



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA CONDE DE VALENCIANA

ESTUDIO GENÉTICO-MOLECULAR EN FAMILIAS CON RETINOSIS
PIGMENTARIA AUTOSÓMICA RECESIVA POR MEDIO DE LIGAMIENTO
GENÉTICO A REGIONES HOMOCIGOTAS EN GENOMA COMPLETO Y
SECUENCIACIÓN DE GENES CANDIDATOS.

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: MAESTRÍA EN
CIENCIAS MEDICAS

PRESENTA:
RAÚL AYALA RAMÍREZ

TUTOR: DR. EN C. JUAN CARLOS ZENTENO RUÍZ
INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA CONDE DE VALENCIANA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

MEXICO, D.F. AGOSTO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Al Dr. Juan Carlos Zenteno por su valiosa tutoría, y por compartir su enorme conocimiento y pasión hacia la investigación desde mucho tiempo antes de este trabajo de tesis. Le agradezco el haber sido la persona que más ha influido positivamente en mi desarrollo académico y al cual considero mi principal maestro. Gracias Juan Carlos, te expreso mi gran admiración y aprecio.

Al Dr. Oscar Chacon quien me brindo su asesoria durante el curso de este trabajo, al cual agradezco sus multiples enseñanzas en el campo de la genetica y la biología molecular.

Un especial agradecimiento a la Dra. Beatriz Buentello por su dedicación, por su paciencia y por haberme compartido de su tiempo y conocimiento para realizar todos los estudios moleculares realizados en este trabajo de investigación.

A los tres agradezco su amistad.

Indice:

I.-Antecedentes

1.- La Retina -----	1
A: Generalidades Anatómicas	
B:- Retina Neurosensorial	
C.- Epitelio pigmentado de la retina	
D.- Embriología de la retina	
F.- Fisiología de la Retina	
1.- Fotoquímica de la visión – Rodopsina	
2.- Fisiología de la retina neurosensorial.	
3.- Transmisión de los impulsos:	
4.- Impulsos relacionados con contraste:	
5.- Fisiología del Epitelio Pigmentado de la Retina:	
2.- Retinosis Pigmentaria-----	15
A.- Generalidades	
B.- Cuadro Clínico	
C.- Diagnóstico clínico	
D.- Tratamiento	
3.- Genética de la Retinosis Pigmentaria -----	20
4.- Métodos de Diagnóstico Molecular de Retinosis Pigmentaría -----	24

II.- Métodos: -----	29
1.- Planteamiento del Problema-----	29
2.- Pregunta de Investigación-----	29
3.- Justificación-----	29
4.- Objetivo General-----	30
5.- Objetivos Particulares-----	30
6.- Diseño del Estudio-----	31
7.- Criterios de Inclusión-----	31
8.- Criterios de Exclusión-----	31
9.- Criterios de Eliminación-----	31
10.- Tipo de Muestreo-----	32
11.- Tamaño de Muestra-----	32

12.- Variables de Interés del Estudio-----	32
13.- Materiales y Métodos-----	35
A.- Análisis Genealógico y Clínico	
B.- Análisis Molecular	
1B.- Determinación de la Concentración y Pureza del DNA Obtenido	
2B.- Identificación de Regiones de Homocigosidad en Genoma Completo	
3B.- Amplificación por PCR	
4B.- Secuenciación Automatizada de los Productos de PCR	
5B.- Análisis de Predicción Funcional de Mutaciones	
C.- Análisis Estadístico	
D.- Consideraciones Éticas	
III.- Resultados-----	41
1.- Cuadro Clínico y resultado de mapeo por homocigosidad-----	41
Familia 1 (RPAR 2666)-----	41
Tabla 1A – Datos Clínicos Familia 1 (RPAR 2666)	
Caso Índice Familia 1	
Fotos Clínicas 1 - Caso Índice familia 1: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo	
Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 1	
Grafica 1 – Familia 1	

Tabla 1B - Familia 1: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Gen Candidato

Familia 2 (RPAR 464)-----45

Tabla 2A– Datos Clínicos Familia 2 (RPAR 464)

Caso Índice Familia 2

Fotos Clínicas 2 - Caso Índice familia 2: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 2

Grafica 2 - Familia 2

Tabla 2B - Familia 2: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Gen Candidato

Familia 3 (RPAR 475)-----49

Tabla 3A – Datos Clínicos Familia 3 (RPAR 475)

Caso Índice Familia 3.

Fotos Clínicas 3 - Caso Índice familia 3: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 3

Grafica 3 – Familia 3

Tabla 3B - Familia 3: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Genes candidatos

Familia 4 (RPAR 2637)-----54

Tabla 4A – Datos Clínicos Familia 4 (RPAR 2637)

Caso Índice Familia 4

Fotos Clínicas 4 - Caso Índice familia 4: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 4

Grafica 4 – Familia 4

Tabla 4B - Familia 4: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Familia 5 (RPAR 2643)-----57

Tabla 5A - Datos Clínicos Familia 5 (RPAR 2643)

Caso Índice Familia 5

Fotos Clínicas 5 - Caso Índice familia 5: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 5

Grafica 5 – Familia 5

Tabla 5B - Familia 5: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Familia 6 (RPAR 1928)-----60

Tabla 6A – Datos Clínicos Familia 6 (RPAR 1928)

Caso Índice Familia 6.

Fotos Clínicas 6 - Caso Índice familia 6: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 6

Grafica 6 – Familia 6

Tabla 6B - Familia 6: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Familia 7 (RPAR 2258)-----63

Tabla 7A – Datos Clínicos Familia 7 (RPAR 2258)

Caso Índice Familia 7

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 7

Grafica 7 – Familia 7

Tabla 7B - Familia 7: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Gen Candidato

Familia 8 (RPAR 2691)-----66

Tabla 8A – Datos Clínicos Familia 8 (RPAR 2691)

Caso Índice Familia 8

Fotos Clínicas 8 - Caso Índice familia 8: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 8

Tabla 8 – Familia 8

Tabla 8B - Familia 8: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Gen Candidato

Familia 9 (RPAR 2669)-----71

Tabla 9A – Datos Clínicos Familia 9 (RPAR 2669)

Caso Índice Familia 9.

Fotos Clínicas 9 - Caso Índice familia 9: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 9

Grafica 9 – Familia 9

Tabla 9B - Familia 9: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Familia 10 (RPAR 2583 y RPAR 2581)-----75

Tabla 10A – Datos Clínicos Familia 10 (RPAR 2583 y RPAR 2581)

Caso Índice Familia 10 (RPAR 2583)

Fotos Clínicas 10 - Caso Índice familia 10: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 10

Grafica 10 – Familia 10

Tabla 10B - Familia 10: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Familia 11 (RPAR 2712)-----80

Tabla 11A – Datos Clínicos Familia 11 (RPAR 2712)

Caso Índice Familia 11

Fotos Clínicas 11 - Caso Índice familia 11: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 11

Grafica 11 – Familia 11

Tabla 11B - Familia 11: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Familia 12 (RPAR 2740)-----83

Tabla 12A – Datos Clínicos Familia 12 (RPAR 2740)

Caso Índice Familia 12

Fotos Clínicas 12 - Caso Índice familia 12: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 12

Grafica 12 – Familia 12

Tabla 12B - Familia 12: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Familia 13 (RPAR 2773)-----86

Tabla 13A – Datos Clínicos Familia 13 (RPAR 2773)

Caso Índice Familia 13

Fotos Clínicas 13 - Caso Índice familia 13: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 13

Grafica 13 – Familia 13

Tabla 13B - Familia 13: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Familia 14 (RPAR 2788)-----89

Tabla 14A – Datos Clínicos Familia 14 (RPAR 2788)

Caso Índice Familia 14

Fotos Clínicas 14 - Caso Índice familia 14: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 14

Grafica 14 – Familia 14

Tabla 14B - Familia 14: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Familia 15 (RPAR 2793)-----93

Tabla 15A – Datos Clínicos Familia 15 (RPAR 2793)

Caso Índice Familia 15

Fotos Clínicas 15 - Caso Índice familia 15: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 15

Grafica 15 – Familia 15

Tabla 15B - Familia 15: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

2.- Resultado de Secuenciación de Genes Candidatos-----98

Tabla 16A – Resumen de regiones secuenciadas y resultados de la secuenciación.

Figura 9: Imagen del resultado de secuenciación de la familia RPAR 2691

III.- Discusión-----100

IV.- Referencias-----105

I.- Antecedentes:

1.- La Retina:

A: Generalidades Anatómicas:

La retina (Figura 1) es el tejido fotosensible que se encuentra en el segmento posterior del globo ocular. La función de esta, es capturar la luz externa y procesar el estímulo resultante, procesos muy complejos e incompletamente entendidos (1). Los límites anatómicos de la retina se extienden: 1.- internamente con el cuerpo vítreo, 2.-, externamente con la coroides, 3.-anteriormente con los epitelios pigmentados y no pigmentados de cuerpo ciliar y pars plana, 4.- posteriormente con la cabeza del nervio óptico.

El área total de la retina se estima que es de $1,250\text{mm}^2$. El grosor de está depende del lugar donde se cuantifique, siendo de 0.1 en las cercanías de la ora serrata, en el ecuador de 0.19mm y cerca del nervio óptico de entre 0.50 - 0.56mm (2). Anatómicamente la retina se divide en mácula y retina periférica.

La mácula se define como aquella área de retina en la cual presenta una capa de células ganglionares de más de una célula de grosor, y esta centrada a 4mm temporal y 0.8mm inferior al nervio óptico. Existe una depresión central de la mácula llamada fóvea, que comprende una superficie de 1.5mm en diámetro. Dentro de la fóvea se denomina foveola a su área central y comprende un área de 350 um de diámetro, la cual carece de los núcleos de las células neuronales de la retina y es avascular, lo que provoca su coloración más oscura, y un adelgazamiento más pronunciado de la retina (entre 200 y 250 micras de grosor).

La retina periférica se extiende de la mácula hasta la ora serrata. Se define como cualquier área de la retina con una capa de células ganglionares con un grosor de una única célula (3).



Figura 1. Foto Clínica de una retina humana sana.

Histológicamente la retina se divide en retina neurosensorial y el epitelio pigmentado de la retina.

B:- Retina Neurosensorial:

La retina neurosensorial (Figura 2) esta a su vez dividida histológicamente en 9 capas. Está compuesta de Neuronas (40%), células de la Glía (55%) y elementos vasculares (5%).

Sus 9 capas de la más externa a la más interna son:

1.- Capa de fotorreceptores: Se trata de la capa formada por los segmentos externos de los fotorreceptores, los cuales son de dos tipos:

Conos: Su densidad máxima se encuentra en la mácula, mayoritariamente en la fovea. Existen tres tipos de conos: rojos, verdes y azules según su sensibilidad máxima, que depende del tipo de pigmento fotosensible que contengan que puede ser de 561, 530, ó 430 nanómetros respectivamente. Existen aproximadamente 6 millones de conos en la retina.

Bastones: Existen aproximadamente 120 millones de bastones en la retina humana. Todos ellos utilizan un único pigmento fotosensible llamado rodopsina, por lo tanto son monocromáticos y se utilizan para la visión en condiciones escotópicas (de poca luz).

2.- Membrana limitante externa: No es una verdadera membrana basal, y esta formada por las uniones estrechas entre los fotorreceptores y las células de Müller.

3.- Capa nuclear externa: Esta capa está formada por los núcleos de los fotorreceptores (conos y bastones).

4.- Capa plexiforme externa: Formada por los procesos sinápticos entre los fotorreceptores y los procesos dendríticos de las células bipolares.

5.- Capa nuclear interna: es la última capa que aun recibe aporte sanguíneo de la vasculatura retiniana (las capas de fotorreceptores, nuclear y plexiforme externa solo recibe aporte sanguíneo de la coroides). Esta capa contiene los cuerpos celulares de las células bipolares, amacrinas, horizontales y de Müller.

6.- Capa plexiforme interna: Existe debido a los procesos sinápticos entre las células ganglionares con las bipolares, al igual que las sinapsis entre las células amacrinas y bipolares.

7.- Capa de células ganglionares: Formada por los núcleos de las células ganglionares, que en la periferia de la retina esta formada por una sola célula de grosor y en la mácula existen más de un núcleo (multicapa) de células ganglionares de grosor.

8.- Capa de fibras nerviosas: está constituida por los axones desmielinizados de las células ganglionares, los cuales al unirse forman al nervio óptico, que al pasar esté por la lamina cribosa se mieliniza. Esta capa también contiene células de la glía como astrocitos.

9.-Membrana limitante interna: La forman los pedículos de los procesos de las células de Müller. Es una verdadera membrana basal (4).

Los elementos vasculares de la retina neurosensorial emergen de la papila óptica como paquetes troncales vasculares que contienen vena y arteria, con una relación arteria/vena de 1 a 3. Se distinguen cuatro arcadas vasculares que son nombradas, arcadas temporales superior e inferior y arcadas nasales inferior y superior (5).

Los vasos sanguíneos de la retina neurosensorial son histológicamente muy parecidos a los del sistema nervioso central. Estos están formados por una capa simple de células endoteliales no fenestradas con uniones firmes y una lamina basal que cubre a las células endoteliales, interrumpida por pericitos murales. No tienen lámina elástica interna ni capa continua de músculo liso. Estas características son las que forman la denominada barrera hemato-retiniana, la cual al igual que la barrera hemato-encefálica, es muy selectiva con respecto al paso de sustancias del lumen vascular hacia el tejido adyacente (5).

C.- Epitelio pigmentado de la retina:

Es una monocapa de células hexagonales, polarizadas, desde el disco óptico hasta la ora serrata en donde se vuelve epitelio pigmentado del cuerpo ciliar. En el lado basal tiene pliegues intrincados para producir mayor superficie de adherencia a la delgada membrana basal (lamina basal) que forma la capa interna de la membrana de Bruch. El ápice tiene múltiples procesos vellosos dentro de los cuales se introducen los segmentos externos de los fotorreceptores.

Las células del epitelio pigmentado de la retina (EPR), presentan adherencias firmes laterales (entre célula y célula de EPR), con uniones firmes que bloquean el paso libre de agua e iones. La barrera formada por estas uniones celulares (zónula ocluyente), es el equivalente de la barrera hemato-retiniana de la vasculatura de la retina neurosensorial. El EPR es un tejido vital para el mantenimiento de los fotorreceptores y existe una relación de una célula de EPR por cada 30 a 40 fotorreceptores. El pigmento que le da al EPR su nombre es la melanina, la cual está presente en su citoplasma dentro de unos gránulos llamados melanosomas (5).

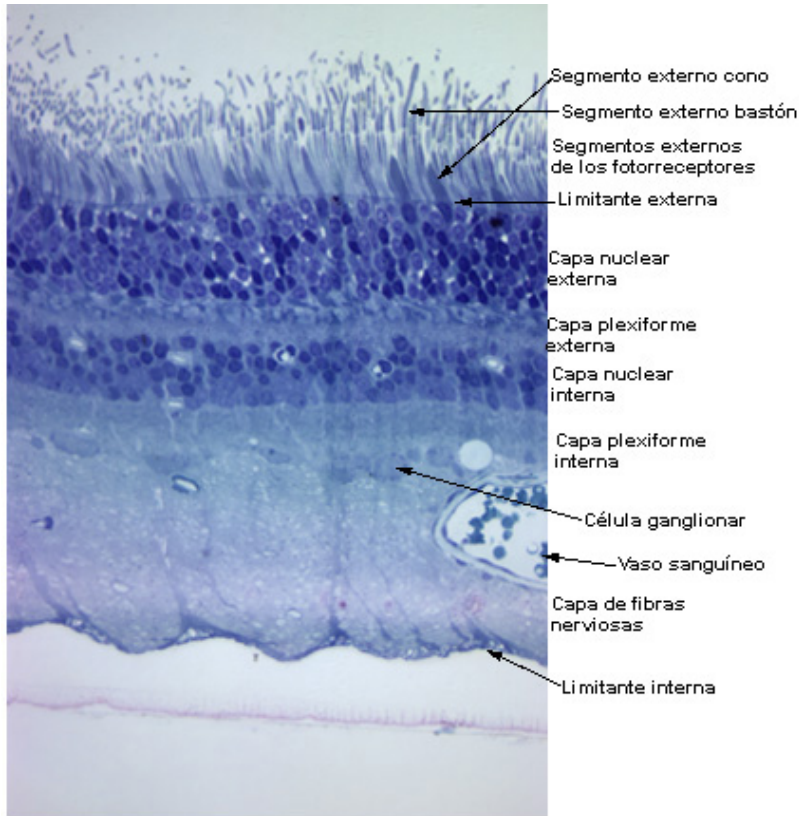


Figura 2.- Imagen histologica de la retina neurosensorial.

D.- Embriología de la retina:

El ojo y el cerebro derivan embriológicamente del ectodermo, específicamente del llamado neuroectodermo (6). El neuroectodermo se ensancha y forma la vesícula óptica, de la cual, posteriormente se forma una evaginación que forma la copa óptica, alrededor del día 25.

El desarrollo de la retina ocurre muy tempranamente durante la gestación. Al momento de la evaginación de la vesícula óptica para formar la copa óptica, la pared retiniana interna se ha dividido en dos zonas una zona superficial marginal y otra más profunda, con células nucleadas denominada zona primitiva. La capa más profunda de esta zona primitiva, desarrolla cilios y de esta se forma el EPR. A su vez las capas menos profundas de esta zona primitiva, empieza a dividirse por mitosis hasta formar dos capas

nucleares, las capas neuroblásticas internas y externas. De la capa neuroblástica interna se diferencian las células de Müller, amacrinas y ganglionares. De la capa neuroblástica externa se desarrollan células bipolares, horizontales y los precursores de los fotorreceptores. Los conos aparecen primero entre los meses 4 y 6 de gestación, los bastones alrededor del séptimo mes (7).

La mácula presenta un desarrollo con características muy singulares. Este inicia muy tempranamente con la diferenciación e incremento del número de células ganglionares, las cuales se alargan tanto que los cuerpos celulares se comienzan a desplazar periféricamente y los axones se posicionan casi de forma vertical, formando la capa de fibras nerviosas. El desarrollo de la mácula continúa aproximadamente 4 meses después del nacimiento y se cree que es dependiente del estímulo luminoso (7).

F.- Fisiología de la Retina:

Los fotorreceptores (Figura 3) tienen 4 segmentos funcionales: en el segmento externo se encuentra el pigmento fotoquímico sensible a la luz que se encuentran incorporadas a las membranas de los discos (aproximadamente 1000 discos en cada fotorreceptor) en forma de proteínas transmembranales. El segmento interno contiene el citoplasma común y sus orgánulos. El núcleo y el cuerpo sináptico que es la porción que conecta con la siguiente neurona (células horizontales y bipolares).

