB	51
<b>NPHP3</b>	AR	Función ciliar	OESR	64
<b>NPHP4</b>	AR	Señalización celular	OESR	97
<b>NR2E3</b>	AR y AD	Factor de transcripción	OR y RP (ar) RP (ad)	64
<b>NR2F1</b>	AD	Regulación de la transcripción	AO	11
<b>NRL</b>	AR y AD	Factor de transcripción	RP	16
<b>NYX</b>	LX	Retinogénesis	CNCE	81
<b>OAT</b>	AR	Señalización celular	OR	68
<b>OFD1</b>	LX	Función ciliar	OESR y RP	144
<b>OPA1</b>	AD	Función mitocondrial	AO	344
<b>OPA3</b>	AR y AD	Función mitocondrial	OESR	11
<b>OPN1LW</b>	LX	Fototransducción	OR	50
<b>OPN1MW</b>	LX	Fototransducción	OR	14
<b>OPN1SW</b>	AD	Fototransducción	OR	7
<b>OTX2</b>	AD	Factor de transcripción	ACL y DM	56
<b>PANK2</b>	AR	Metabolismo celular	OESR	146
<b>PAX2</b>	AD	Factor de transcripción	OESR	82
<b>PCDH15</b>	AR	Adhesión celular	USH	84
<b>PCYT1A</b>	AR	Metabolismo celular	OESR	ND
<b>PDE6A</b>	AR	Phototransduction	RP	38
<b>PDE6B</b>	AR y AD	Phototransduction	RP (ar) CNCE (ad)	82
<b>PDE6C</b>	AR	Phototransduction	DC y DCB	26
<b>PDE6G</b>	AR	Phototransduction	RP	2
<b>PDE6H</b>	AR	Phototransduction	DC y DCB	2
<b>PDZD7</b>	AR	Desconocida	USH	12
<b>PEX1</b>	AR	Tráfico peroxisomal	OESR	118
<b>PEX2</b>	AR	Biogénesis del peroxisoma	OESR	18
<b>PEX7</b>	AR	Biogénesis del peroxisoma	OESR	50
<b>PGK1</b>	LX	Metabolismo celular	OR	23
<b>PHYH</b>	AR	Metabolismo celular	OESR	34
<b>PITPNM3</b>	AD	Metabolismo celular	DC y DCB	4
<b>PLA2G5</b>	AR	Metabolismo celular	OR	7
<b>PLK4</b>	AR	Ciclo celular	OESR	ND
<b>PNPLA6</b>	AR	Metabolismo celular	OESR	46
<b>POC1B</b>	AR	Ciliogénesis	DC, DCB y OESR	ND
<b>POMGNT1</b>	AR	Metabolismo celular	RP	68
<b>PRCD</b>	AR	Desconocida	RP	6
<b>PRDM13</b>	AD	Factor de transcripción	DCR y DM	ND

<b>PROM1</b>	AR y AD	Diferenciación, proliferación y supervivencia celular	DC, DCB y DM (ad) OR y RP (ar)	47
<b>PRPF3</b>	AD	<i>Splicing</i>	RP	3
<b>PRPF31</b>	AD	<i>Splicing</i>	RP	111
<b>PRPF4</b>	AD	<i>Splicing</i>	RP	ND
<b>PRPF6</b>	AD	<i>Splicing</i>	RP	4
<b>PRPF8</b>	AD	<i>Splicing</i>	RP	27
<b>PRPH2</b>	AR y AD	Estructura de los fotorreceptores	DC, DCB, DM y RP (ad) ACL (ar)	155
<b>PRPS1</b>	AR	Metabolismo celular	OESR	25
<b>RAB28</b>	AR	Señalización y tráfico celular	DC y DCB	5
<b>RAX2</b>	AR	Desarrollo ocular y expresión génica	DC, DCB y DME	4
<b>RB1</b>	AD	Ciclo celular	OR	989
<b>RBP3</b>	AR	Ciclo visual	RP	9
<b>RBP4</b>	AR	Transporte	OR	6
<b>RD3</b>	AR	Tráfico celular	ACL	11
<b>RDH11</b>	AR	Ciclo visual	OESR	ND
<b>RDH12</b>	AR	Ciclo visual	ACL y RP	89
<b>RDH5</b>	AR	Ciclo visual	DC, DCB y CNCE	50
<b>RGR</b>	AR y AD	Ciclo visual	RP (ar) DCR (ad)	8
<b>RGS9</b>	AR	Fototransducción	OR	3
<b>RGS9BP</b>	AR	Fototransducción	OR	5
<b>RHO</b>	AR y AD	Fototransducción	CNCE y RP (ad) RP (ar)	194
<b>RIMS1</b>	AD	Liberación del neurotransmisor	DC y DCB	5
<b>RLBP1</b>	AR	Ciclo visual	OR y RP	31
<b>ROM1</b>	AD	Estructura celular	RP	13
<b>RP1</b>	AR y AD	Estructura y función ciliar	RP	132
<b>RP1L1</b>	AR y AD	Estructura celular	DM (ad) RP (ar)	23
<b>RP2</b>	LX	Desarrollo y mantenimiento de la retina	RP	97
<b>RP9</b>	AD	<i>Splicing</i>	RP	3
<b>RPE65</b>	AR y AD	Ciclo visual	ACL y RP (ar) RP (ad)	160
<b>RPGR</b>	LX	Ciliogénesis	DC, DCB, DM y RP	175
<b>RPGRIP1</b>	AR	Estructura celular	ACL, DC y DCB	105
<b>RPGRIP1L</b>	AR	Estructura celular	OESR	36
<b>RS1</b>	LX	Adhesión celular	OR	232
<b>RTN4IP1</b>	AR	Desconocida	AO	ND
<b>SAG</b>	AR	Fototransducción	CNCE y RP	14
<b>SDCCAG8</b>	AR	División celular	OESR y SBB	14
<b>SEMA4A</b>	AD	Desarrollo y mantenimiento de la	DC, DCB y RP	13