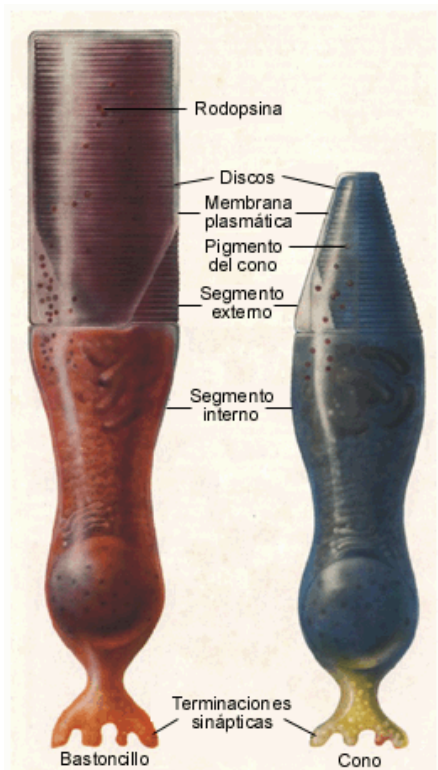


Figura 3: Ilustración de los fotorreceptores, Bastón (derecha) y Cono (izquierda).

Los conos y los bastones contienen sustancias químicas que se descomponen con la exposición a la luz de las cuales existen cuatro tipos. Cada una de estos pigmentos visuales contiene 11-cis-retinal más una proteína del tipo opsina. Los conos rojos, utilizan la opsina eritropsina, los verdes, cloropsina y los azules cianopsina. Los bastones utilizan rodopsina, la cual por mucho es la opsina más estudiada y se asume que los cuatro tipos de pigmentos visuales comparten una función muy similar.

1.- Fotoquímica de la visión - Rodopsina

La rodopsina es una combinación de una proteína escotopsina y el pigmento carotinoide retinal. Esta forma cis del retinal tiene importancia porque es la única forma química que puede unirse con la escotopsina para sintetizar rodopsina. Cuando la rodopsina absorbe energía luminosa, en trillonésimas de segundo comienza a descomponerse. La causa de esto es la fotoactivación de electrones en la porción

retiniana de la rodopsina, la cual conduce a un cambio instantáneo de la forma cis del retinal a la forma 11-trans, que tiene aun la misma estructura química de la forma cis, pero una estructura física diferente, es una molécula lineal y no una curva. Los sitios de reacción del 11-trans retinal no se adecuan a los sitios reactivos de la escotopsina, con lo cual se comienza a desplazar ésta. El producto inmediato es la batorrodopsina. La batorrodopsina es un compuesto muy inestable y en nanosegundos se convierte en lumirrodopsina. Esta, en microsegundos, se convierte en metarrodopsina I, después en Metarrodopsina II y finalmente de manera mas lenta (en segundos) en los productos de la partición: escotopsina y 11-trans retinal. La metarrodopsina II, también llamada rodopsina activada, excita los cambios eléctricos en los bastones que después transmiten la imagen visual. El primer estadio en la reformación de la rodopsina, es reconvertir el 11-trans retinal en 11-cis retinal. En la oscuridad, este proceso es catalizado por la enzima isomerasa de retinal. Una vez formado el 11-cis retinal, se recombina con la escotopsina para reformar la rodopsina. Existe una segunda ruta química por la cual el 11-trans retinal puede convertirse en 11-cis retinal. Esta ruta es por conversión, primero, del 11-trans retinal en 11-trans retinol, una forma de la vitamina A; posteriormente, el 11-trans retinol se convierte en 11-cis retinol con la intervención de la enzima isomerasa. Por último el 11-cis retinol se convierte en 11-cis retinal (Figura 4). La vitamina A se encuentra en el citoplasma de los conos y capa de EPR. Está siempre disponible para formar nuevo retinol cuando se le requiera. Cuando hay exceso de retinal se convierte de nuevo en vitamina A; con lo cual se reduce la cantidad de pigmento sensible a la luz disponible en la retina (8).

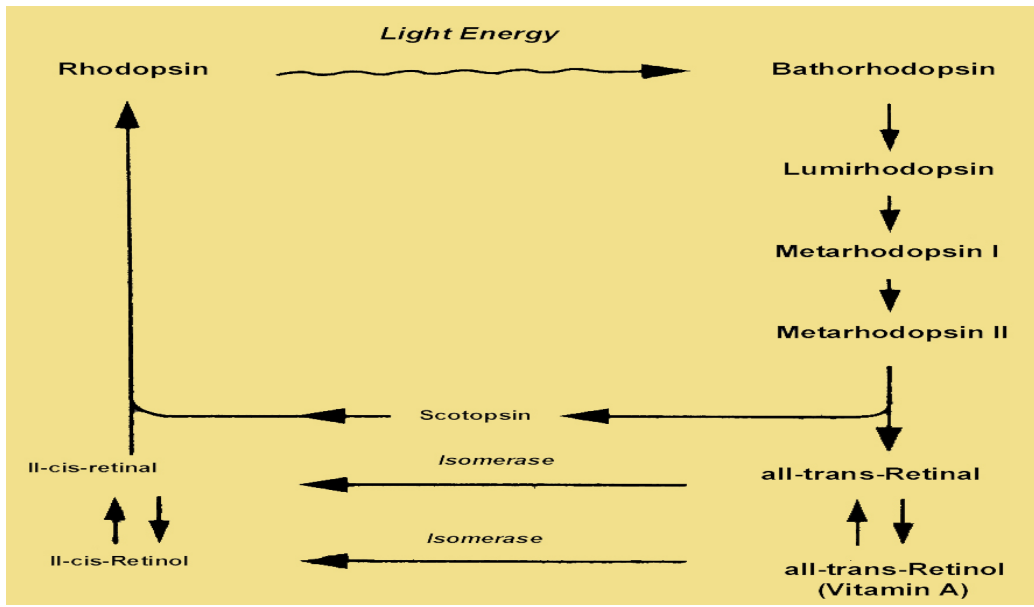


Figura 4.- Ilustración del ciclo de la rodopsina.

El potencial de membrana de los fotorreceptores es hiperpolarizante y no despolarizante. El potencial del receptor del bastón es diferente de los potenciales de otro tipo de receptores sensoriales. En éste, la excitación aumenta la negatividad del potencial de membrana. En una fracción de segundo, otra enzima, la de cinasa rodopsina inactiva la rodopsina y toda la cascada se revierte al estado normal, con los canales de sodio abiertos. Los conos son cerca de 300 veces menos sensibles que los bastones (9).

2.- Fisiología de la retina neurosensorial.

Los diferentes tipos de células neuronales (Figura 5) son: 1.- Fotorreceptores: conos y bastones. 2.- Células horizontales, las cuales transmiten los impulsos de forma horizontal desde los conos y bastones hacia las dendritas de las células bipolares. 3.- Células bipolares, que transmiten los impulsos de forma directa desde los conos y bastones, así como desde las células horizontales y amacrinas hacia las ganglionares. 4.- Células amacrinas que transmiten las señales en dos direcciones: de manera directa desde las células bipolares a las células ganglionares u horizontalmente entre los axones de las células bipolares, las dendritas de las células ganglionares, de otras células amacrinas o

ambas. 5.- Células ganglionares las cuales transmiten impulsos aferentes desde la retina a través del nervio óptico hacia el cerebro (10).

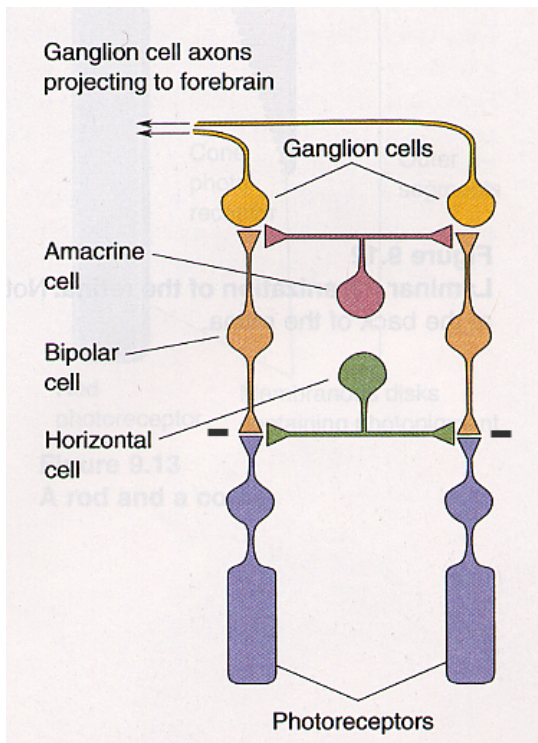


Figura 5: Ilustración de la disposición de los distintos tipos de células neuronales de la retina.

Como todos los sistemas sensoriales del cuerpo, la retina tiene un tipo arcaico de visión basada en los bastones y un tipo nuevo de visión que corresponde a los conos. Existe una vía directa en las que participan principalmente 3 neuronas. Los conos, las células bipolares y las células ganglionares. Las células horizontales también transmiten impulsos inhibitorios lateralmente en la capa plexiforme externa; del mismo modo las células amacrine transmiten impulsos en la capa plexiforme interna, también en forma lateral. Para la visión con bastones existen cuatro tipos de neuronas en la vía visual directa: 1) bastones, 2) células bipolares, 3) células amacrine y 4) células ganglionares. De igual forma, las células horizontales y amacrine proveen las conexiones laterales (11).

3.- Transmisión de los impulsos:

La transmisión de los impulsos no ocurre por potenciales de acción, sino por conducción electrotónica: que significa flujo directo de corriente eléctrica. Sucede una hiperpolarización en respuesta a la luz en el segmento externo y casi el mismo grado de ésta se conduce por flujo directo de corriente eléctrica hacia el cuerpo sináptico, sin que aparezca un potencial de acción; la conducción electrotónica también realiza la transmisión de impulsos en la mayor parte de las neuronas retinianas a excepción de las células. Ganglionares que si transmiten su información al cerebro por medio de potenciales de acción. La importancia de la conducción electrotónica radica en que permite la conducción graduada de la fuerza de los impulsos. Por esto, en los conos y bastones el potencial eferente hiperpolarizante está en relación directa con la intensidad de iluminación; los impulsos no siguen la ley del todo o nada, como en el caso de la conducción por potenciales de acción (12).

La inhibición lateral aumenta el contraste visual y es una función de las células horizontales. Las señales eferentes de las células horizontales son siempre inhibitorias, y estas conexiones laterales previenen la dispersión lateral de los patrones visuales transmitidos hacia el sistema nervioso central. Este es el mecanismo esencial que permite la alta precisión visual, transmitiendo contornos en contraste con la imagen visual. Es probable que las células amacrinas aporten una inhibición lateral adicional, que mejora el contraste visual (12).

Los dos tipos diferentes de células bipolares que proveen de impulsos excitatorios e inhibitorios en la vía visual son las hiperpolarizantes y despolarizantes. Esto significa que algunas células bipolares se despolarizan cuando los conos y bastones se excitan y otras se hiperpolarizan. La importancia de esto es que proporciona un segundo mecanismo de inhibición lateral que se suma al mecanismo de las células horizontales. Con este sistema se tiene un mecanismo muy preciso para la separación del contraste de los contornos de

la imagen visual, aunque los bordes caigan en la zona entre dos fotorreceptores adyacentes (13).

Las células amacrinas son una forma de interneuronas que ayudan al inicio del análisis de los impulsos visuales antes de que salgan de la retina. Se han identificado cerca de 30 tipos de células amacrinas la mayoría no se sabe cual es su función. Algunas forman parte de la vía directa para la visión con bastones, otras responden en forma intensa al inicio del estímulo visual, pero dicha respuesta decae con rapidez; algunas otras responden al final del estímulo (12,13).

Existen 3 tipos de células ganglionares retinianas cada una con diferente función. Las células W que transmiten la visión con bastones. Estas células constituyen el 40% de todas las células ganglionares; son pequeñas, y sus impulsos son de baja velocidad. Tienen influencia en un extenso campo retiniano porque sus dendritas tienen amplia distribución. Son sensitivas de manera especial a la detección de movimiento direccional en cualquier lugar del campo de visión y es probable que tengan importancia fundamental para la visión escotópica. Las células X son las más numerosas, cerca de 55% del total, impulsos de velocidad intermedia, tienen un campo retiniano reducido por que sus dendritas no tienen amplia distribución. Sin embargo, a través de las células X se transmite de forma principal la imagen visual, porque también reciben potencial de entrada de por lo menos un cono y quizás a ellas se deba la transmisión de la visión cromática. Las células Y son las mas grandes y transmiten sus impulsos a velocidades muy rápidas. Son las más escasas constituyendo solo el 5% pero sus dendritas tienen una amplia distribución por todo el campo visual. Responden a rápidos cambios en la imagen visual, movimiento rápido o cambio en intensidad de la luz (13).

4.- Impulsos relacionados con contraste:

Cuando un estímulo luminoso es fuerte e incide en un fotorreceptor de manera directa, lo excita de manera importante, mientras que a un fotorreceptor adyacente, lo puede excitar por dispersión del estímulo o indirectamente, generando un estímulo débil,

las células horizontales se encargan de inhibir el estímulo débil y así darle un mayor contraste a la imagen (ver imagen inferior). También cuando un fotorreceptor es estimulado por la luz y a sus fotorreceptores adyacentes se encuentran en oscuridad el estímulo pasa directamente a la célula bipolar hacia la ganglionar sin activarse los estímulos inhibitorios de las células horizontales (12, 13). Los ajustes que hace la retina para adaptarse al ambiente (Figura 6) es bien conocida por todos, al experimentar la adaptación a la oscuridad o a la luz cuando pasamos de una escena luminosa a una oscura y viceversa como por ejemplo cuando vamos al cine (13, 14).

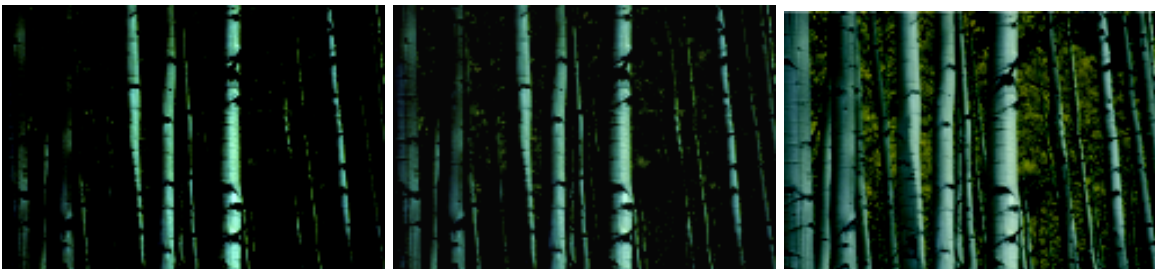


Figura 6: Estas son imágenes que esquematizan como es que la retina se va adaptando gradualmente a un patrón de imagen por ejemplo líneas verticales.

5.- Fisiología del Epitelio Pigmentado de la Retina:

El epitelio pigmentado de la retina (EPR) mantiene estrechas interacciones con los tejidos adyacentes a base de matrices extracelulares en ambos lados del EPR. Para una interacción cercana con los fotorreceptores, el EPR tiene largos cilios apicales que rodean los segmentos externos de los fotorreceptores. El espacio entre el EPR y los fotorreceptores está lleno de matriz interfotorreceptor. Esta matriz es esencial para las interacciones entre estas dos estructuras al permitir el intercambio de nutrientes, moléculas de señales y productos finales del metabolismo. Del lado de la coriocapilaris el EPR está separado por la membrana de Bruch que es una estructura multicapa de matriz

extracelular. La membrana de Bruch representa una interface para el intercambio de nutrientes y moléculas de señales en este caso entre el EPR y la coriocapilaris (15).

Por su pigmentación el EPR absorbe la energía luminosa cuando esta es enfocada hacia la mácula por el cristalino. Como parte de la barrera hemato-retiniana, transporta nutrientes como glucosa o vitamina A de la sangre hacia los fotorreceptores. Por el otro lado elimina el acúmulo de agua del espacio subretiniano de la actividad metabólica de los fotorreceptores o proveniente del humor vítreo. El transporte de agua se lleva a cabo principalmente por el transporte de cloro del espacio subretiniano a la sangre. Aun más el EPR es esencial para establecer y mantener el privilegio inmune del ojo. Esto no es establecido solo por su función de barrera pero también por que interfiere con las vías de señales que coordinan el sistema inmune y tiene funciones de supresión inmune en el ojo sano (15).

El EPR no solo controla la cantidad de fluidos en el espacio subretiniano, ayuda a establecer una cantidad constante de iones en el espacio subretiniano al compensar los cambios inducidos por la luz, como la depleción de potasio por los fotorreceptores, el EPR lleva potasio al espacio subretiniano para compensarlo. También el EPR sirve para el funcionamiento visual ya que los fotorreceptores son incapaces de isomerizar el all-trans retinal hacia 11-cis retinal que es llevado a cabo por el EPR y este pasa de nuevo a los fotorreceptores que lo convierten en rodopsina. La exposición luminosa de los fotorreceptores va acompañado de daño foto-oxidativo de las proteínas y fosfolípidos de los segmentos externos, estos productos son escamados por los fotorreceptores y fagocitados por el EPR. Esto ocurre de una manera circadiana con un pico en la puesta de la luz. En los humanos los segmentos externos son renovados completamente cada 11 días. El EPR excreta una variedad de factores, entre ellos factores de crecimiento como, el factor derivado del epitelio pigmentado y el factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF) para el mantenimiento de los fotorreceptores y los endotelios (15, 16) (Figura 7).

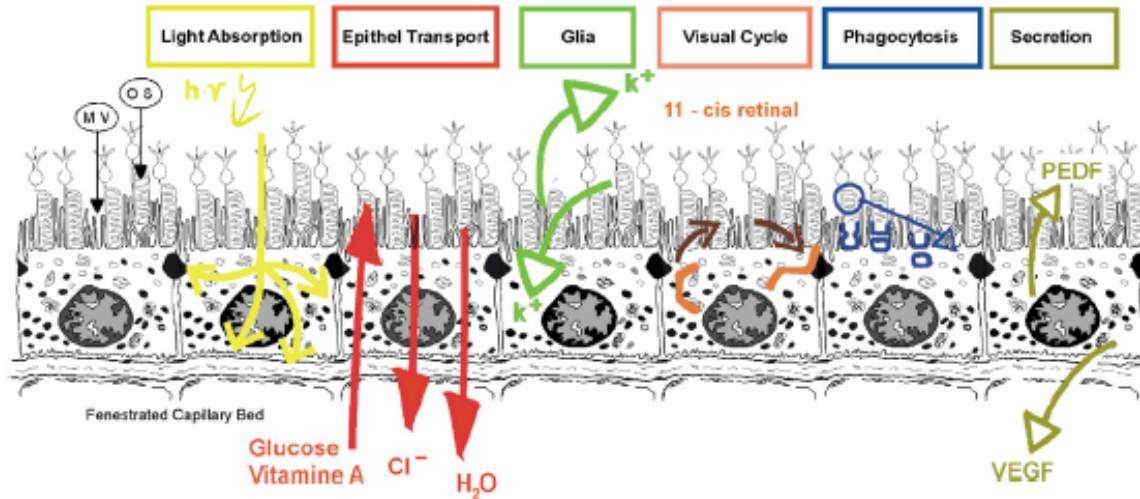


Figura 7: Ilustración que resume las funciones del epitelio pigmentado de la retina.

2.- Retinosis Pigmentaria

A.- Generalidades

Las enfermedades retinianas hereditarias son un grupo de retinopatías hereditarias complejas, de las cuales se pueden distinguir dos grupos principales: un grupo de enfermedades retinianas progresivas (al menos en alguna etapa de la enfermedad), usualmente no presentes al nacimiento (siendo la excepción la amaurosis congénita de Leber), casi siempre simétricas y bilaterales, llamadas distrofias retinianas, y un segundo grupo de enfermedades retinianas llamado trastornos estacionarios, también hereditarias y bilaterales, pero a diferencia de las distrofias retinianas presentes desde el nacimiento, no progresivas y con un pronóstico hasta cierto punto favorable (por ejemplo las acromatopsias y la ceguera nocturna estacionaria) (17). Algunos autores consideran a todas las enfermedades retinianas hereditarias en un solo grupo y utilizan el término de distrofia retiniana como sinónimo. Dentro de las enfermedades retinianas hereditarias se incluyen a decenas de diferentes enfermedades (18), y en la actualidad se conocen 207

genes (19) causantes de distrofias retinianas siendo la retinosis pigmentaria su representante más emblemático y también la distrofia retiniana más frecuente.

El termino retinosis pigmentaria (RP) engloba un grupo de enfermedades retinianas determinadas genéticamente por un gran numero de mutaciones que resultan en una gradual muerte celular de los fotorreceptores, primero los bastones y posteriormente los conos, que eventualmente provoca ceguera. Por eso a la RP se le conoce también como distrofia bastón-cono, en la cual la perdida de la función de los bastones precede a la reducción de la sensibilidad de los conos (20, 21). La RP es la más común de las degeneraciones retinianas hereditarias con un prevalencia mundial de aproximadamente 1 en cada 3500-5000 individuos, con mas de un millón de personas afectadas en el mundo (22, 23, 24).

B.- Cuadro Clínico

Las características clínicas de la Retinosis Pigmentaria (Figura 8) varían de unos pacientes a otros, incluso entre los miembros afectados de una misma familia. La sintomatología suele iniciarse en la infancia y la dificultad de adaptación a la oscuridad puede ser el único síntoma durante años (20). Existe una forma temprana de retinosis pigmentaria que si esta presente al nacimiento o se presenta poco después de este, se le denomina amaurosis congénita de Leber (ACL).

El curso clínico de la RP es lento, crónico, progresivo y usualmente bilateral, pero resulta frecuentemente interrumpido por remisiones con mejoría de la agudeza y el campo visual. Los síntomas más comunes son nictalopía (ceguera nocturna), constricción del campo visual y disminución de la agudeza visual. El aspecto clínico de la retina es muy variado, siendo el mas fácil de reconocer la migración de pigmento en forma de espículas óseas, atenuación vascular, y palidez del nervio óptico (21).

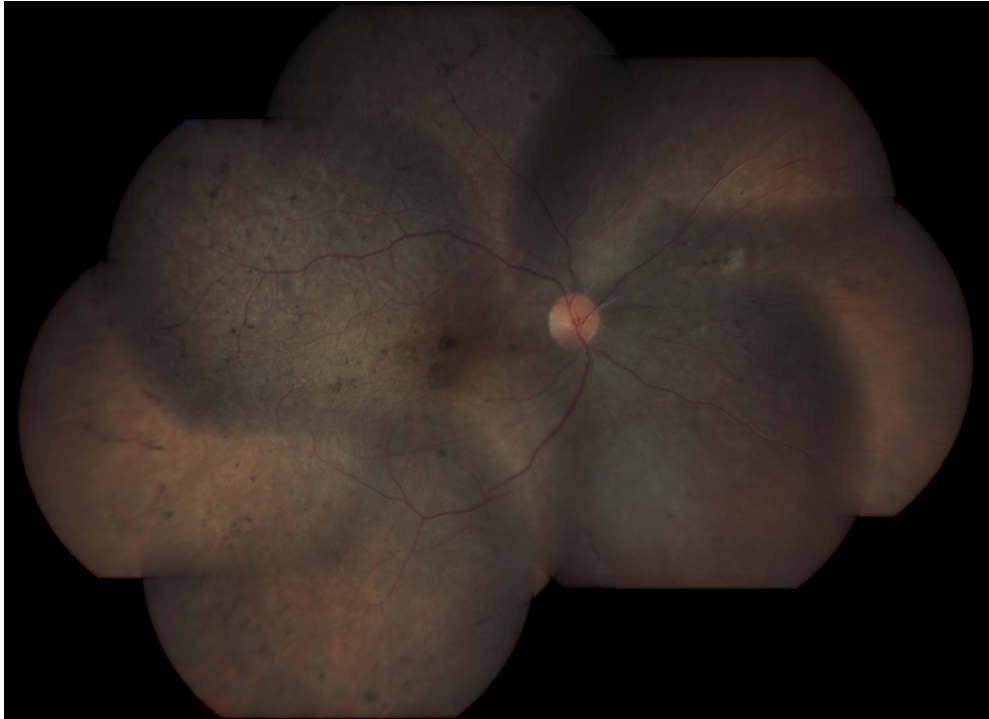


Figura 8: Reconstrucción fotográfica de una retina humana que muestra el aspecto clínico de la retinosis pigmentaria clásica.

Los pacientes presentan ceguera nocturna que se desarrolla durante las dos primeras décadas de vida; miopía frecuentemente superior a 2 dioptrías; agudeza visual igual o inferior a 20/200 antes de los 50 años (se observa aproximadamente en un 50% catarata subcapsular posterior y en el 75% lesión foveal); y el electroretinograma (ERG) no es detectable (abolido) en más de 2/3 de los pacientes (21).

Los estudios anatómo-patológicos coinciden en que el cambio esencial e inicial de la retina es la degeneración y desaparición de bastones y conos. En las áreas retinianas en las que los pacientes han perdido el campo visual, desaparecen totalmente los segmentos externos de los fotorreceptores y éstos son menos numerosos de lo normal. En la región de la retina donde los pacientes tienen mejor campo visual, los segmentos externos de los fotorreceptores aparecen desorganizados y más cortos que los normales. En casos avanzados, cuando los bastones han desaparecido completamente, pueden quedar

algunos conos, sobre todo en la región entre la mácula y la papila. El tejido degenerado, particularmente el neuroepitelio, es reemplazado casi por completo por neuroglia (20).

Los cambios en el epitelio pigmentado de la retina (EPR) son siempre marcados y ocurren como un fenómeno secundario. Estas alteraciones son degenerativas y proliferativas y se han interpretado como una posible reacción al deterioro de los fotorreceptores, ya que el EPR parece morfológicamente normal en aquellas zonas de la retina en las que el deterioro de los fotorreceptores se encuentra todavía en fases iniciales (25).

Una característica llamativa de la RP es la migración de pigmento hacia capas internas de la retina cuando la membrana limitante externa ha desaparecido. En ese caso, es posible que el pigmento se extienda hasta la membrana limitante interna, la cual puede estar ocupada por células que semejan a las endoteliales. Esta migración se produce bien sea como gránulos o, más frecuentemente, de forma intracelular (células típicas del epitelio pigmentado o células similares a macrófagos con alto contenido en melanina), formando grandes masas y grupos, particularmente alrededor de las venas retinianas. Menos frecuente es el crecimiento del EPR en forma de pliegues proliferativos que se extienden hacia las capas internas de la retina (21).

El hallazgo clínico de la palidez de la papila óptica desde etapas relativamente tempranas, se debe a que en el disco hay un incremento de la neuroglia que probablemente es una extensión de la gliosis retiniana y no por atrofia temprana. Durante mucho tiempo, incluso años, en un ojo ya ciego, las células ganglionares y la capa de fibras nerviosas pueden permanecer relativamente inalteradas, por lo que sólo aparece atrofia del nervio óptico en casos avanzados. Se pueden apreciar en ocasiones excrecencias del nervio óptico, que en los estudios histopatológicos se demuestra que estas son generalmente drusas y no hamatomas (25).

Los vasos retinianos, arteriolas y venas, siempre muestran cambios marcados. Estos cambios unas veces son atróficos y otras hiperplásicos. Con frecuencia se observa el

engrosamiento de sus paredes ya sea debido a un incremento de la adventicia o de la íntima, resultando una disminución progresiva de su calibre. Especialmente en la periferia, los vasos retinianos pueden convertirse en un cordón sólido de tejido conectivo hialino (20).

Los vasos coroideos, en los estadios iniciales de la enfermedad, aparecen histológicamente normales. En un estadio tardío, sus paredes sufren una degeneración hialina y ocasionalmente esclerosis extrema con desaparición relativamente marcada de la coriocapilaris. La isquemia relativa de la coroides se asocia con pérdidas visuales y degeneración celular del EPR. Hay casos avanzados descritos sin afectación de coroides. La membrana de Bruch siempre permanece intacta (20).

C.- Diagnóstico Clínico

El diagnóstico de RP, se establece cuando se presenta:

1. Afectación bilateral.
2. Pérdida de visión periférica.
3. Inadecuado funcionamiento de los bastones, puesto en evidencia por umbrales finales de los mismos anormalmente elevados tras la adaptación a la oscuridad y/o respuestas en el electroretinograma (ERG) de amplitud reducida y con tiempos implícitos patológicamente alargados o no detectables. Se estableció que las alteraciones del fondo de ojo no tienen necesariamente que estar presentes para diagnosticar la RP. El diagnóstico temprano de la RP se basa en una historia clínica completa, en la perimetría manual de isópteras externas (campo visual de Goldman) y la electrorretinografía de conos y bastones (21).

D.- Tratamiento

A pesar del hecho que se están investigando abordajes de tratamiento para la RP técnicamente diversos, hasta la fecha no existe un tratamiento estandarizado y eficiente

para esta enfermedad. El descubrimiento de las bases moleculares de la enfermedad ha llevado al desarrollo de varios ensayos de tratamiento en modelos animales y más recientemente en humanos, con resultados prometedores. Las líneas de investigación más avanzadas para el tratamiento de la RP incluye: el uso de factores neurotróficos (26); terapia génica (27, 28, 29); trasplante de retina (30, 31) y prótesis electrónicas (32, 33).

3.- Genética de la Retinosis Pigmentaria

Con base en su patrón de herencia y prevalencia, la RP se puede dividir en tres principales grupos: autosómica dominante (30-40% de los casos), autosómica recesiva (50-60%) y ligada al X (5-15%). Debido a la prevalencia se considera que los pacientes sin parientes afectados son formas recesivas, aunque algunos pueden representar mutaciones *de novo* dominantes o ligadas al X en varones, casos de isodisomia uniparental, heterocigosidad compuesta, o hasta patrones de herencia no mendelianos como herencia digénica o herencia mitocondrial (21, 34, 35).

La mayoría de los casos de RP son causados por mutaciones en un solo gen (monogénicos). Mas de 65 genes asociados han sido identificados, de los cuales 49 corresponden a formas no sindrómicas de RP (Tabla 1) (19). La mayoría de los genes de RP causan solo una cantidad pequeña de los casos (Tabla 2), con la excepción del gen de rodopsina (RHO), USH2A y los genes RPGR los cuales juntos causan aproximadamente ~30% de todos los casos de RP (20, 21, 35, 36). Sin embargo todos estos 65 genes asociados a RP juntos, son responsables de solo el 60% de todos los casos de RP, mientras que en 40% de los pacientes el gen afectado permanece desconocido (35, 37).

La forma autosómica dominante es, desde un punto de vista clínico, la más leve y de evolución más lenta; generalmente se preserva la visión central y en el ERG puede detectarse un ritmo diurno anormal para los bastones. Dentro de este grupo genético hay, no obstante, un amplio espectro de fenotipos que van desde la enfermedad severa de

aparición temprana hasta formas limitadas, de tardía aparición y evolución lenta. Es, con todo, la forma con mejor pronóstico visual. La dificultad de adaptación a la oscuridad suele aparecer en la adolescencia y progresa con mayor rapidez en las formas autosómicas recesivas que en las autosómicas dominantes (21).

La RP se puede dividir en dos grupos: RP no-sindrómica en la cual la enfermedad está restringida a los ojos sin manifestaciones extra oculares y RP sindrómica en la cual los pacientes presentan enfermedades sistémicas asociadas, los cuales representan 20-30% de los casos (22, 37). Se han descrito de aproximadamente 77 entidades distintas de RP sindrómica. Por lo tanto, una vez que se ha diagnosticado a un paciente de RP, es importante determinar si se trata de una degeneración exclusivamente ocular o bien si forma parte de un trastorno sistémico ya que algunas formas de RP 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. El diagnóstico preciso es importante tanto para un tratamiento correcto como para dar un consejo genético adecuado. Las formas más comunes de RP sindrómica son: síndrome de Usher, el cual es caracterizado por RP y afectación auditiva neurosensorial, con o sin disfunción vestibular (38) y el síndrome de Bardet-Biedl, el cual es caracterizado por RP con obesidad, polidactilia, retraso mental, hipogonadismo y falla renal en algunos casos (39).

Tabla1: Genes conocidos en la actualidad (19)

Categoría de la enfermedad	Número de genes identificados	Genes Mapeados e Identificados
Síndrome de Bardet-Biedl, AR	15	ARL6, BBIP1, BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS9, BBS10, BBS12, CEP290, INPP5E, LZTFL1, MKKS, MKS1, SDCCAG8, TRIM32, TTC8
Amaurosis congénita de Leber, AD	1	CRX, IMPDH1, OTX2
Amaurosis congénita de Leber, AR	10	AIPL1, CABP4, CEP290, CRB1, CRX, DTHD1, GUCY2D, IQCB1, KCNJ13, LCA5, LRAT, NMNAT1, RD3, RDH12, RPE65, RPGRIP1, SPATA7, TULP1
Retinosis Pigmentaria, AD	18	BEST1, CA4, CRX, FSCN2, GUCA1B, IMPDH1, KLHL7, NR2E3, NRL, PRPF3, PRPF6, PRPF8, PRPF31, PRPH2, RDH12, RHO, ROM1, RP1, RP9, RPE65, SEMA4A, SNRNP200, TOPORS
Retinosis Pigmentaria, AR	29	ABCA4, ARL2BP, BEST1, C2orf71, C8orf37, CERKL, CLRN1, CNGA1, CNGB1, CRB1, DHDDS, EMC1, EYS, FAM161A, GPR125, IDH3B, IMPG2, KIAA1549, LRAT, MAK, MERTK, MVK, NEK2, NR2E3, NRL, PDE6A, PDE6B, PDE6G, PRCD, PROM1, RBP3, RGR, RHO, RLBP1, RP1, RPE65, SAG, SPATA7, TTC8, TULP1, USH2A, ZNF513
Retinosis Pigmentaria, Ligada al X	2	OFD1, RP2, RPGR
Enfermedades sistémicas/sindrómicas con retinopatía, AD	8	ABCC6, ATXN7, COL11A1, COL2A1, JAG1, KCNJ13, KIF11, MFN2, OPA3, PAX2, TREX1, VCAN
Enfermedades sistémicas/sindrómicas con retinopatía, AR	34	ABCC6, ABHD12, ACBD5, ADAMTS18, AHI1, ALMS1, CC2D2A, CEP164, CEP290, CLN3, COL9A1, FLVCR1, GNPTG, HARS, IFT140, INPP5E, INVS, IQCB1, LRP5, MKS1, MTTP, NPHP1, NPHP3, NPHP4, OPA3, PANK2, PEX1, PEX7, PHYH, PXMP3, RPGRIP1L, SDCCAG8, TMEM237, TTPA, WDPCP, WDR19, WFS1, ZNF423
Enfermedades sistémicas/sindrómicas con retinopatía, Ligada al X	2	OFD1, TIMM8A
Síndrome de Usher, AR	12	ABHD12, CDH23, CIB2, CLRN1, DFNB31, GPR98, HARS, MYO7A, PCDH15, USH1C, USH1G, USH2A

Datos obtenidos de RETNET.

Tabla 2: Genes más comunes para los distintos tipos de RP (19, 40).

Gen/símbolo	Localización	Proteína	Enfermedades relacionadas	Mutaciones
RHO	3q22.1	Rhodopsin	AD-RP, AR-RP	161
RP2	Xp11.23	Retinitis pigmentosa 2 (X-linked)	RP-X	76
RPGR	Xp11.4	Retinitis pigmentosa GTPase regulator	RP-X	151
USH2A	1q41	Usherin	AR-RP, Síndrome de Usher AR	392
BBS1	11q13	BBS1 protein	BBS	65
BBS10	12q21.2	BBS10 (C12orf58) chaperonin	BBS	76
GPR98 (VLGR1)	5q14.3	Monogenic audiogenic seizure susceptibility homolog 1	Síndrome de Usher	54
PRPH2	6p21.1	Peripherin 2	AD-RP, Distrofia macular dominante.	123
CRB1	1q31.3	Crumbs homolog 1	AR-RP, ACL	183
RPE65	1p31.2	Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein	AR-RP, AD-RP, ACL	134
CEP290	12q21.32	Centrosomal protein 290 kDa	BBS, ACL	157

AR-RP: Retinosis Pigmentaria Autosómica Recesiva, AD-RP: Retinosis Pigmentaria Autosómica Dominante, RP-X: Retinosis Pigmentaria Ligada al X, ACL: Amaurosis congénita de Leber, BBS: síndrome de Bardet-Biedl. **Datos obtenidos de RETNET y HUMAN GENE MUTATION DATABASE**

4.- Métodos de Diagnóstico Molecular de Retinosis Pigmentaria

Debido a la gran heterogeneidad genética y mutacional de las distrofias retinianas, y aunado a que los síntomas y características clínicas de las distintas enfermedades retinianas pueden solaparse y que además puede existir una gran variación de las expresiones clínicas aun entre individuos que comparten la misma mutación, el diagnóstico exacto puede ser difícil (41). Los estudios moleculares permiten realizar diagnósticos más acertados, y con esto informar a los pacientes con mayor precisión del curso probable de su enfermedad (42). El realizar estudios de identificación de mutaciones ayuda también a establecer sistemas de correlación genotipo-fenotipo, así como identificar y comprender nuevas vías del funcionamiento retiniano. También estos estudios son útiles para la identificación de nuevos genes, así como establecer diagnósticos prenatales y guiar terapias, como la terapia génica (42). A continuación se presentan los métodos actuales de genotipificación.

El método de secuenciación de Sanger ha revolucionado la biología molecular (43), siendo la tecnología de base o estándar de oro para la secuenciación de DNA por casi tres décadas. Este método es considerado como la tecnología de primera generación, denominándose a las tecnologías posteriores a esta, como tecnologías de siguiente generación (44).

Las lecturas de secuenciación de Sanger pueden alcanzar hasta 800 a 1000 pares de bases, con una exactitud cercana al 100%. Esta exactitud es más alta que las logradas con las tecnologías de siguiente generación, pero a un costo mucho mayor por cada kilobase secuenciada, haciendo esta tecnología particularmente ineficiente para la generación de bases de datos de genomas completos (44).

Actualmente, la mayor aplicación para el método de Sanger, es la secuenciación directa de productos previamente seleccionados y amplificados por reacción en cadena de polimerasa (PCR) (45), permitiendo el análisis de genes y exones a nivel de nucleótidos, para encontrar mutaciones causantes de enfermedades.