retina				
<b>SLC24A1</b>	AR	Señalización y transporte celular	CNCE	21
<b>SLC25A46</b>	AR	Transporte mitocondrial	AO y OESR	ND
<b>SLC7A14</b>	AR	Transporte celular	RP	ND
<b>SNRNP200</b>	AD	<i>Splicing</i>	RP	20
<b>SPATA7</b>	AR	Desconocida	ACL y RP	27
<b>SPP2</b>	AD	Desconocida	RP	2
<b>TEAD1</b>	AD	Factor de transcripción	DCR	2
<b>TIMM8A</b>	LX	Transporte mitocondrial	AO y OESR	21
<b>TIMP3</b>	AD	Estructura celular	DM	16
<b>TMEM126A</b>	AR	Desconocida	AO	1
<b>TMEM237</b>	AR	Señalización celular	OESR	9
<b>TOPORS</b>	AD	Desconocida	RP	16
<b>TREX1</b>	AD	Reparación del ADN	OESR	63
<b>TRIM32</b>	AR	Ubiquitinación	SBB	14
<b>TRNT1</b>	AR	Traducción proteica	OESR	ND
<b>TRPM1</b>	AR	Transporte celular	CNCE	60
<b>TSPAN12</b>	AD	Señalización, migración y adhesión celular	OR	29
<b>TTC8</b>	AR	Ciliogénesis	RP y SBB	16
<b>TTL5</b>	AR	Función ciliar	DC y DCB	ND
<b>TTPA</b>	AR	Regulación de la vitamina E	OESR	25
<b>TUB</b>	AR	Factor de transcripción	OESR	ND
<b>TUBGCP4</b>	AR	Estructura celular	OESR	5
<b>TUBGCP6</b>	AR	Estructura celular	OESR	6
<b>TULP1</b>	AR	Desarrollo y mantenimiento de la retina	ACL y RP	60
<b>UNC119</b>	AD	Señalización celular	DC y DCB	3
<b>USH1C</b>	AR	Desarrollo y mantenimiento de la retina y la cóclea	USH	39
<b>USH1G</b>	AR	Ciliogénesis	USH	20
<b>USH2A</b>	AR	Estructura celular	RP y USH	818
<b>VCAN</b>	AD	Mantenimiento y estructura tisular	OESR	16
<b>WDPCP</b>	AR	Ciliogénesis y migración celular	OESR	5
<b>WDR19</b>	AR	Señalización celular y transporte ciliar	OESR	23
<b>WFS1</b>	AR	Homeostasis celular	OESR	319
<b>ZNF408</b>	AR y AD	Factor de transcripción	OR (ad) RP (ar)	ND
<b>ZNF423</b>	AR	Factor de transcripción	OESR	ND
<b>ZNF513</b>	AR	Factor de transcripción	RP	1



## 7.2 ANEXO II

**Características clínicas de todas las familias resueltas** en los distintos estudios presentados en la presente tesis doctoral, clasificadas según el artículo científico en el que aparecen. ACL: Amaurosis congénita de Leber; AD: Autosómico dominante; AFV: Alteración de la función vestibular; AM: Alteración macular; AR: Autosómico recesivo; AVS: Atenuación de los vasos sanguíneos; CHM: Coroideremia; CN: Ceguera nocturna; CT: Ceguera total; DAV: Disminución de la agudeza visual; DCB: Distrofia de conos y bastones; DCR: degeneración coriorretiniana; DI: Discapacidad intelectual; DPEO: Depósitos pigmentarios en forma de espículas óseas; E.A: Edad de aparición; EPR: Epitelio Pigmentario de la Retina; ND: No disponible; LX: Ligado al cromosoma X; PA: Pérdida de audición; PP: Palidez papilar; RCV: Reducción del campo visual; RP: Retinosis pigmentaria; SBB: Síndrome de Bardet-Biedl; sd: semi-dominante; STGD: Enfermedad de Stargardt; USH: Síndrome de Usher.