Algunas plataformas de tecnologías de secuenciación de siguiente generación (TSNG) como la de Illumina, combina el uso de amplificaciones clonales y secuenciaciones masivas. Puede identificar decenas de billones de pares de bases por semana en una sola corrida, produciendo datos de secuenciación de alta calidad a un buen nivel de costo-efectividad (46). Cuando se compara el costo de secuenciar una giga base (1000,000,000 de pares de bases), la tecnología de Illumina cuesta 1%, de lo que costaría con el método se Sanger (46). Esta ha facilitado la secuenciación de genomas complejos y la caracterización comprensiva de un amplio rango de variantes estructurales. La plataforma de Illumina es una de las más ampliamente adoptadas tecnologías de secuenciación de siguiente generación y aplicaciones recientes de esta tecnología incluyen el diagnóstico de RP (34, 47). El problema para adquirir una plataforma de TSNG radica en que estos equipos son cientos de miles de dólares más caros que los equipos de secuenciación de Sanger y no siempre se requiere secuenciar grandes fragmentos de DNA, lo cual sigue siendo caro aun con estas tecnologías. Este tipo de tecnologías han mostrado su eficacia en la detección de mutaciones y de nuevos genes causantes de retinosis pigmentaria (48, 49, 50, 51).

Existen también tecnologías de microarreglos, también llamados chips de DNA, los cuales realizan un tamizaje rápido y eficaz utilizándose en el diagnóstico de varias patologías (52). Esta tecnología que originalmente se diseñó para detectar variaciones genómicas en el número de copias y para genotipificación por polimorfismos de base única (SNPs), permite un análisis de todo el genoma en muestras de pacientes, utilizando un formato basado en un chip. Las aplicaciones actuales para las tecnologías de microarreglos incluyen estudios de perfil expresión de genes, detección de sitios de splicing alternativos, exámenes de pérdida de heterocigosidad, disomia uniparental o identificación de metilación de DNA (53, 54, 55).

Los microarreglos son dispositivos miniatura hechos de vidrio de silicón (~1 cm²) compuestos por millones de pozos en una escala de micrómetros, que contienen cientos de miles de pequeñas copias de una cadena única de oligonucleótidos de DNA, cada sonda

se encuentra inmovilizada en una diferente posición estratégica en el arreglo. Las sondas se aprovechan de la atracción química natural entre las cadenas de DNA para hibridizarse o selectivamente unirse únicamente a aquellas moléculas de DNA con una correspondencia perfecta. Es por eso que dichos microarreglos puede usarse para identificar la presencia de un alelo en particular en el contexto del genoma entero de un solo individuo (56).

Con base en el tipo de estudio, los microarreglos de DNA se pueden dividir en dos principales grupos: aquellos utilizados para diagnóstico molecular de patologías genéticas específicas (56) y otro grupo de microarreglos capaces de analizar millones de SNPs, comúnmente utilizados para estudios de asociación de genoma completo (GWAS) o en el mapeo genético por homocigosidad (57, 58).

Los microarreglos orientados al diagnóstico molecular, pueden genotipificar cientos de miles de variaciones genéticas en paralelo, incluyendo sustituciones, deleciones e inserciones de base única (59). Una de las limitantes de este tipo de microarreglos es que solo pueden detectar mutaciones conocidas, e incluidas dentro del microarreglo utilizado, imposibilitando la detección de mutaciones no detectadas previamente, también denominadas mutaciones nuevas.

Dentro de los microarreglos tipo APEX (Arrayed Primer Extension), existen algunos comercialmente disponibles para el diagnóstico de retinosis pigmentaria. De las variantes de retinosis pigmentaria no sindromática que pueden diagnosticarse con esta marca de microarreglos, incluyen RP autosómica dominante (cubriendo 414 variantes en 16 genes), RP autosómica recesiva (594 variantes en 19 genes) y RP ligada al X (184 mutaciones en dos genes). También se pueden identificar RP sindromáticas como síndrome de Bardet-Biedl (mas de 300 variantes en 13 genes) y síndrome de Usher (612 mutaciones en 9 genes) (60).

Los estudios de análisis de ligamiento, utilizan la correlación entre la presencia de enfermedades con marcadores genéticos para localizar/ligar el gen con la mutación causal

de la enfermedad a una región genómica en particular. Los análisis de ligamiento genético son mayormente útiles para identificar mutaciones raras con grandes repercusiones en el fenotipo de un individuo enfermo y en especial aquellas con herencia mendeliana. Existen varios tipos estudios de análisis de ligamiento. Estos pueden ser a cromosomas o a genomas completos, algunos simples como el mapeo cromosómico (por ejemplo las enfermedades ligadas al sexo) y otras más complejas como los análisis de ligamiento por microsatélites o aquellas que utilizan microarreglos de polimorfismos de base única (SNP's) para el análisis de ligamiento por homocigosidad, también llamado mapeo por homocigosidad (61).

Los microarreglos de SNP's en genoma completo utilizan el principio bioquímico de apareamiento de bases. Una vez que la secuencia de DNA ha sido aislada, amplificada, fragmentada y marcada con fluorescencia, esta es aplicada al chip, el cual va hibridar solamente con aquellos fragmentos que son perfectamente complementarios a los encontrados dentro de microarreglo. El chip es escaneado y la intensidad de las señales fluorescentes es medida para cuantificar la cantidad relativa de la muestra que se hibridó a cada pozo. La posición de las señales de fluorescencia dentro del microarreglo van a identificar qué alelos están presentes en esa muestra particular de genoma completo. Los microarreglos que utilizan SNP's pueden utilizarse dependiendo del tipo de análisis que se les dé a estas muestras, ya sea para estudios de asociación de genoma completo (GWAS) o para el análisis de ligamiento por homocigosidad (62).

El análisis de homocigosidad es especialmente útil para mapear mutaciones recesivas homocigotas en familias consanguíneas (63), por lo cual ha sido utilizado en repetidas ocasiones para facilitar la detección de mutaciones en las distrofias retinianas (64, 65, 66, 67). Con el estudio de mapeo por homocigosidad es posible identificar grandes porciones homocigotas dentro del genoma completo de un individuo (65). Al detectar grandes porciones homocigotas en los miembros de una familia afectados de una distrofia retiniana, es posible analizar dichos fragmentos homocigotos dentro la muestra, con la ayuda de bases de datos y programas disponibles en busca de genes candidatos de

distrofias retinianas dentro de estos grandes fragmentos homocigotos, y así aumentar la posibilidad detectar mutaciones conocidas o nuevas, con el método de secuenciación de Sanger (63).

II.- Métodos:

1.- Planteamiento del Problema:

La retinosis pigmentaria es un grupo de enfermedades con una gran heterogeneidad genética y se han identificado a la fecha docenas de genes que pueden ocasionar estas alteraciones. Por esta razón, la identificación de mutaciones causantes de distrofias retinianas, particularmente la retinosis pigmentaria, representa un gran reto en términos de tiempo empleado y costos económicos por lo que es necesario establecer estrategias que permitan un análisis molecular más eficiente en estos pacientes. Uno de estos abordajes desarrollado recientemente es el análisis de casos autosómicos recesivos mediante la caracterización de regiones homocigotas en el genoma de los afectados y la subsecuente identificación mutaciones en alguno de los genes candidatos localizados dentro de esas regiones.

2.- Pregunta de Investigación:

¿Cual es la frecuencia de identificación de mutaciones causales en una muestra de casos de retinosis pigmentaria autosómica recesiva, mediante el abordaje de análisis de ligamiento genético a regiones homocigotas en genoma completo seguido de secuenciación de genes candidatos?

3.- Justificación:

La retinosis pigmentaria (RP) es la distrofia retiniana mas común, con una prevalencia mundial de 1 en cada 3500-5000 individuos. Esta enfermedad tiene gran heterogeneidad genética y siendo el patrón de herencia autosómica recesiva el de presentación más frecuente. En México se desconoce el espectro de mutaciones causales de retinosis pigmentaria autosómica recesiva.

Este estudio está enfocado a la identificación y conocimiento del espectro mutacional en una muestra poblacional Mexicana, del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana, así como a evaluar la eficacia de un método poco utilizado para el diagnóstico molecular en México y Latinoamérica, que es el mapeo por homocigosidad con microarreglos. Este tipo de abordaje ha sido utilizado anteriormente para el estudio molecular de RP, en una sola ocasión en México por Zenteno et al (66), mostrando su utilidad para poder identificar una mutación causal en el gen CRB1, en una familia Mexicana con retinosis pigmentaria y nanofthalmos de herencia autosómica recesiva.

El abordaje de secuenciación directa de genes candidatos es laborioso y caro, más aun si se considera la gran cantidad de genes que pueden causar retinosis pigmentaria autosómica recesiva. El método de análisis de homocigosidad por SNP's utilizado en este estudio, nos ayuda a acotar el numero de genes candidatos causantes de RP a estudiar por secuenciación directa, al identificar grandes porciones homocigotas en el genoma de los individuos afectados, donde existe alta probabilidad que se encuentre el gen causal con la mutación recesiva homocigota.

4.- Objetivo General:

Identificar la causa genética de casos de retinosis pigmentaria autosómica recesiva, utilizando un abordaje de mapeo de homocigosidad a genoma completo.

5.- Objetivos Particulares:

Identificar ligamiento genético a regiones genómicas homocigotas en DNA de pacientes con retinosis pigmentaria autosómica recesiva, utilizando microarreglos de DNA.

Identificar genes candidatos de retinosis pigmentaria dentro de tales regiones de homocigosidad.

Demostrar mutaciones causales de retinosis pigmentaria autosómica recesiva en los genes candidatos.

6.- Diseño del Estudio:

- Transversal descriptivo.

7.- Criterios de Inclusión:

- Sujetos de cualquier edad con diagnóstico clínico, electrofisiológico y fluorangiográfico de retinosis pigmentaria.
- Patrón de herencia autosómico recesivo sugerido por árbol genealógico.
- Con al menos un hermano (a) afectado (a) y padres sanos consanguíneos o no y/o casos aislados donde los padres sean sanos y consanguíneos.
- Que acepten realizarse el estudio genético molecular y firmen la hoja de consentimiento informado

8.- Criterios de Exclusión:

- Individuos con retinosis pigmentaria autosómica dominante, o ligada al X.
- Sujetos afectados por una distrofia retiniana distinta a retinosis pigmentaria.

9.- Criterios de Eliminación:

- Sujetos en cuyas familias se identifique otro familiar afectado en el transcurso del estudio y que sugiera un patrón genealógico distinto al autosómico recesivo.

- Muestras en las que después del análisis de homocigosidad no se logre identificar regiones genómicas que contengan genes conocidos asociados a distrofias retinianas o genes implicados en función retiniana.
- Sujetos en los que la muestra de DNA no sea suficiente para el estudio y no accedan a una nueva muestra o no puedan ser localizados nuevamente.

10.- Tipo de Muestreo:

Muestra consecutiva en la cual se incluyó a los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión durante el periodo de estudio, que acudieron a la consulta del Instituto de Oftalmología "Conde de Valenciana."

11.- Tamaño de Muestra:

15 familias.

12.- Variables de Interés del Estudio:

REGIONES DE HOMOCIGOSIDAD.- Definición Conceptual: Segmentos en los genomas que son homocigotos como resultado de la herencia ancestral de segmentos genómicos idénticos a través de ambos padres.

REGIONES DE HOMOCIGOSIDAD.- Definición operacional: Al observar los microarreglos de SNP's de genoma completo (análisis de ligamiento por homocigosidad), se consideró una región homocigota adecuada a aquel bloque homocigoto mayor a una porción de 2.5 Mb y un índice de identificación (call rate) igual o mayor a 95% en el microarreglo.

Clasificación de la variable: Cualitativa.

Escala de la variable: Nominal.

GEN CANDIDATO.- Definición conceptual: Una secuencia de DNA en una región cromosómica, sospechosa de estar involucrada en una enfermedad particular de interés, de la cual su producto proteico sugiera que puede ser el gen alterado en cuestión.

GEN CANDIDATO.- Definición operacional: Se considero gen candidato a aquel o aquellos genes dentro de las regiones de homocigosidad encontradas, que esten relacionados con distrofias retinianas o aquellos genes implicados en la función retiniana o de vías funcionales similares.

Clasificación de la variable: Cualitativa

Escala de la variable: nominal

MUTACIONES.- Definición conceptual: El término mutación es utilizado en la genética médica en dos sentidos: algunas veces para indicar un cambio genético nuevo que no ha sido previamente conocido en una familia, y algunas veces para indicar un alelo mutante causante de enfermedad.

MUTACIONES.- Definición operacional: las mutaciones se determinarán con secuenciación nucleotídica directa del gen (Secuenciación automatizada de los productos de PCR por el método de Sanger) en los pacientes afectados de retinosis pigmentaria con patrón de herencia autosómica recesiva. Previamente se localizarón regiones de homocigosidad para determinar genes candidatos para ser secuenciados.

Clasificación de la variable: Cualitativa

Escala de la variable: nominal

Retinosis pigmentaria.- Definición conceptual:

Enfermedad genética, caracterizada por la pérdida progresiva de la función de los fotorreceptores, usualmente bilateral y simétrica.

Retinosis pigmentaria.- Definición Operacional:

Enfermedad retiniana que cumple las características clínicas y/o de gabinete, que demuestren afectación de la función de fotorreceptores con un patrón bastón-cono y se sospechese sea originada por una mutación monogenica especifica. Se incluyeron bajo esta definición, casos sindromaticos y no sindromaticos, al igual que cuadros clínicos de amaurosis congenita de leber.

Clasificación de la variable: Cualitativa

Escala de la variable: nominal

PATRÓN DE HERENCIA AUTOSÓMICA RECESIVA.- Definición conceptual:

Tipo de transmisión hereditaria caracterizada por afectación de individuos homocigotos para una mutación y que generalmente se manifiestan en una misma generación y con padres sanos, que son portadores o heterocigotos.

PATRÓN DE HERENCIA AUTOSÓMICA RECESIVA.- Definición conceptual:

Familias en las que existan dos o más hermanos afectados, con padres sanos y/o casos aislados producto de padres con consanguinidad.

Clasificación de la variable: Cualitativa

Escala de la variable: nominal

13.- Materiales y Métodos:

A.- Análisis Genealógico y Clínico:

Se incluyeron 15 familias con retinosis pigmentaria de transmisión autosómica recesiva sugerida por análisis genealógico y clínico. Se realizó una evaluación oftalmológica completa, incluyendo fundoscopia bajo dilatación medicamentosa realizada por un subespecialista retinólogo, en cada caso el diagnóstico clínico fue sustentado con estudios de electrofisiología y/o angiografía retiniana. La evaluación genealógica y caracterización del fenotipo sistémico fue efectuado por un medico genetista. Se realizó la caracterización clínica detallada de la alteración retiniana en cada afectado y se evaluarón a familiares de primer grado sanos para detectar formas leves de la enfermedad.

B.- Analisis Molecular:

Previo consentimiento informado, se extrajeron 2 ml de sangre por punción venosa en cada sujeto a partir de la cual se aisló el DNA genómico mediante el kit QUICKGENE DNA WHOLE BLOOD (DB-S, FujiFilm Co.) Se colocaron 30 ml de solución EDB (proteasa) en un microtubo eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente se agregaron 250 ml de sangre total (se recomienda el uso de sangre total colectada en EDTA-2Na o EDTA-2K) y 250 ml de solución LDB (buffer de lisis). Inmediatamente se mezcló el tubo 5 veces invirtiéndolo de arriba hacia abajo, se agitó con vórtex a máxima velocidad durante 15 segundos y se centrifugó durante unos segundos. La muestra se incubó a 56°C durante 2 minutos y posteriormente se agregaron 250 ml de etanol al 99%. Se repitió la agitación con vórtex durante 15 segundos y la muestra se centrifugó unos segundos.

Dentro de los siguientes 30 minutos se realizó el aislamiento de DNA. Se transfirió el lisado dentro del “cartucho” del sistema automático de aislamiento de ácidos nucleicos QuickGene-810 (se transfirió todo el contenido del microtubos en el cartucho) y se

procedió a la extracción automatizada. El DNA genómico obtenido se resuspendió en un volumen aproximado de 200 ml. Se almacenó la muestra a una temperatura de -20°C hasta su utilización.

1B.- Determinación de la Concentración y Pureza del DNA Obtenido:

Se determinó la concentración y pureza del DNA extraído por medio de un análisis de absorbancia de la muestra a 260/280 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro. La relación 260/280 permitió evaluar la pureza de la muestra, considerando que la lectura a 280 nm corresponde a la fracción proteica. Se considerarán adecuadas para análisis las relaciones entre 1.6 y 2. Además, se realizaron electroforesis en geles de agarosa de cada muestra de DNA obtenida para verificar que no existiera degradación de este ácido nucleico. La concentración de DNA obtenida se determinó por la lectura a 260 nm considerando obtener concentraciones promedio de 50 ng/ ml.

2B.- Identificación de Regiones de Homocigosidad en Genoma Completo:

La identificación de las regiones de homocigosidad genómicas en DNA de los afectados se realizó por medio de ensayos con microarreglos de DNA Affymetrix de 250 K Nsp y utilizando el kit de reactivos Genechip (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Brevemente, 250 ngs de DNA genómico fueron fragmentados con la enzima NspI (Affymetrix) y ligados a adaptadores específicos necesarios para efectuar una PCR de enriquecimiento de fragmentos de aproximadamente 400 pares de bases, utilizando la enzima AmpliTaq Platinum (Clontech Laboratories, CA, USA) y un oligonucleótido específico complementario a los adaptadores ligados. Posteriormente, los productos fueron purificados y sometidos a una nueva fragmentación para generar productos menores a 80 pares de bases que fueron marcados e hibridizados al microarreglo en un horno de hibridación. Después, el microarreglo fue lavado en una estación de fluidos GeneChip 450 (Affymetrix) y posteriormente analizado en un escáner de microarreglos 3000 7G para generar el archivo con los genotipos de 262,264 polimorfismos de base

única (SNPs) distribuidos en todo el genoma. Se analizaron solamente las muestras que tuvieron un índice de identificación (call rate) igual o mayor a 95%. La identificación de regiones en las que los SNPs fueron homocigotos en DNA de los afectados de cada familia se realizó con el programa HomozygosityMapper (www.homozygositymapper.org) que permite la comparación simultánea de los 260,000 SNPs e identifica regiones cromosómicas homocigotas de 2.5 Mb o mayores (Seelow et al. 2009). Una vez identificadas las regiones homocigotas, se realizó un análisis manual para reconocer si algún gen asociado a retinosis pigmentaria autosómica recesiva se localiza dentro de una de las regiones de homocigosidad reconocidas. Se dio prioridad a las regiones homocigotas de mayor extensión. De manera alternativa, se utilizó el programa computacional GeneDistiller (www.genedistiller.org) para identificar genes candidatos dentro de las regiones de homocigosidad que sean expresados en retina o se hayan asociado previamente a un fenotipo ocular (Seelow et al. 2008). Una vez identificados el o los genes candidatos, se procedió al análisis de esos genes por PCR y secuenciación nucleotídica para identificar las posibles mutaciones responsables del fenotipo.