Art.	Fam.	Diag. Inicial	E.A. (años)	Primer síntoma	Síntomas en la última revisión clínica	Fondo de ojo	Diag. Final
I	368	RPAR	<10	CN	CT	DPEO, PP y AVS	RPAR
		SBB	6	CN	CN, RCV, DAV, Fotofobia, Discromatopsia, DI, polidactilia y obesidad	DPEO y AVS	SBB
II	S23	RPAR	4	CN	CN, RCV y DAV	DPEO, PP y AVS	RPAR
III	63	RPAD	6	CN	CN y RCV	DPEO, PP	RPAD
	82	RPAR	13	CN	CN, RCV y DAV	ND	RPAR
	95	RPE	7	CN	CN, RCV y DAV	ND	RPAR
	118	USH	9	CN	CN, Discromatopsia, PA y AFV	DPEO	USH
	134	RPAR	<10	RCV	CN, RCV, DAV y Discromatopsia	Fondo tigróide y AM	RPLX-sd
	157	ACL	<1	CT	CT y Nistagmo	DPEO, PP, AVS y AM	ACL
	193	RPAR	<10	Nistagmo y DAV	CN, RCV, DAV, Nistagmo y Fotofobia	AM	ACL tardía
	236	USH	12	CN	CN, RCV, DAV y PA	ND	USH
	247	RPAR	30	CN y RCV	CN RCV y Discromatopsia	DPEO	RPAR
	258	RPAR	25	CN	CN, RCV, DAV y Fotofobia	AM	RPAR
	264	RPAD	20	DAV	RCV y DAV	ND	RPAD
	277	RPAR	8	DAV	CN, RCV y DAV	ND	DCB temprana o ACL
	298	STGD	26	DAV	DAV y RCV-central	ND	STGD
	353	RPAR	7	DAV	RCV, DAV y Fotofobia	DPEO y AVS	DCB temprana o ACL
	356	USH	9	CN	CN, RCV, DAV y PA	PP y AVS	USH
	359	RPE	5	CN	CN y RCV	DPEO	RPAD
435	RPAR	0	RCV	CN, RCV y DAV	AM	RP con AM temprana*	
449	SBB	12	RCV	CN, RCV, DAV, Polidactilia y obesidad	PP	SBB	
488	SBB	0	CN y RCV	CT, Nistagmo, DI, Polidactilia y obesidad	ND	SBB	

	512	RS	5	DAV y Nistagmo	DAV, Fotofobia y Nistagmo	AVS, AM y esquisis foveal	RS
	519	SBB	0	DAV y Nistagmo	DAV, Nistagmo, DI, Polidactilia y obesidad	DPEO, PP, AVS y AM	SBB
	522	RS	<1	DAV	CN, RCV, DAV, Estrabismo y Nistagmo	AM	ACL-AD
<b>IV</b>	2	RPE	30	RCV	CN, RCV y DAV	DPEO, PP y AVS	RPAR
	4	RPE	8	DAV	RCV-central, CN y Discromatopsia	DPEO y AM	STGD
	10	RPE	10	CN	CN, RCV, DAV y Discromatopsia	DPEO, AVS y AM	RPAR
	11	RPE	2	CN	CN, RCV y Fotofobia	ND	CHM
	12	RPE	0	CN	CN, RCV, DAV y Nistagmo	ND	ACL
	14	RPE	4	CN	CN, RCV y DAV	ND	RPAR
	15	RPE	5	CN	CN, RCV, DAV y Fotofobia	ND	RPAD
	17	RPE	11	RCV	CN, RCV y DAV	ND	RPAR
	22	RPE	2	RCV	CN, RCV y DAV	ND	RPAD
	23	RPE	6	CN	CN, RCV y DAV	DPEO	RPAR
	24	RPE	3	CN	CN y RCV	AM	ACL
	27	RPE	<1	ND	Fotofobia	ND	ACL
	29	RPE	2	CN	CN, RCV y DAV	ND	RPLX
	30	RPE	0	CN	CN, RCV y DAV	DPEO, PP, AM	DCB-AD
	33	RPE	ND	ND	ND	ND	ACL-AD
	35	RPE	50	CN	ND	EPR alterado, PP y fondo en sal y pimienta.	RPAD
	36	RPE	ND	ND	ND	ND	RPAR
	37	RPE	4	RCV	CN, RCV, DAV, Nistagmo y Estrabismo	DPEO y AM	ACL
	39	RPE	23	CN	CN, RCV y DAV	Fondo en sal y pimienta y EPR alterado	RPAD
	42	RPE	25	CN	CN, RCV y DAV	DPEO, PP, AVS	RPLX
	44	RPE	<10	RCV	ND	ND	RPAR
	45	RPE	ND	CN	ND	DPEO, PP y AVS	RPAR
	46	RPE	13	CN	CN, RCV y Fotofobia	DPEO, AVS	RPAR
	48	RPE	0	ND	ND	ND	RPAD
	49	RPE	0	CN	CN y RCV	DPEO	RPAR
	50	RPE	20	CN	CN, RCV y DAV	DPEO	RPAD
	51	RPE	2	CN	CN y RCV	DPEO y PP	RPAR
	53	RPE	24	DAV	CN, RCV, DAV y Fotofobia	DPEO, PP, AVS y AM	DCB
	55	RPE	0	CN	CT	DPEO	RPAR
	56	RPE	37	CN	CN, RCV y DAV	DPEO, PP, EPR alterado y AM	RPAR
	59	RPE	0	CN	CN, RCV y DAV	DPEO, PP y AVS	RPLX
	60	RPE	18	RCV	CN, RCV, DAV, Fotofobia y PA	PP	USH
	61	RPE	ND	ND	ND	ND	ACL

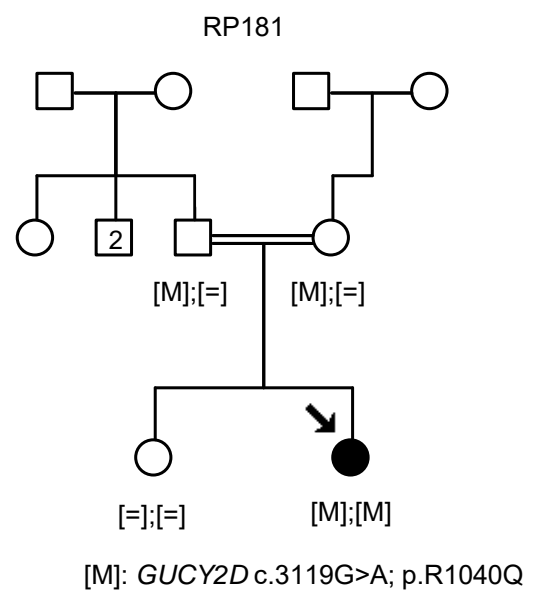
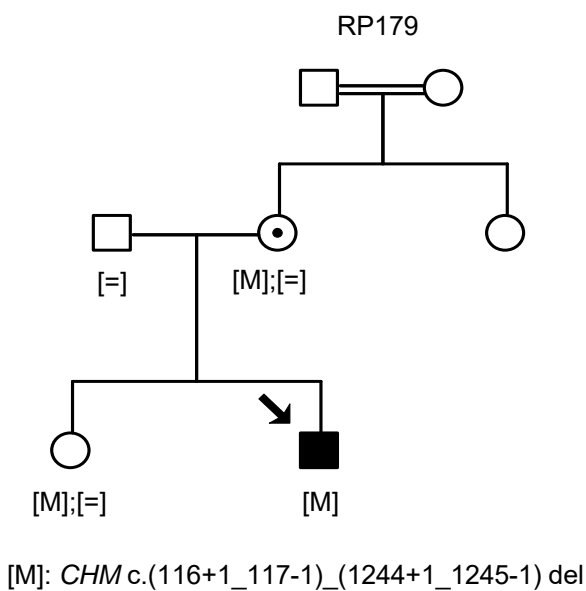
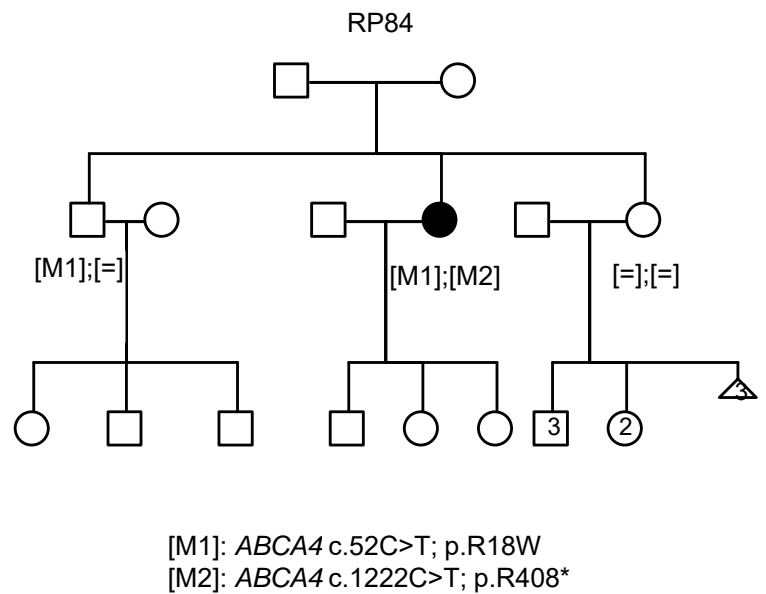
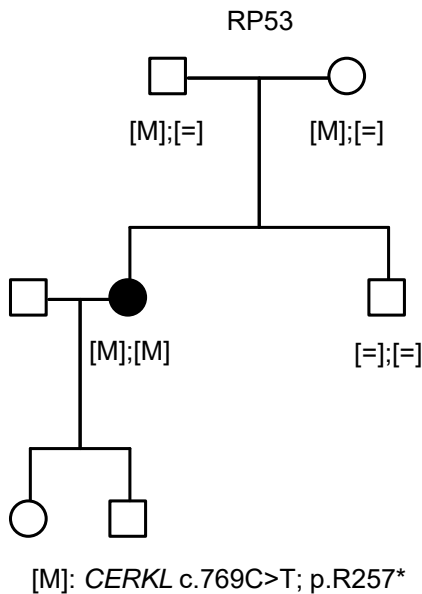