3B.- Amplificación por PCR:

Se realizó el análisis molecular (amplificación por PCR y secuenciación nucleotídica automatizada) del gen o los genes candidatos dentro de las regiones de homocigosidad identificadas. Se efectuó la amplificación por PCR de cada uno de los exones y de las uniones exón/intrón de estos genes, a partir del DNA de los sujetos afectados y de sus familiares con la enfermedad, utilizando pares de oligonucleótidos derivados de la secuencia normal de cada exón. En los casos en los cuales existieron varios genes candidatos y/o estos genes fueron demasiado amplios para ser estudiados en su totalidad, se realizó una selección de aquellos exones de estos genes, que fueran más probables de alojar la mutación causal basados en una revisión de la literatura médica.

Cada reacción de amplificación de PCR tuvo un volumen final de 15 ml que contenía 7.5 ml de HotStarTaq DNA polimerasa (compuesta por 10xPCR buffer que

contiene 25mM MgCl₂, 10mM de cada dNTP y 2.5 unidades de HotStarTaq DNA polimerasa), de 50-100 ngs de DNA genómico (volumen variable), 1mM del oligonucleótido correspondiente (sentido y antisentido) y agua bidestilada. Se utilizó un programa de temperaturas que incluye 1 ciclo de 15 min a 95°C para la desnaturalización inicial, 35 ciclos con 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de alineamiento a temperaturas específicas para cada par de oligonucleótidos para amplificar los exones de los genes candidatos de interés y 1 min a 72°C para la extensión. Por último, se realizó 1 ciclo a 72°C por 10 min para la extensión final.

Los productos obtenidos de la amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con tinción de bromuro de etidio para identificar las bandas específicas con el producto amplificado, utilizando como referencia un marcador estándar de peso molecular de 100 pb. Se reconocieron las bandas de interés y se escindaron del gel para la purificación del producto de DNA amplificado utilizando el método de purificación por columna (Qiagen).

La concentración del DNA amplificado obtenido de la purificación se determinó por medio de la comparación de la intensidad de las bandas obtenidas con respecto a un marcador de masa estándar (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen) en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio.

4B.- Secuenciación Automatizada de los Productos de PCR:

Se realizaron nuevas reacciones de PCR para la secuenciación nucleotídica de cada uno de los amplicones de los genes candidatos identificados por el análisis de homocigosidad, incluyendo las uniones exón/intrón. Cada reacción de 10 ml incluyó 2 ml de BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) que contiene los cuatro dideoxinucleótidos trifosfatados (ddNTPs) marcados por fluorescencia, deoxionucleótidos trifosfatados (dNTPs) no marcados, Tris-HCl (Ph 9.0), MgCl₂ y la enzima ampliTaQ polimerasa; se agregó además 1 ml del oligonucleótido correspondiente a una

concentración de 10 mM, 10-20 ngs del DNA de cada producto de PCR como templado y agua bidestilada para un volumen final de 10 ml. Para esta reacción de PCR se utilizó un programa de 25 ciclos que incluyen 30 segundos a 97°C para la desnaturalización, 15 seg a 50°C para el alineamiento y 4 min a 60°C para la extensión.

Los productos de esta segunda amplificación de PCR se purificarán por medio de columnas Centri-Sep (Applied Biosystems) para eliminar el exceso de oligonucleótido y de ddNTPs fluorescentes. Cada muestra se resuspendió en 20 ml de formamida y posteriormente se desnaturalizó a 95°C por 5 min. Los productos se analizarán por electroforesis capilar en un secuenciador automático Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) y las secuencias de DNA obtenidas en sujetos enfermos se compararán con las secuencias silvestres de los genes de interés para identificar posibles mutaciones.

Al identificarse una mutación potencial no descrita previamente en la literatura, se descartó que ésta correspondiera a un polimorfismo benigno mediante el análisis de al menos DNA de al menos 150 sujetos (300 alelos) sin la enfermedad procedentes del Banco de DNA de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”.

5B.- Análisis de Predicción Funcional de Mutaciones:

Las mutación nueva identificada fue analizada mediante los programas de computación Polyphen (**polymorphism phenotyping**, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) (Ramensky, 2002; Sunyaev, 2000) y PANTHER (**Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships**, <http://www.pantherdb.org>) (Thomas, 2003) para estimar la posibilidad de que la mutación altere la función de la proteína y por lo tanto sea causante de la enfermedad. Para fines similares, la conservación entre especies de los residuos proteicos afectados por las mutaciones fue determinada mediante el programa computacional ClustalW (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/) (Lassmann, 2002; Larkin, 2007).

C.- Análisis Estadístico:

La eficiencia del abordaje de análisis se estableció determinando el porcentaje de casos en los que fue posible identificar la mutación causal. Se utilizó estadística descriptiva para el reporte de la frecuencia y tipo de mutaciones identificadas en el grupo de enfermos.

D.- Consideraciones Éticas:

Este estudio fue aprobado para su realización por los comités de Investigación y Ética del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana con número de registro CC-030-2011. Se realizó, registró y reportó en cumplimiento de los principios de las buenas prácticas clínicas (BPC). El consentimiento informado y su proceso cumplió con leyes y regulaciones aplicables en México, D.F. Los pacientes otorgaron su consentimiento para los estudios de DNA mediante la firma de una Carta de Información y Consentimiento, la cual cumple con lo establecido por la Ley General de Salud en sus Capítulos 21 y 22.

De acuerdo a la ley general de salud en su título segundo capítulo 17 apartado segundo, nuestro estudio se consideró una investigación con riesgo mínimo. Cumple con los criterios de la Declaración de Helsinki para investigación en humanos (WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.

<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>

III.- Resultados

1.- Cuadro Clínico y resultado de mapeo por homocigosidad:

Se estudiaron 15 familias mexicanas, provenientes del centro y sur del país, con diagnóstico clínico de retinosis pigmentaria ya sea sindrómica o no sindrómica, y las cuales segregaban la enfermedad con un patrón de herencia autosómica recesiva. De las 15 familias, 8 familias presentaban miembros afectados con cuadro clínico de retinosis pigmentaria clásica, 2 con afectados con diagnóstico de retinosis pigmentaria de inicio temprano, 1 familia con retinitis punctata albescens, 3 familias con amaurosis congénita de Leber, y una familia con síndrome de Bardet-Biedl. A continuación se describen con mayor detalle los datos de las familias estudiadas, incluyendo el cuadro clínico y el resultado del mapeo por homocigosidad.

Familia 1 (RPAR 2666):

Tabla 1A – Datos Clínicos Familia 1 (RPAR 2666):

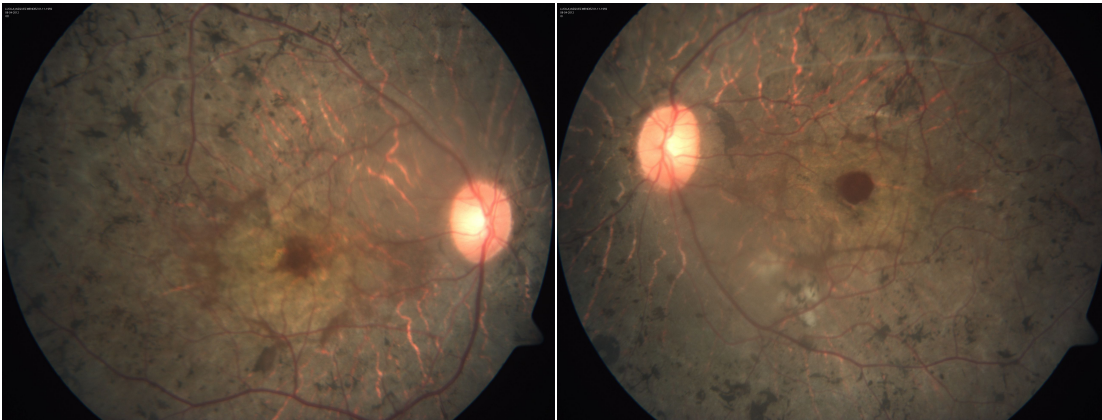
Número total de Hermanos	Numero de hermanos Afectados	Procedencia	Edad y Sexo	Diagnóstico	Manifestaciones sistémicas	Consanguinidad por árbol genealógico
9	2	Chignahuapan Puebla	52/Fem.	Retinosis pigmentaria clásica.	No	No
		Chignahuapan Puebla	48/Fem.	Retinosis pigmentaria clásica.	No	No

Caso Índice Familia 1:

Femenino de 52 años de edad, quien presento disminución de la agudeza visual y nictalopía desde la edad de 33 años. Producto de padres sin consanguinidad conocida, ambos procedentes de Chignahuapan, estado de Puebla. Son 10 hermanos, de los cuales solo una hermana presenta mismo cuadro clínico de distrofia retiniana.

A la exploración física presenta una capacidad visual de movimientos de manos en ojo derecho y cuenta dedos a 30 centímetros en ojo izquierdo. Su refracción es de $-1.00 = -2.00 \times 65$ en ojo derecho y de $-2.00 = -1.25 \times 180$ en ojo izquierdo. Presenta una catarata subcapsular posterior 2 y nuclear 1 en ambos ojos. A la fundoscopia (ver fotos clínicas) presenta sinéresis vítreo con pigmento en vítreo anterior, un nervio óptico de características normales, disminución del calibre vascular, espículas óseas, y dispersión de pigmento en la totalidad de la retina, con visualización de los grandes vasos coroideos, en ambos ojos.

El electroretinograma salió totalmente abolido en todas sus fases, clasificándose como cuadro clínico de retinosis pigmentaria clásica.

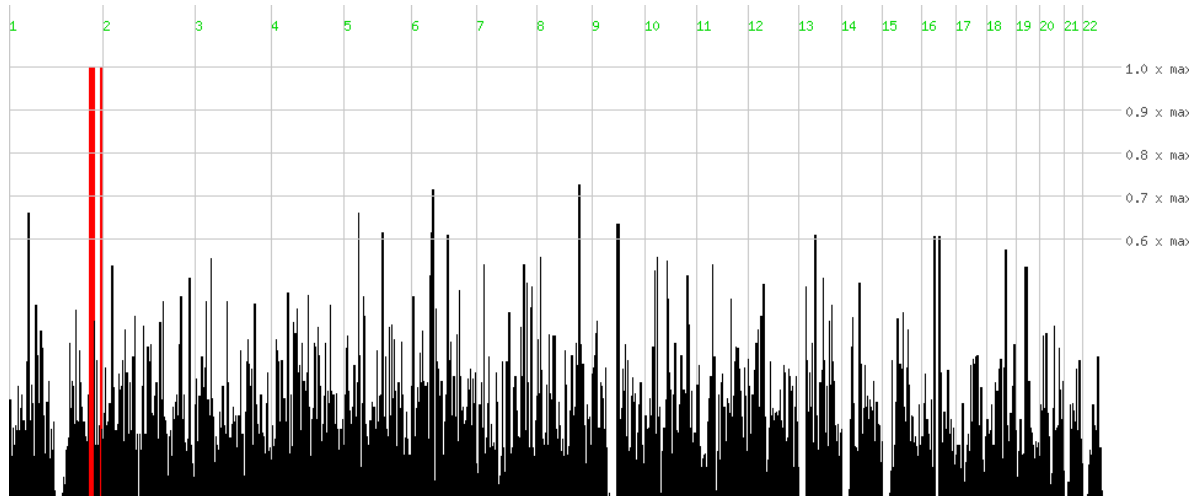


A

B

Fotos Clínicas 1 - Caso Índice familia 1: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 1:



Grafica 1 – Familia 1: Región homocigota del cromosoma 1: Aquí se encuentra USH2A, gen relacionado con distrofias retinianas.

Tabla 1B - Familia 1: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad:

Cromosoma	Score	Intervalo Genómico	Número de genes en la región	Genes relacionados con fenotipo ocular	Genes Candidatos (relacionados a distrofias retinianas o a función retiniana)
1q	250	de (bp) 213418058 – a (bp) 219924793. del SNP rs9308430 al SNP 7512205	29	PROX1, PTPN14, USH2A, TGFB2	USH2A
1q	250	De (bp) 220582320 – a (bp) 224729933 Del SNP rs975639 al	47	DISP1, TP53BP2	-

		SNP rs712086			
1q	250	De (bp) 241585802 – a (bp) 244790426 Del SNP rs1539099 al SNP rs2813907	37	-	-

Gen Candidato:

USH2A (215796236-216596738, 1q41): que codifica para una proteína de 1551 aminoácidos (usherina) que se expresa en la cóclea humana fetal, ojo, cerebro y riñón, con una masa molecular estimada de 171.5kd.

El análisis de Northern blot identifica a 3 transcritos de mRNA de 6.5, 5.- y 1.9 kb en la retina. Puede causar síndrome de Usher y retinosis pigmentaria no sindrómica, ambas con patrón de herencia autosómica recesiva.

Familia 2 (RPAR 464)

Tabla 2A– Datos Clínicos Familia 2 (RPAR 464)

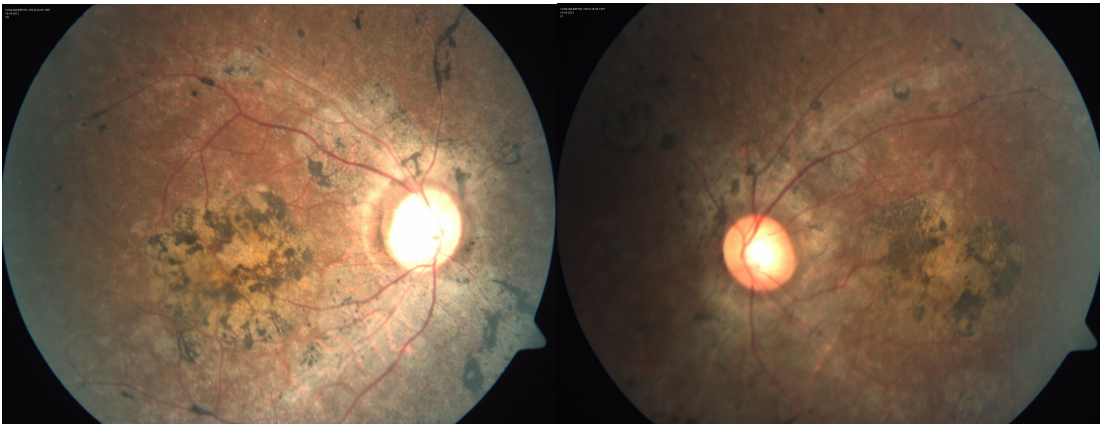
Número total de Hermanos	Numero de hermanos Afectados	Procedencia	Edad y Sexo	Diagnóstico	Manifestaciones sistémicas	Consanguinidad por árbol genealógico
9	3	Ixmiquilpan, Hidalgo	54/ Fem.	Retinosis pigmentaria clásica	No	Dudosa/ambos padres con mismo apellido y de un pueblo pequeño.
			57/ Fem.	Retinosis pigmentaria clásica	No	
			39/Fem	Retinosis pigmentaria clásica	No.	

Caso Índice Familia 2

Femenino de 54 años de edad quien refiere disminución de la agudeza visual desde la edad de 40 años, sin notar fotofobia ni nictalopía. Son 7 hermanos de unión sin poder documentar vinculo de consanguinidad, pero ambos padres son de un pueblo pequeño, Ixmiquilpan, estado de Hidalgo, y comparte el apellido Cruz, el cual es muy común en su comunidad. Tiene dos hermanas con mismo cuadro clínico, solo una de ellas presento como síntoma inicial nictalopía.

A la exploración oftalmológica se encontró una refracción del ojo derecho de +2.25=-1.50 x 0 y en ojo izquierdo +2.00=-1.00 x 0, con capacidad visual del ojo derecho de cuenta dedos a 30 centímetros y en ojo izquierdo movimiento de manos. A la fundoscopia se puede observar, palidez de papila una cruz, con atenuación del calibre vascular, en retina acúmulos de pigmento (clusters), uno muy importante den la región macular, con espículas óseas en la totalidad de retina, con dispersión de pigmento, principalmente siguiendo las arcadas vasculares.

El electroretinograma se encuentra totalmente abolido para ambos sistemas. En las tres afectadas de esta familia se diagnóstico un cuadro de retinosis pigmentaria clásica.

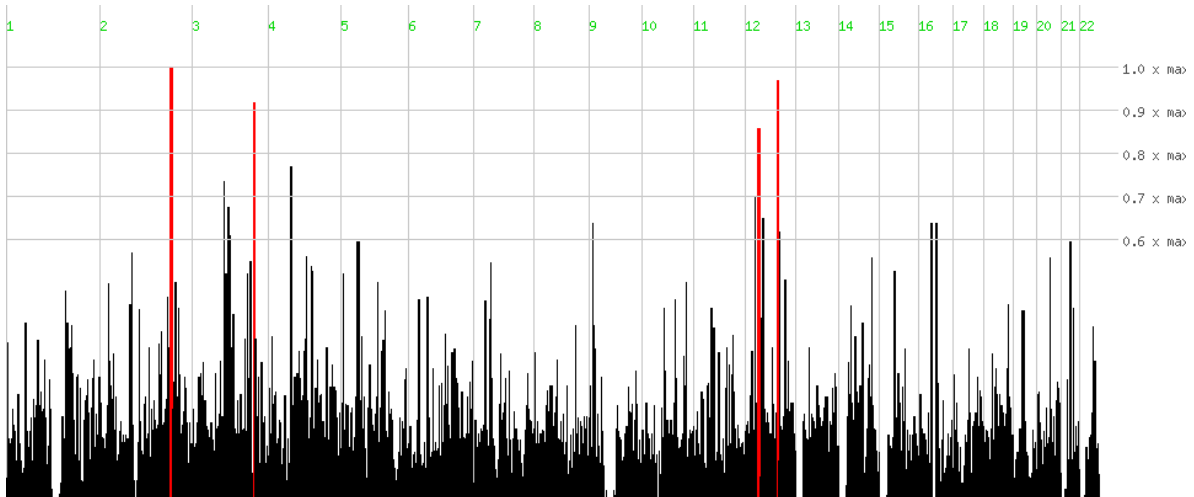


A

B

Fotos Clínicas 2 - Caso Índice familia 2: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 2



Grafica 2 - Familia 2: Región homocigota del Cromosoma 12: En el segundo pico esta CEP290 el cual es un gen que causa distrofias retinianas.

Tabla 2B - Familia 2: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Cromosoma	Score	Intervalo Genómico	Número de genes en la región	Genes relacionados con fenotipo ocular	Genes Candidatos (relacionados a distrofias retinianas o a función retiniana)
2q	250	De (bp) 185970242 – a (bp) 191469083 Del SNP rs1483253 al SNP rs2159822	46	COL5A2 y SLC40A1	-
3q	242	De (bp) 162238020 – a (bp) 164771890 Del SNP rs2061739 al SNP rs12186083	7	-	-
12p	214	De (bp) 33207116 – a (bp) 39117043 Del SNP rs11052414 al SNP rs7297083	14	-	-

12q	203	De (bp) 39120155 al (bp) 41168249. Del SNP rs866120 al SNP rs17128779.	15	-	-
12q	242	De (bp) 86350930 – al (bp) 89255080. Del SNP rs11117131 al SNP rs17016116.	12	CEP290 y KITLG	CEP290

Gen Candidato:

CEP290 (88442790 – 88535993, 12q21.32): Codifica una proteína centrosomal involucrada en el ensamblaje y tráfico ciliar de 1539 aminoácidos, con una masa molecular calculada en 290 kD. El análisis de expresión de tejidos humanos de CEP290 mediante PCR de tiempo real encontró su máxima expresión en la retina neural y el epitelio nasal. Puede causar distrofias retinianas con patrón de herencia autosómica recesiva como síndrome de Joubert 5, síndrome de Senior-Loken, amaurosis congénita de Leber, síndrome de Bardet-Biedl y retinosis pigmentaria.

Familia 3 (RPAR 475)

Tabla 3A – Datos Clínicos Familia 3 (RPAR 475)

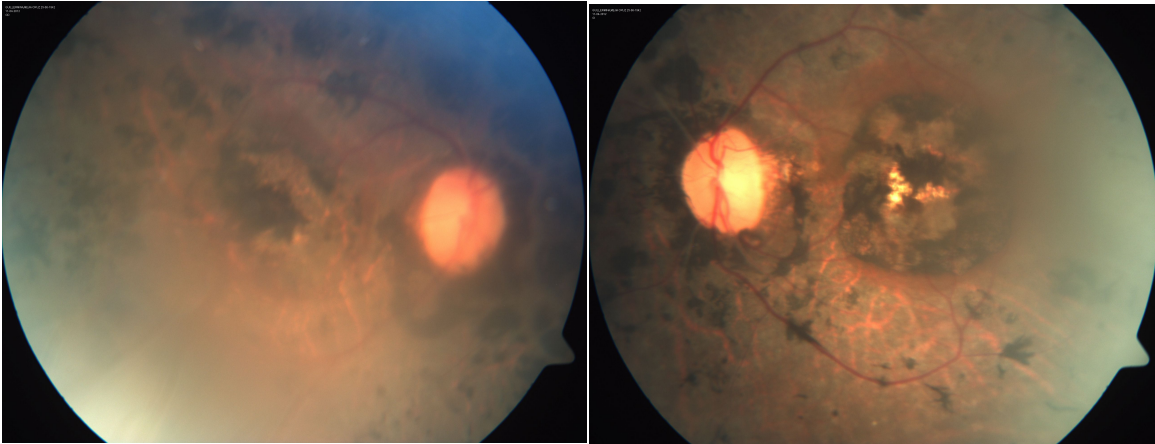
Número total de Hermanos	Numero de hermanos Afectados	Procedencia	Edad y Sexo	Diagnóstico	Manifestaciones sistémicas	Consanguinidad por árbol genealógico
14	4	San Miguel Acambay, Estado de México.	70/ Fem.	Retinosis pigmentaria clásica	No	Si. Padres compartían apellido y familiares lejanos en común.
			62/ Fem.	Retinosis pigmentaria clásica	No	

*** Solo se presentaron dos afectadas.

Caso Índice Familia 3.

Femenino de 70 años de edad quien notó disminución de la agudeza visual sin nictalopía a la edad de 35 años, lentamente progresiva. Proviene de Ajuando, municipio de San Miguel Acambay, Estado de México. Tuvo 14 hermanos de los cuales sobreviven 7, de los cuales cuatros presentan mismo cuadro de distrofia retiniana, 3 femeninos y un masculino. Sus padres tenían tías terceras en común, y ambos padres son del pueblo de Ajuando, el cual es una comunidad de aproximadamente 2000 habitantes. Como antecedentes patológicos es diabética e hipertensa.

Tiene una capacidad visual del ojo derecho de percepción de luz sin discriminar colores, y del ojo izquierdo presenta percepción de luz que discrimina colores. Ambos ojos presentan una catarata subcapsular posterior 3, con pigmento en vítreo anterior, y la retina presenta una retinopatía pigmentaria avanzada que afecta la totalidad de la retina, compatible con una retinosis pigmentaria clásica. El electroretinograma se encuentra totalmente abolido.

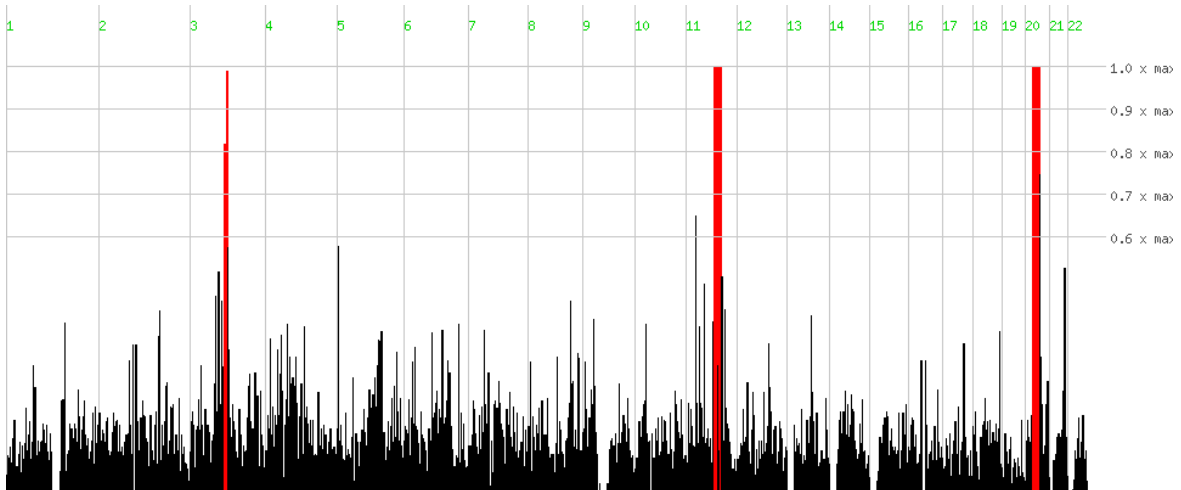


A

B

Fotos Clínicas 3 - Caso Índice familia 3: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 3



Grafica 3 – Familia 3: Región homocigota del Cromosoma 3: Aquí se encuentra el Gen ARL6, el cual esta asociado con distrofias retinianas. Región homocigota del Cromosoma 11: Aquí se encuentra el gen MYO7 relacionado con distrofias retinianas.

Tabla 3B - Familia 3: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Cromosoma	Score	Intervalo Genómico	Número de genes en la región	Genes relacionados con fenotipo ocular	Genes Candidatos (relacionados a distrofias retinianas o a función retiniana)
3p	204	De (bp) 89518464 – a (bp) 95704580 Del SNP rs1912966 al SNP rs9871481	14	-	-
3q	247	De (bp) 96145675 – a (bp) 98964877 Del SNP rs11916855 al SNP rs2341806	41	ARL6	ARL6
11q	250	De (bp) 75876811 - a (bp) 82260811 Del SNP rs11820956 al SNP rs1939633	42	MYO7A	MYO7A
11q	250	De (bp) 82265147 - a (bp) 85447611 Del SNP rs10897988 al SNP rs680498	32	-	-

11q	250	De (bp) 86291683 - a (bp) 89094890 Del SNP rs1945145 al SNP rs317187	20	FZD4, RAB38, TYR	-
20p	250	de (bp) 18296473 - a (bp) 20849072 del SNP rs1050475 al SNP rs6082212	33	-	-
20p	250	De (bp) 21918288 - a (bp) 24193691 Del SNP rs2328682 al SNP rs562594	34	FOXA2	-
20q	250	De (bp) 26079655 - a (bp) 36737339 Del SNP rs2721985 al SNP rs6127142	170	ID1, DNMT3B, E2F1, ASIP, NCOA6, RBL1 y SRC	-

Genes candidatos:

ARL6 (97483595 – 97517373, 3q11.2): Este gen es miembro de un subgrupo de la familia ARF (ADP-ribosylation factor family), un grupo de proteínas que regulan diversas funciones celulares, incluyendo el tráfico intracelular. Produce una proteína de 186 aminoácidos con un peso estimado de 20.0 kD.

Utilizando estudios de inmunohistoquímica de alta resolución se pudo determinar que ARL6 se expresa en los cilios del epitelio pigmentado de la retina, en un pequeño punto flanqueando el axonema del microtubulo.

Puede causar síndrome de Bardet-Biedl y retinosis pigmentaria con patrón de herencia autosómico recesivo.

MYO7A (76839310 - 76926286, 11q13.5): Este gen codifica una proteína clasificada como una miosina no convencional. Las miosinas no convencionales son moléculas motoras con cabezas estructuralmente conservadas que se mueven a través de los filamentos de actina. Produce una proteína de 2,215 aminoácidos con un peso molecular estimado de 250 kD.

Se sabe causa síndrome de Usher tipo 1B, y recientemente se asocio a un fenotipo de retinosis pigmentaria aislada.

Familia 4 (RPAR 2637)

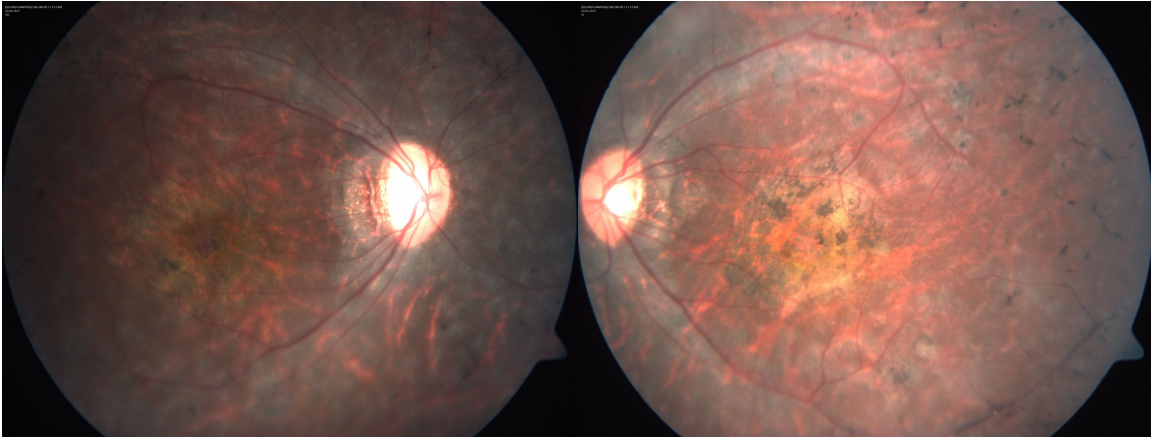
Tabla 4A – Datos Clínicos Familia 4 (RPAR 2637)

Número total de Hermanos	Numero de hermanos Afectados	Procedencia	Edad y Sexo	Diagnóstico	Manifestaciones sistémicas	Consanguinidad por árbol genealógico
7	2	Ciudad Neza, Edo. de México	31/ Masc.	Retinosis pigmentaria clásica	No	No
			34/ Masc.	Retinosis pigmentaria clásica	No	

Caso Índice Familia 4

Masculino de 31 años de edad quien desde la edad de 7 años presentó nictalopía con disminución de la agudeza visual progresiva, sin fotofobia ni otros síntomas acompañantes. Proviene de Ciudad Neza, Estado de México, y de una familia de 7 hermanos de los cuales únicamente presentan este cuadro. No existe, consanguinidad entre los padres.

Tiene una capacidad visual en ambos ojos de movimientos de manos, con una refracción óptica de -0.50=-0.50 x 0 en ambos ojos. En la retina presenta, espículas óseas, y atrofia clínica del epitelio pigmentado de la retina, con visualización de los grandes vasos coroideos y disminución del calibre de las arcadas vasculares. El electroretinograma no registro respuesta en ambos sistemas, y se le diagnóstico una retinosis clásica al igual que a su hermano afectado.

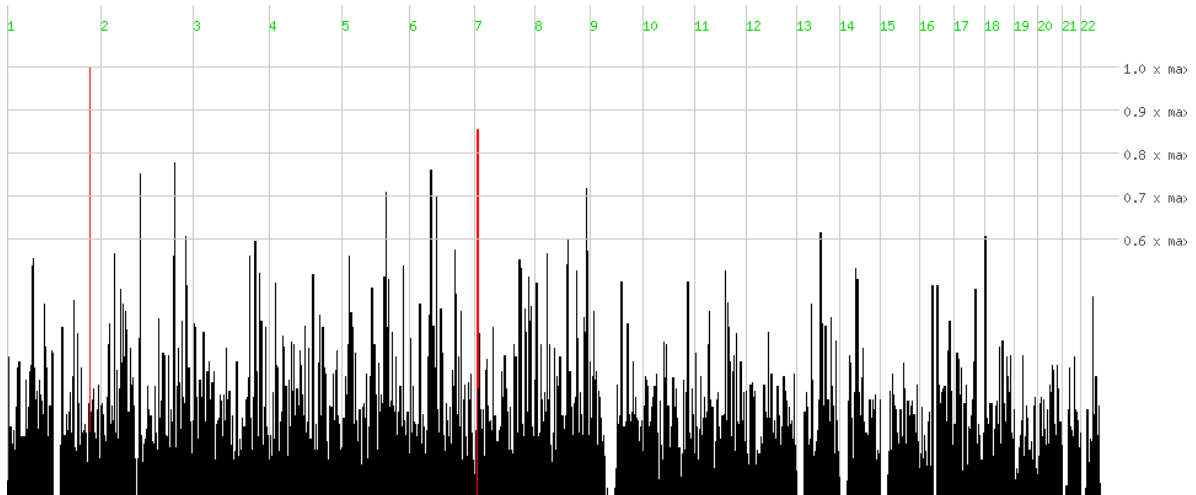


A

B

Fotos Clínicas 4 - Caso Índice familia 4: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 4



Grafica 4 – Familia 4: No se encuentran genes candidatos en las distintas regiones homocigotas.

Tabla 4B - Familia 4: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Cromosoma	Score	Intervalo Genómico	Número de genes en la región	Genes relacionados con fenotipo ocular	Genes Candidatos (relacionados a distrofias retinianas o a función retiniana)
1q	204	De (bp) 218844489 - a (bp) 220479607 del SNP rs4846273 al SNP rs2089861	18	-	-
7p	174	De (bp) 7902369 - a (bp) 8998976 Del SNP rs17562004 al SNP rs17157663	9	-	-

Familia 5 (RPAR 2643)

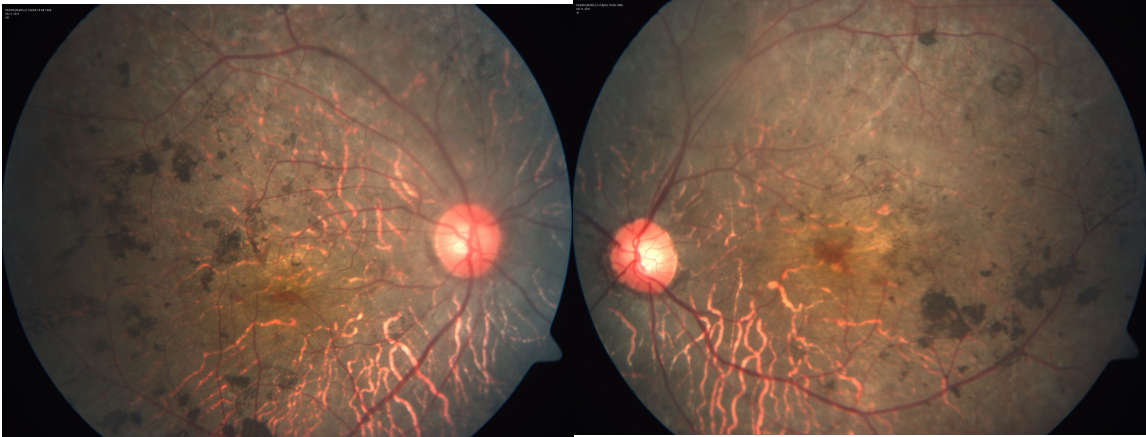
Tabla 5A - Datos Clínicos Familia 5 (RPAR 2643)

Número total de Hermanos	Numero de hermanos Afectados	Procedencia	Edad y Sexo	Diagnóstico	Manifestaciones sistémicas	Consanguinidad por árbol genealógico
14	2	Refugio Villanueva, Zacatecas.	44, Masc	Retinosis Pigmentaria Clásica	No	Si. Su Madre y Abuela Paterna son primas hermanas.
			38, Masc.	Retinosis Pigmentaria Clásica	No	

Caso Índice Familia 5

Masculino de 44 años de edad quien desde los 15 años presento nictalopía y disminución de la agudeza visual rápidamente progresiva, acompañado de fotofobia, sin afección de la visión cromática. Existe consanguinidad entre sus padres ya que su madre y su abuela paterna son primas hermanas. Fueron 14 hermanos en total de los cuales solo dos presentan una distrofia retiniana.

En la exploración oftalmológica se documento una capacidad visual de percibe luz y discrimina color en ojo derecho y movimiento de manos en ojo izquierdo. Su refracción objetiva es de -1.00 esférica en ambos ojos. Presenta dispersión de pigmento, atrofia clínica del EPR, espículas óseas, y atenuación de calibre vascular. A ambos miembros afectados de esta familia se les clasifico con un cuadro de retinosis pigmentaria clásica.

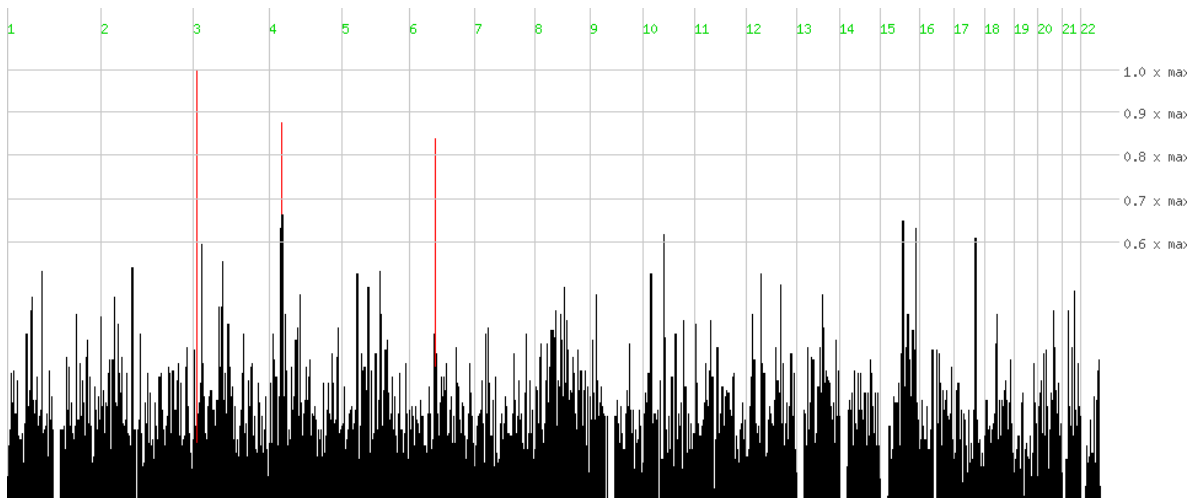


A

B

Fotos Clínicas 5 - Caso Índice familia 5: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 5



Grafica 5 – Familia 5: No se encuentran genes candidatos en las distintas regiones homocigotas.