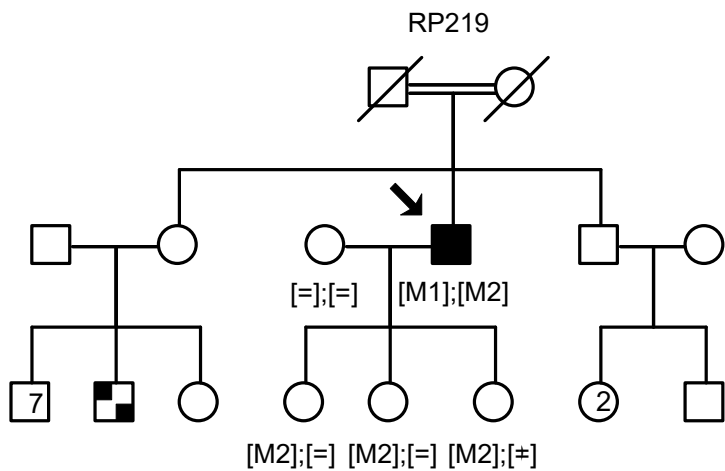
	62	RPE	27	RCV	CN, RCV y DAV	DPEO, PP y AVS	RPAR
	65	RPE	1,5	CN	CN, RCV, DAV, Fotofobia y Estrabismo	ND	DCB-LX
	66	RPE	22	CN	CN, RCV, DAV y Fotofobia	DPEO, PP, AVS	RPAR
	68	RPE	33	CN	CN	DPEO en la parte superior de la retina y AVS	RP (sector)-AD
	69	RPE	<10	CN	CN, RCV y DAV	DPEO, PP y AVS	RPAR
	70	RPE	ND	RCV	CN, RCV y DAV	DPEO, PP y AVS	RPLX
	71	RPE	34	CN	CN, RCV, DAV y Fotofobia	AVS	RPAR
	73	RPE	<10	CN	CN, RCV y DAV	DPEO	RPAR
	74	RPE	<10	CN	CN, RCV y DAV	ND	RPAR
	76	RPE	ND	CN	CN y RCV	ND	RPAD
	78	RPE	ND	ND	CN, RCV y DAV	ND	RPLX-sd
	79	RPE	40	CN	CN, RCV, DAV y Fotofobia	ND	RPAR
	81	RPE	<10	CN	CN, RCV y DAV	DPEO, PP y AVS	RPAR
	83	RPE	<10	CN	CN, RCV y DAV	Fondo tigoide	RPAD
	84	RPE	2	CN	CN, RCV y DAV	ND	RPAR
	85	RPE	12	CN	CN, RCV y DAV	ND	RPAR
	87	RPE	40	CN	CN, RCV, DAV y Discromatopsia	DPEO, PP, AVS y AM	RPAR
	91	RPE	32	CN/RCV	CN y RCV	AVS, drusas maculares y punteado blanquecino	Maculopatía-AD
	93	RPE	<10	RCV	CN, RCV, DAV y Fotofobia	DPEO, PP y AVS	ACL
	94	RPE	11	CN	CN, RCV y DAV	EPR alterado	CHM
	95	RPE	1	RCV	CN, RCV, DAV, Nistagmo y Estrabismo	AM	ACL
	97	RPE	13	DAV	CN, RCV, DAV, Fotofobia y Nistagmo	DPEO, PP, AVS y AM	RPAD con AM temprana
	100	RPE	25	ND	ND	ND	RPAR
	101	RPE	7	RCV	CN, RCV y DAV	ND	RPAR
	102	RPE	8	RCV	CN, RCV y DAV	ND	RPAD
	103	RPE	11	DAV	CN, RCV, DAV y Fotofobia	ND	DCB
	104	RPE	17	CN	CN y RCV	ND	RPAD
	107	RPE	25	CN	CN, RCV, DAV y Fotofobia	ND	RPAD
	108	RPE	25	CN	CN, RCV y DAV	ND	RPAR
	112	RPE	17	DAV	CN, RCV y DAV	ND	RPAD
	114	RPE	19	DAV	CN, RCV y DAV	ND	DCB
	115	RPE	17	CN	CN, RCV y DAV	ND	USH
	119	RPE	20	RCV	RCV y Fotofobia	ND	ACL
	122	RPE	ND	ND	ND	ND	STGD
	116	RPE	14	CN/DAV	CN, RCV, DAV, Estrabismo y Discromatopsia	DPEO, PP y amarillenta, drusas maculares, DCR	CHM
<b>V</b>	26	RPE	10	CN	CN, RCV y DAV	DPEO, PP y AVS	RPAR
	184	RPAR	17	CN	CN, RCV y DAV	DPEO, PP y AVS	RPAR



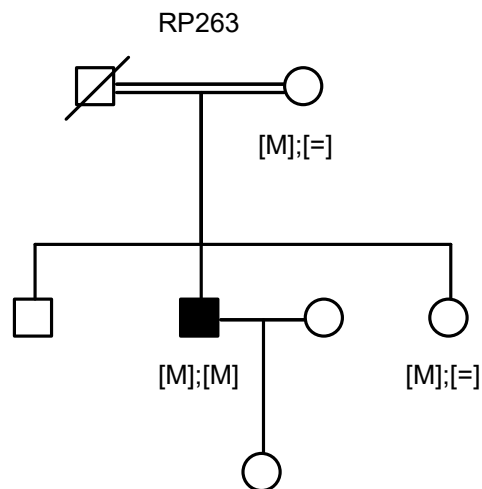
### 7.3 ANEXO III

**Segregaciones familiares de las variantes detectadas en el estudio de los casos aislados de RP (apartado 3.4).** Las variantes identificadas en familias en las que sólo disponemos del ADN del paciente índice, no están representadas debido a la imposibilidad de realizar el análisis de cosegregación.

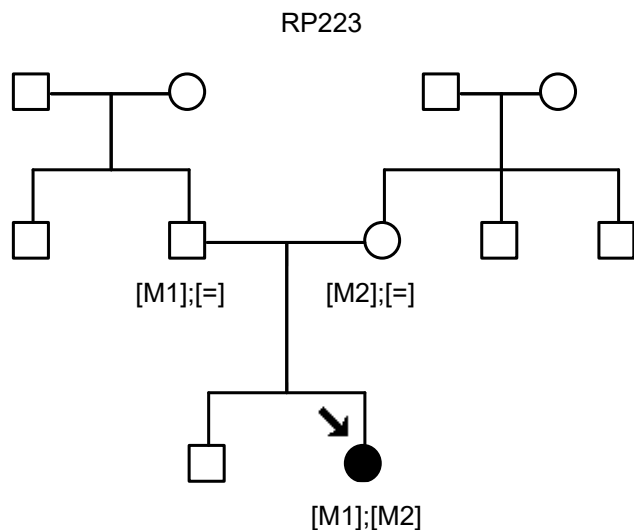




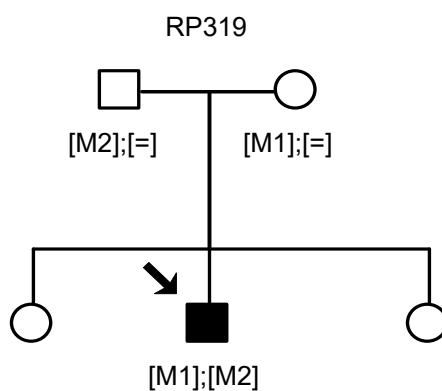
[M1]: *MYO7A* c.1993A>G; p.I665V  
 [M2]: *MYO7A* c.4008delG; p.E1337Sfs\*62