Tabla 5B - Familia 5: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Cromosoma	Score	Intervalo Genómico	Número de genes en la región	Genes relacionados con fenotipo ocular	Genes Candidatos (relacionados a distrofias retinianas o a función retiniana)
3p	130	De (bp) 8442494 - a (bp) 9418707. Del SNP rs1161171 al SNP rs2596918.	13	-	-
4p	114	De (bp) 33348789- a (bp) 34765697. Del SNP rs2337724 al SNP rs16990341	1	-	-
6q	109	De 66480243 (bp) 66480243 - a (bp) 67330025 Del SNP rs4710538 al SNP rs9345858	3	-	-

Familia 6 (RPAR 1928)

Tabla 6A – Datos Clínicos Familia 6 (RPAR 1928)

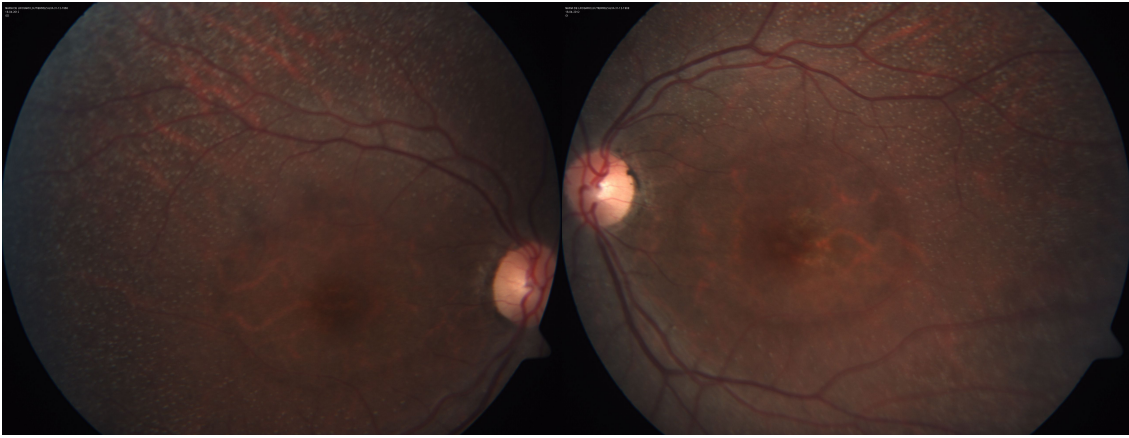
Número total de Hermanos	Numero de hermanos Afectados	Procedencia	Edad y Sexo	Diagnóstico	Manifestaciones sistémicas	Consanguinidad por árbol genealógico
14	6	Distrito Federal	42/Fem.	Retinitis punctata albescens	No	No
			54/Fem.	Retinitis punctata albescens	No	No
			38/Masc.	Retinitis punctata albescens	No	No

Solo se presentaron a revisión 3 afectados.

Caso Índice Familia 6.

Femenino de 42 años, producto de matrimonio no consanguíneo. Miembro de familia de 14 hermanos de los cuales 6 presentan distrofia retiniana. Ella presentó nictalopía desde la edad de 5 años con disminución de la agudeza visual que inicio a la edad de 40 años, rápidamente progresiva. Según refiere la paciente todos los hermanos afectados presentan disminución de la agudeza visual y nictalopía que aparecieron en distintas edades.

Su capacidad visual es de 20/60 en ojo derecho y 20/200 ojo izquierdo, con corrección óptica de -2.50 esférico ojo derecho y -3.00 esférico ojo izquierdo. No presenta opacidad de cristalino y el vítreo se encuentra con sinéresis vítrea. La retina presenta puntos blancos uniformes, distribuidos en el ecuador y periferia, respetando el era macular, donde presenta una lesión macular tipo atrofia geográfica. El electroretinograma muestra una respuesta escotópica abolida totalmente con respuesta fotópicas registrables más disminuidas en su amplitud. Se estableció en esta familia un diagnóstico de retinitis punctata albescens. Se reviso a otros dos miembros afectados de esta familia y los tres presentaron un cuadro clínico idéntico.

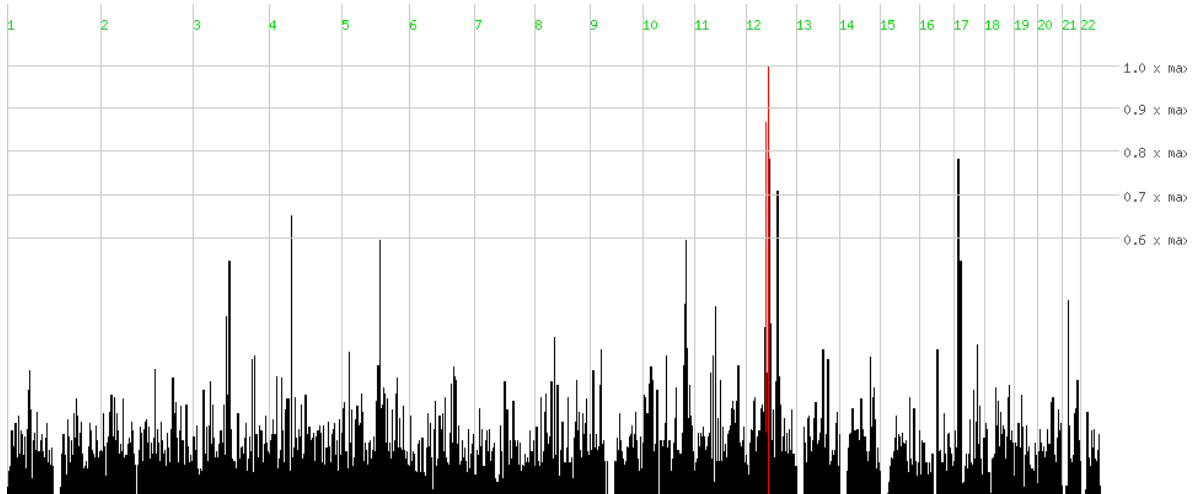


A

B

Fotos Clínicas 6 - Caso Índice familia 6: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 6



Grafica 6 – Familia 6: No se encuentran genes candidatos en la región homocigota del cromosoma 12.

Tabla 6B - Familia 6: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Cromosoma	Score	Intervalo Genómico	Número de genes en la región	Genes relacionados con fenotipo ocular	Genes Candidatos (relacionados a distrofias retinianas o a función retiniana)
12q	198	de (bp) 52590595 - a (bp) 54458930. Del SNP rs2360652 al SNP rs1006705.	84	KRT4, RARG, PFDN5, SP1 y HOXC13	-
12q	228	de (bp) 59451121 - a (bp) 61468028. Del SNP rs1373355 al SNP rs10747905	1	-	-

Familia 7 (RPAR 2258)

Tabla 7A – Datos Clínicos Familia 7 (RPAR 2258)

Número total de Hermanos	Numero de hermanos Afectados	Procedencia	Edad y Sexo	Diagnóstico	Manifestaciones sistémicas	Consanguinidad por árbol genealógico
3	2	Hueyiclalpan, Guerrero	4 Fem	Amaurosis Congénita de Leber	No	No Pueblo Chico
			2 Fem	Amaurosis Congénita de Leber	No	No

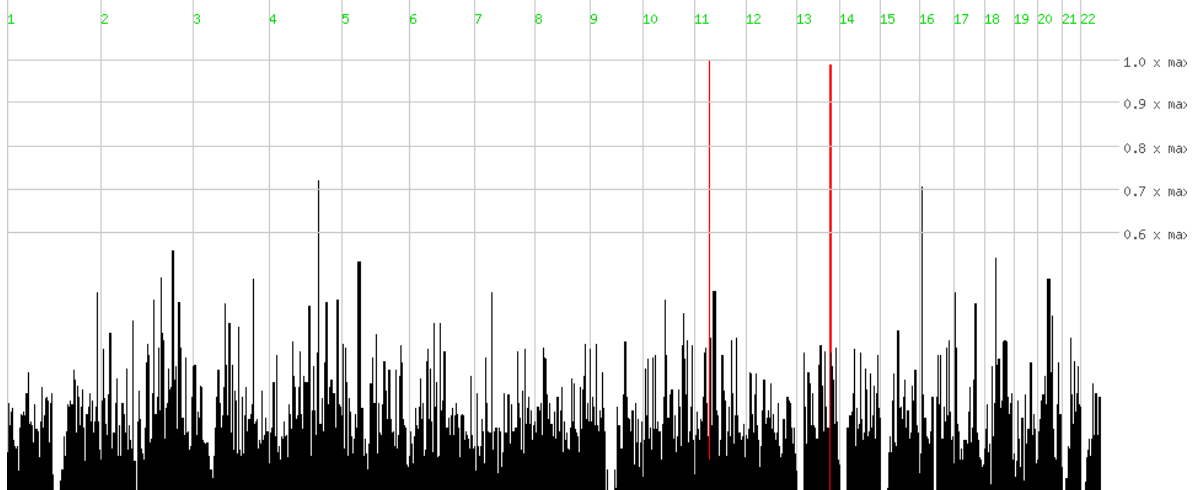
Caso Índice Familia 7

Femenino de 7 años de edad quien presenta mala agudeza visual y nistagmos desde el nacimiento. Proviene de Hueyiclalpan, Estado de Guerrero, comunidad de aproximadamente 2000 habitantes. Familia de 3 hermanos de los cuales dos están afectados por el mismo cuadro ocular, sin consanguinidad documentada entre los padres.

Presenta nistagmos horizontal que no disminuye con alguna posición de la cabeza. No coopera a la exploración física por lo cual no se puede obtener imágenes clínicas de la retina. En la retina se aprecia algunas escasas espículas óseas en la periferia, al igual que un moteado fino a nivel del EPR, con disminución del calibre vascular. Se diagnosticaron como Amaurosis Congénita de Leber a ambos miembros de esta familia.

SIN FOTOS CLINICAS- NO COPERARON POR LA EDAD

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 7



Grafica 7 – Familia 7: En ambas regiones homocigotas del cromosoma 11 y cromosoma 13 no hay genes conocidos relacionados a fenotipo ocular. En estos dos picos solo existen pseudogenes y solamente existe un gen localizado en la porción homocigota detectada en el cromosoma 11, el gen LRRC4C.

Tabla 7B - Familia 7: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Cromosoma	Score	Intervalo Genómico	Número de genes	Genes relacionados con fenotipo ocular	Genes Candidatos (relacionados a distrofias retinianas o a función retiniana)
11p	227	De (bp) 37958975 - a (bp) 40206711. Del SNP	1	-	LRRC4C

		rs16930902 al SNP rs6485188.			
13q	224	De (bp) 88893107 - a (bp) 90786160. Del SNP rs7339189 al SNP rs1287521.	-	-	-

Gen Candidato:

LRRC4C (40135753 a 40315664, 11p12): Este gen produce una proteína de 640 aminoácidos con un peso molecular estimado de 71.9 kD. Se expresa en el estriado y corteza cerebral, así como en los axones talamocorticales. Tiene interacciones con los genes USH1C y MYO7A los cuales están relacionados a distrofias retinianas. Se escoge a este gen como candidato por ser el único en los picos homocigotos, por estar relacionado con la función neuronal y por tener interacciones con otros genes causantes de distrofias retinianas.

Familia 8 (RPAR 2691)

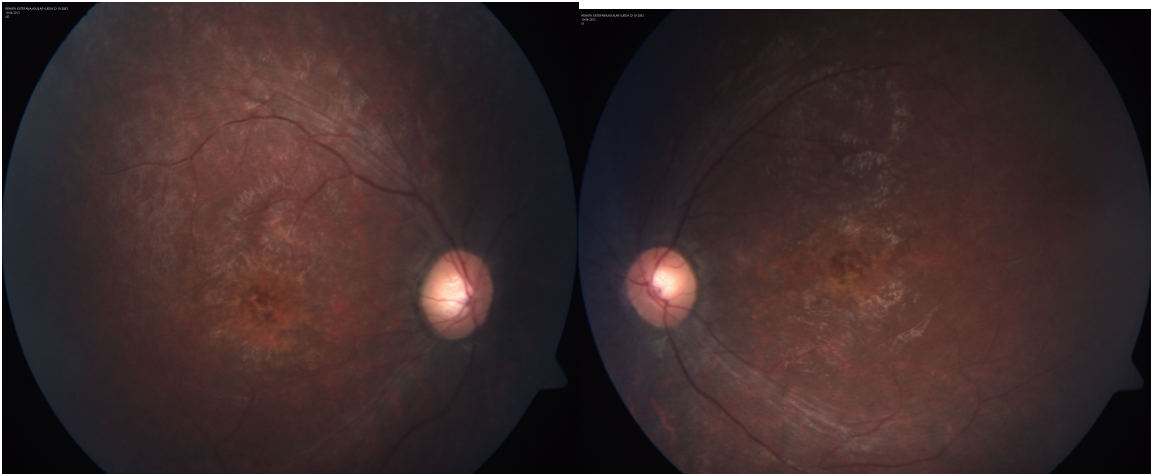
Tabla 8A – Datos Clínicos Familia 8 (RPAR 2691)

Número total de Hermanos	Numero de hermanos Afectados	Procedencia	Edad y Sexo	Diagnóstico	Manifestaciones sistémicas	Consanguinidad por árbol genealógico
Hija Unica	1	Cuautla, Morelos	9/Fem.	Retinosis pigmentaria de inicio temprano.	Convulsión tónico/clónica en una sola ocasión	Si. Abuela paterna y bisabuela materna eran primas hermanas.

Caso Índice Familia 8

Femenino de 11 años de edad, hija única de unión consanguínea (padres son tío y sobrina de "tercera generación"), provenientes de Cuautla Estado de Morelos. Los padres refieren su hija presento disminución de la agudeza visual desde la edad de 7 años, la cual ha sido rápidamente progresiva, y nistagmos desde la edad de 8 años. Ha presentado una convulsión tónico-clónica a la edad de 7 años, siendo diagnosticada como epiléptica por un neurólogo pediatra y tratada con anticonvulsivantes. No ha mostrado ningún dato de deterioro neurológico, ya sea motriz o cognitivo en 3 años de seguimiento.

A la exploración oftalmológica se encontró una capacidad visual de movimiento de manos, y un error refractivo de +1.00 dioptría esférica en ambos ojos. La retina presenta un moteado fino por atrofia clínica del EPR, un puntuado fino en la totalidad de la retina, incluyendo la mácula, al igual que espículas óseas en ecuador y periferia. Le realizaron un ERG a la edad de 7 años que mostró respuesta en la fase fotópica con amplitudes disminuidas pero con ausencia de respuesta la fase escotópica en ambos ojos. El electroretinograma de la edad de 9 años muestra todas las fases sin respuesta. Se le diagnóstico retinosis pigmentaria de inicio temprano.



A

B

Fotos Clínicas 8 - Caso Índice familia 8: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 8

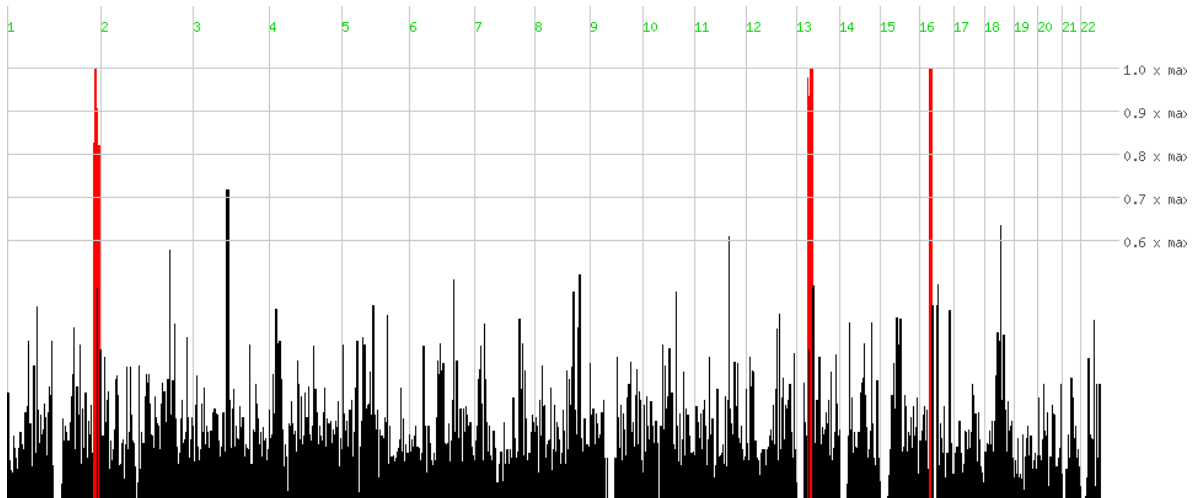


Tabla 8 – Familia 8: Región homocigota del Cromosoma 16: En esta región esta CLN3 el cual es un gen que causa distrofias retinianas – Síndrome de Batten.

Tabla 8B - Familia 8: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Cromosoma	Score	Intervalo Genómico	Número de genes en la región	Genes relacionados con fenotipo ocular	Genes Candidatos (relacionados a distrofias retinianas o a función retiniana)
1q	206	De (bp) 230650313 - a (bp) 232540391. Del SNP rs853003 al SNP rs16856996.	25	GNPAT	-
1q	250	De (bp) 232544803 - a (bp) 234566943. Del SNP rs12568906 al SNP rs10910435	15	-	-
	226	De (bp) 236387442 - a (bp) 237735297. Del SNP rs10924786 al SNP rs2779407.	14	EDARADD	-

1q	205	De (bp) 242328222 - a (bp) 244751029. Del SNP rs695021 al SNP rs7541784.	23	-	-
13q	244	de (bp) 28928688 - a (bp) 31041279. Del SNP rs9513087 al SNP rs2388546	16	FLT1, HMGB1	-
13q	233	De (bp) 31177774 - a (bp) 32999951. Del SNP rs17074775 al SNP rs206335.	17	-	-
13q	250	De (bp) 35766256 - a (bp) 38205422. Del SNP rs41339148 al	28	MAB21L1, SUPT20H	-

		SNP rs41473348.			
13q	250	De (bp) 39448455 - a (bp) 42838908. Del SNP rs9548518 al SNP rs10492433.	45	FREM2	-
16p	250	De (bp) 25911212 - a (bp) 33940200. Del SNP rs4548875 al SNP rs7500645.	234	CLN3	CLN3

Gen Candidato:

CLN3 (28488600 - 28503623, 16p11.2): Es un gen que produce una proteína (Battenina) de 438 aminoácidos con un peso molecular estimado de 48 kD que se expresa de manera importante en el cerebro, páncreas, bazo, y testículos. Se cree que la proteína funciona como una chaperona involucrada en la fabricación, destrucción, plegamiento y desplegamiento de otras proteínas. Se sabe causa síndrome de Batten y casos de retinosis pigmentaria aislada.