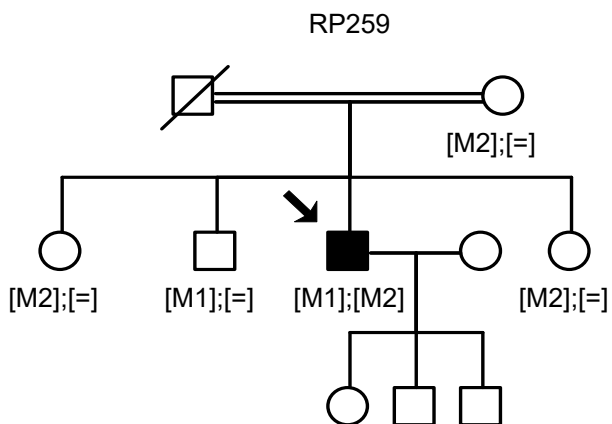
[M]: *PDE6B* c.385G>A; p.E129K



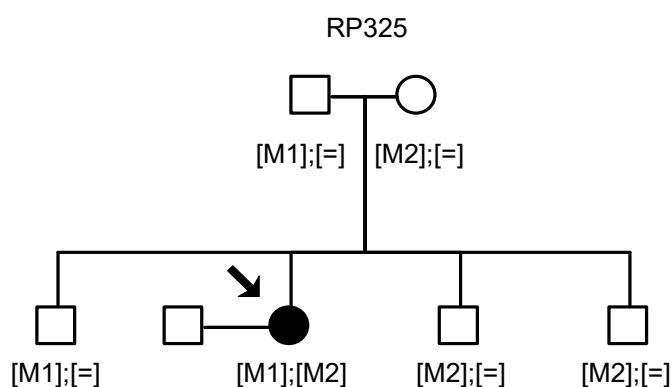
[M1]: *CRB1* c.2227delG; p.V7435Sfs\*11  
 [M2]: *CRB1* c.3299T>C; p.I11100T



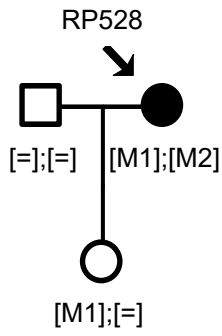
[M1]: *CRB1* c.613\_619del; p.I205Dfs\*13  
 [M2]: *CRB1* c.2843G>A; p.C948Y



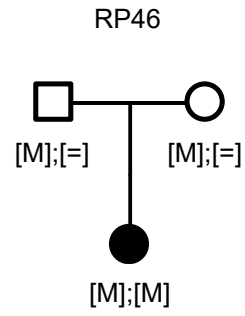
[M1]: *USH2A* c.1391G>A; p.R464H  
 [M2]: *USH2A* c.13822C>T; p.R4608\*



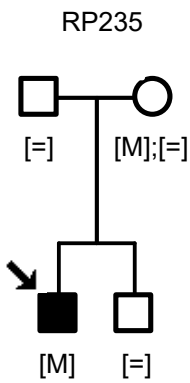
[M1]: *CEP290* c.4393C>T; p.R1465\*  
 [M2]: *CEP290* c.4705-1G>T; *splicing*



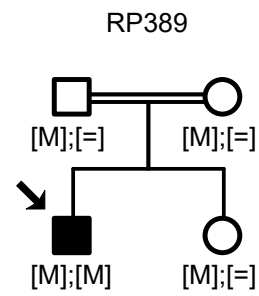
[M1]: *USH2A* c.2276G>T; p.C759F  
 [M2]: *USH2A* c.908G>A; p.R303H



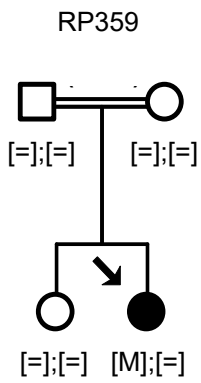
[M]: *CEP290* c.6604delA; p.I2202fs



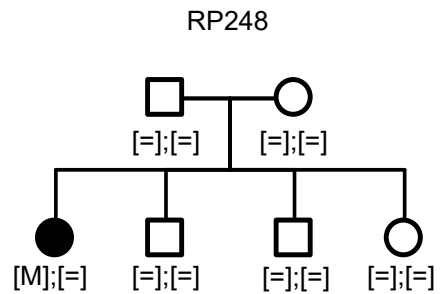
[M]: *RPGR* c.2257\_2260del; p.G753fs



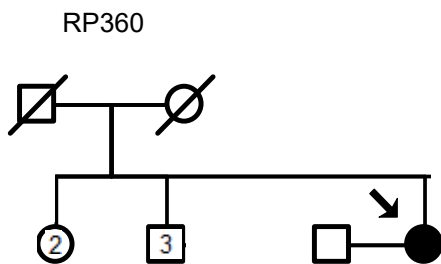
[M]: *PROM1* c.1984-1G>T; *Splicing*



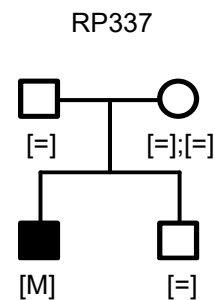
[M]: *PRPF8* c.6994dupG; p.D2332s



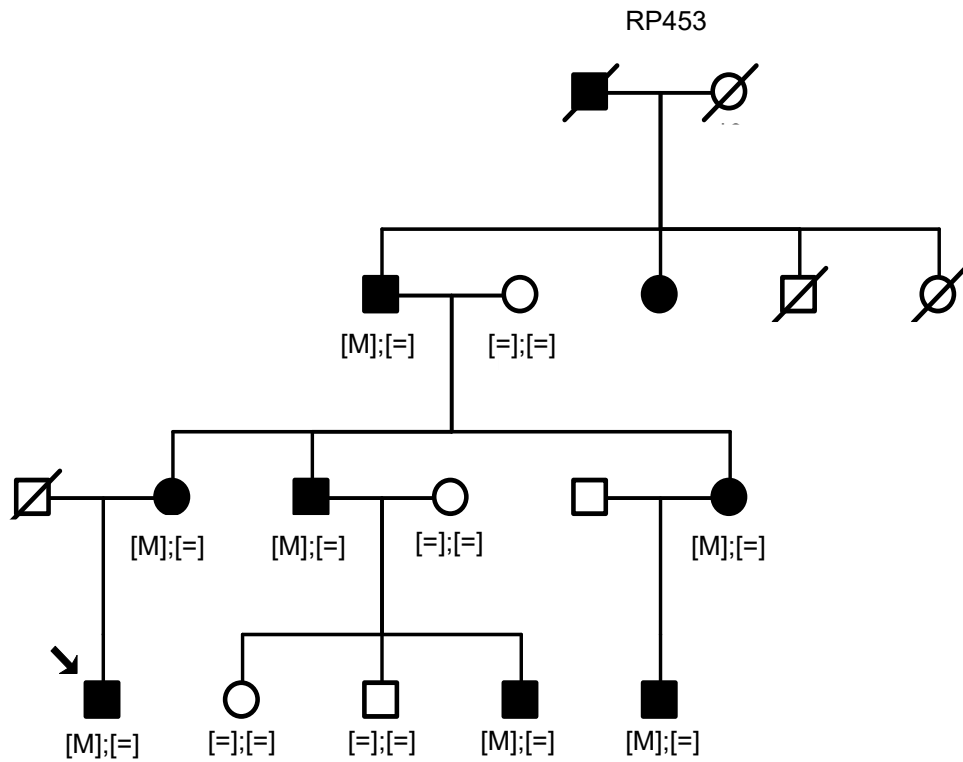
[M]: *RHO* c.403C>T; p.R135W



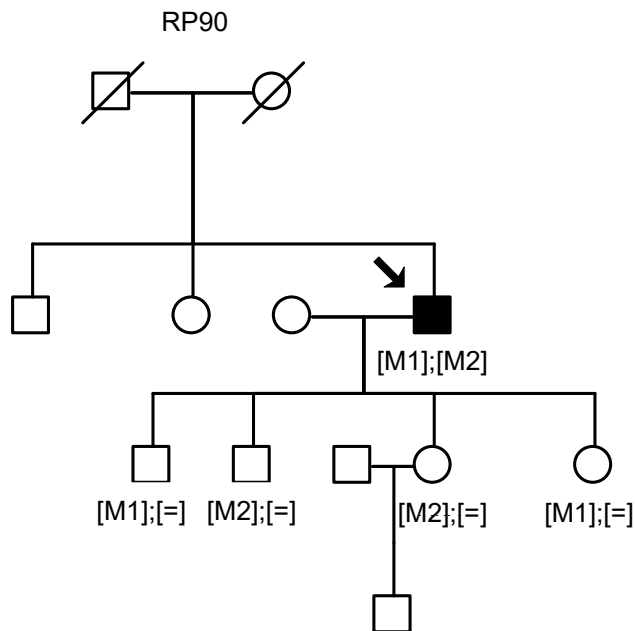
[M]: *RPGR* c.619+1G>T; *Splicing*



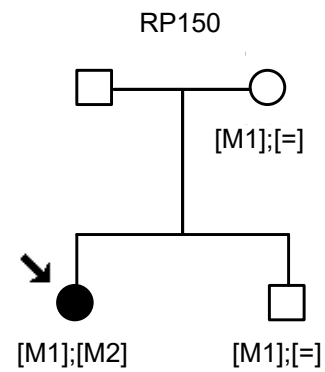
[M]: *RPGR* c.739C>T; p.Q247\*



[M]: *RHO* c.937-2\_944del; Splicing



[M1]: *USH2A* c.2276G>T; p.C759F  
 [M2]: *USH2A* c.13808A>C; p.H4603P



[M1]: *RP1* c.1625C>G; p.S542\*  
 [M2]: *RP1* c.5881C>T; p.Q1961\*