Familia 9 (RPAR 2669)

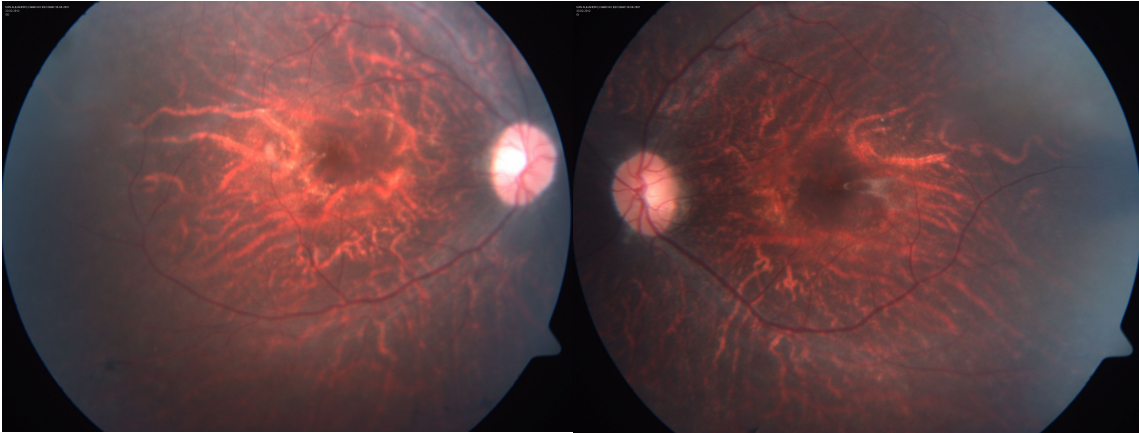
Tabla 9A – Datos Clínicos Familia 9 (RPAR 2669)

Número total de Hermanos	Numero de hermanos Afectados	Procedencia	Edad y Sexo	Diagnóstico	Manifestaciones sistémicas	Consanguinidad por árbol genealógico
4	2	Chiapas	9 Masc	Amaurosis Congénita de Leber	No	No
	2		10 Masc	Amaurosis Congénita de Leber	No	No

Caso Índice Familia 9.

Masculino de 9 años de edad quien al mes de nacimiento los padres notaron nistagmos horizontal y mala agudeza visual, al igual que signo óculo-digital de Franceschetti. Es producto de padres no consanguíneos, de Jiquipilas, Estado de Chiapas. Son cuatro hermanos de los cuales solo dos, ambos masculinos presentan el mismo cuadro, sin existir otro afectado en sus familiares ascendentes.

Presenta una capacidad visual de percepción de luz sin discriminar colores y un error refractivo objetivo de +2.00=-0.50 x 0 en ambos ojos. La retina presenta grandes parches de atrofia clínica del EPR, con visualización de los grandes vasos coroideos, así como palidez de dos cruces del nervio óptico, y disminución del calibre de las arcadas vasculares. Se documenta el nistagmos horizontal sin bloqueo con posición compensadora de la cabeza. Se diagnóstico a ambos miembros de esta familia con amaurosis congénita de Leber.

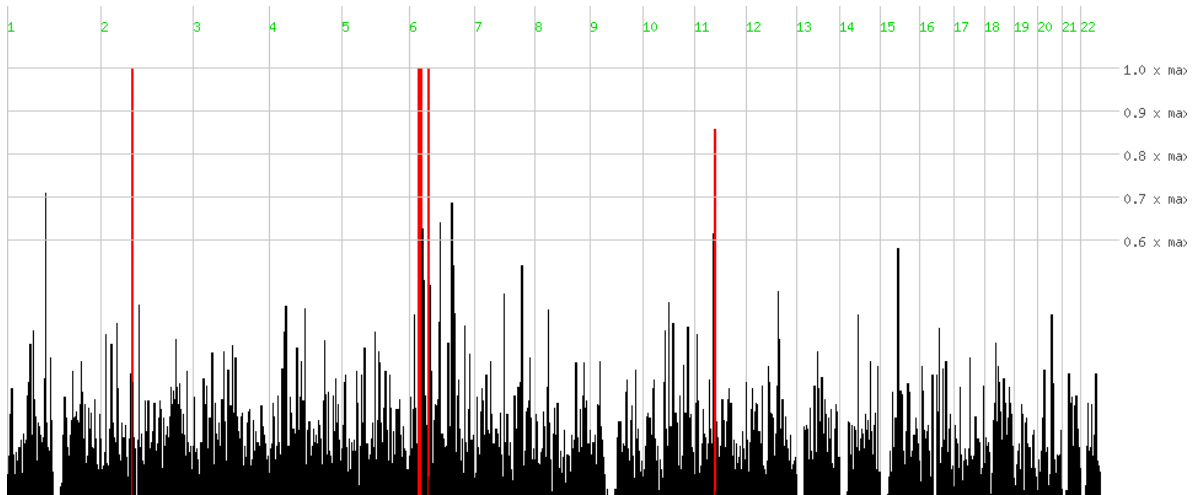


A

B

Fotos Clínicas 9 - Caso Índice familia 9: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 9



Grafica 9 – Familia 9: No se encuentran genes candidatos en las distintas regiones homocigotas.

Tabla 9B - Familia 9: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Cromosoma	Score	Intervalo Genómico	Número de genes en la región	Genes relacionados con fenotipo ocular	Genes Candidatos (relacionados a distrofias retinianas o a función retiniana)
2p	250	De (bp) 80677131 - a (bp) 83335757. Del SNP rs3290 al SNP rs10496291.	7	-	-
6p	250	De (bp) 22197588 - a (bp) 25928376. Del SNP rs12526408 al SNP rs9295676.	41	-	-
6p	250	De (bp) 25936402 - a (bp) 31242859. Del SNP rs9461224 al SNP rs3130693.	451	MOG	-
6p	250	De (bp) 46996218 - a (bp)	53	-	-

		52447280. Del SNP rs1226485 al SNP rs2268702.			
11p	214	De (bp) 50299865 - a (bp) 56622717. Del SNP rs4079913 al SNP rs2032379.	122	-	-

Familia 10 (RPAR 2583 y RPAR 2581)

Tabla 10A – Datos Clínicos Familia 10 (RPAR 2583 y RPAR 2581)

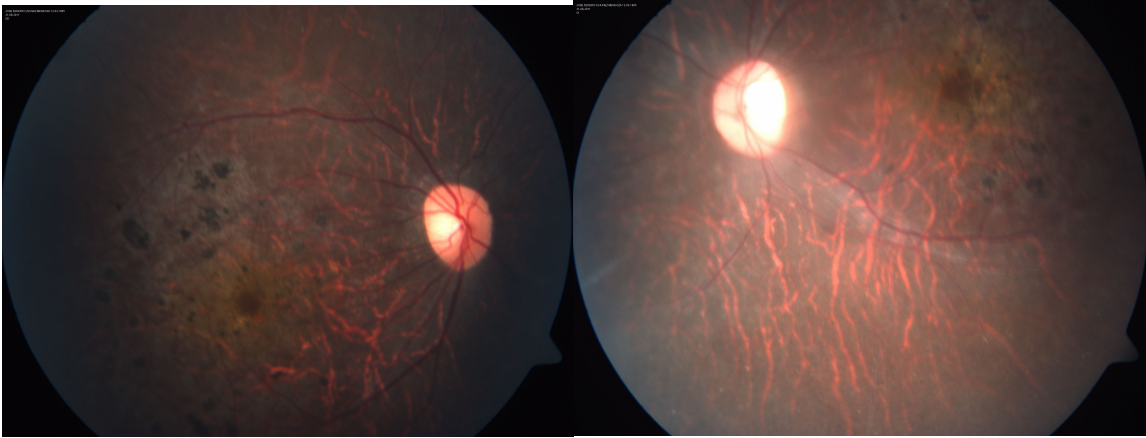
Número total de Hermanos	Numero de hermanos Afectados	Procedencia	Edad y Sexo	Diagnóstico	Manifestaciones sistémicas	Consanguinidad por árbol genealógico
Hijo único	1	Tula de Allende, Hidalgo	19, Masc	Síndrome de Bardet-Biedl	Obesidad, retraso mental, polidactilia .	Si. Abuelas de los padres, primas hermanas
7 Hermanos	2	San Ignacio Nopala, Hidalgo	25, Masc	Síndrome de Bardet-Biedl	Obesidad, retraso mental, polidactilia .	No. Primos Hermanos de DNA 2583
			33, Masc	Síndrome de Bardet-Biedl	Obesidad, retraso mental, polidactilia .	

Caso Índice Familia 10 (RPAR 2583)

Masculino de 19 años de edad quien presenta mala agudeza visual, que notaron los padres a la edad de 3 años. Presenta polidactilia en ambas manos y pies, al igual que obesidad centrípeta y retraso mental. Es hijo único de matrimonio consanguíneo (ambas abuela maternas de los padres son primas hermanas). Dos tíos segundos (primos hermanos del padre), presentan idéntico cuadro clínico y se incluyeron en este estudio. Sus padres al igual que sus primos afectados nacieron en San Ignacio Nopala, Estado de Hidalgo.

A la exploración oftalmológica presenta agudeza visual de movimientos de manos, no se puede obtener refracción por baja cooperación a la exploración. La retina presenta espículas óseas, dispersión de pigmento a nivel del EPR, visualizándose los grandes vasos

coroideos, palidez mínima (una cruz) del nervio óptico y atenuación del calibre vascular, datos compatibles con una retinosis pigmentaria clásica. Se diagnóstico a esta familia con síndrome de Bardet-Biedl.

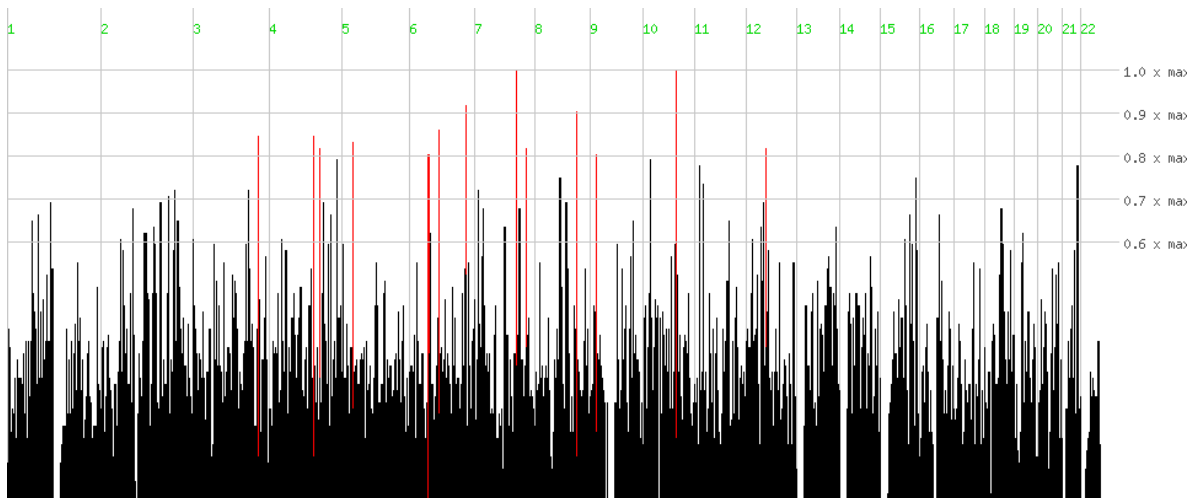


A

B

Fotos Clínicas 10 - Caso Índice familia 10: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 10



Grafica 10 – Familia 10: No se encuentran genes candidatos en las distintas regiones homocigotas.

Tabla 10B - Familia 10: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Cromosoma	Score	Intervalo Genómico	Número de genes en la región	Genes relacionados con fenotipo ocular	Genes Candidatos (relacionados a distrofias retinianas o a función retiniana)
3q	60	De (bp) 172779562 - a (bp) 173210531. Del SNP rs1567717 al SNP rs41334546.	2	-	-
4q	60	De (bp) 119036642 - a (bp) 119833292. Del SNP rs4576085 al SNP rs736965	12	NDST3	-
4q	58	De (bp) 133395895 - a (bp) 133775254. Del SNP rs1875024 al SNP rs10027230.	-	-	-
5p	59	De (bp) 30889007 - a (bp) 31245334.	2	-	-

		Del SNP rs17595719 al SNP rs16900783			
6p	57	De (bp) 48837491 - a (bp) 49625290. Del SNP rs16878293 al SNP rs6922618.	11	-	-
6q	61	De (bp) 75625251 - a (bp) 76469353. Del SNP rs7743883 al SNP rs9447543.	12	MYO6	-
6q	65	De (bp) 148142827 - a (bp) 148696920. Del SNP rs6914755 al SNP rs17078283.	1	-	-
7q	71	De (bp) 110369417 - a (bp) 111510963. Del SNP rs6466354 al SNP rs17158926	5	-	-

7q	58	De (bp) 135508244 - a (bp) 135977444. Del SNP rs6958939 al SNP rs2555050.	3	-	-
8q	64	De (bp) 110853138 - a (bp) 111817591. Del SNP rs16892504 al SNP rs6469322.	5	-	-
9p	57	De (bp) 17169424 - a (bp) 17596833. Del SNP rs7856549 al SNP rs2208506.	4	-	-
10q	71	De (bp) 87005584 - a (bp) 87694876. Del SNP rs12772593 al SNP rs7924131.	2	-	-
12q	71	De (bp) 52691103 - a (bp) 52968378.	14	-	-

		Del SNP rs949387 al SNP rs7958736			
--	--	--------------------------------------	--	--	--

Familia 11 (RPAR 2712)

Tabla 11A – Datos Clínicos Familia 11 (RPAR 2712)

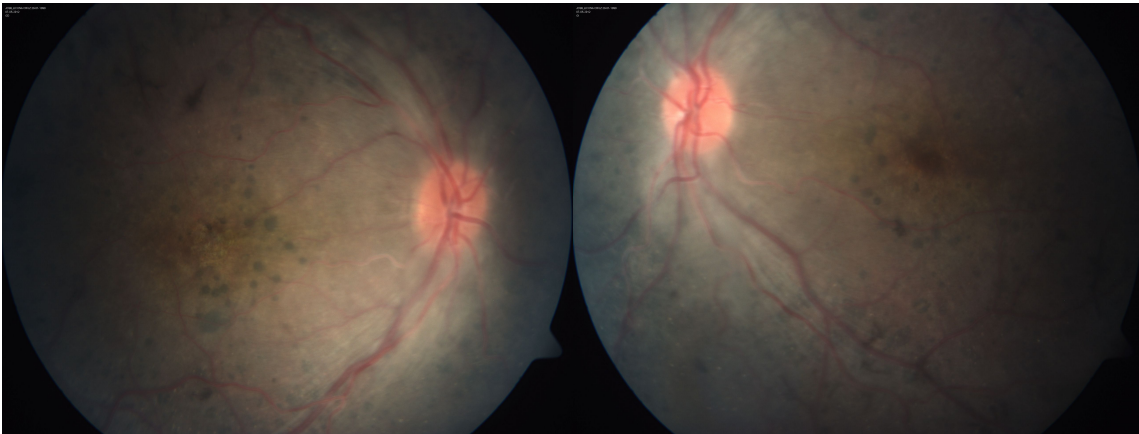
Número total de Hermanos	Numero de hermanos Afectados	Procedencia	Edad y Sexo	Diagnóstico	Manifestaciones sistémicas	Consanguinidad por árbol genealógico
4	3	Guayacocotla, Veracruz	13, Masc	Retinosis pigmentaria de inicio temprano.	No	No
			8, Fem	Retinosis pigmentaria de inicio temprano.	No	
			10, Masc	Retinosis pigmentaria de inicio temprano.	No	

Caso Índice Familia 11

Masculino de 13 años de edad quien desde la edad de 5 años presenta disminución rápidamente progresiva de la agudeza visual. También presenta nictalopía y nistagmos de mismo tiempo de evolución. Los padres no tienen vinculo consanguíneo y son de Guayacocotla, Estado de Veracruz. Son cuatro hermanos de los cuales 2 masculinos y un femenino están afectados por un cuadro clínico similar.

Presenta agudeza visual de percepción de luz que discrimina colores en ambos ojos, y error refractivo de +3.00 dioptrías esféricas en ambos ojos. Presenta datos de una

retinopatía pigmentaria avanzada, con afectación generalizada de la retina, lo cual incluye atrofia clínica del EPR, espículas óseas, palidez del nervio óptico de dos cruces, atenuación vascular importante y nistagmos horizontal sin posición de bloqueo. El electroretinograma no registra respuesta en ninguna fase en ambos ojos. Se diagnostica en esta familia retinosis pigmentaria de inicio temprano.

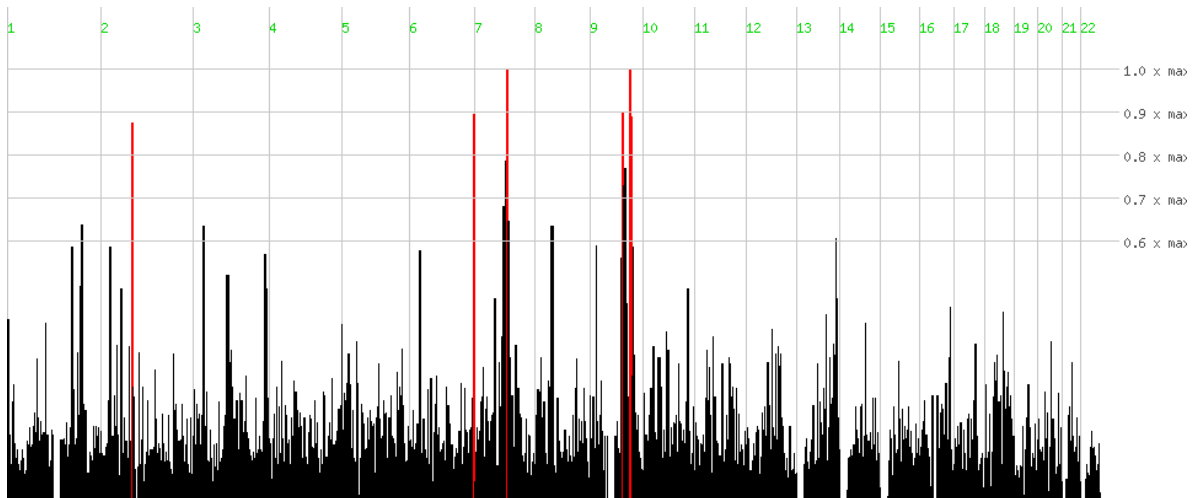


A

B

Fotos Clínicas 11 - Caso Índice familia 11: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 11



Grafica 11 – Familia 11: No se encuentran genes candidatos en las distintas regiones homocigotas.

Tabla 11B - Familia 11: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Cromosoma	Score	Intervalo Genómico	Número de genes en la región	Genes relacionados con fenotipo ocular	Genes Candidatos (relacionados a distrofias retinianas o a función retiniana)
2p	218	De (bp) 80798914 - a (bp) 82870237. Del SNP rs1434064 al SNP rs11678145.	6	-	-
6q	223	De (bp) 168695624 - a (bp) 170715529. Del SNP rs7738825 al SNP rs7754489.	16	-	-
7q	250	De (bp) 84503579 - a (bp) 87497323. Del SNP rs7799648 al SNP rs10239908.	20	-	-
9q	225	De (bp) 85108012 - a (bp) 87173333. Del SNP rs10120888 al SNP rs1347858.	13	-	-

9q	250	De (bp) 104420704 - a (bp) 107297337. Del SNP rs1323420 al SNP rs6479247.	11	GRIN3A	-
9q	222	De (bp) 107780384 - a (bp) 110100252 Del SNP rs1983035 al SNP rs817841.	15	RAD23B	-

Familia 12 (RPAR 2740)

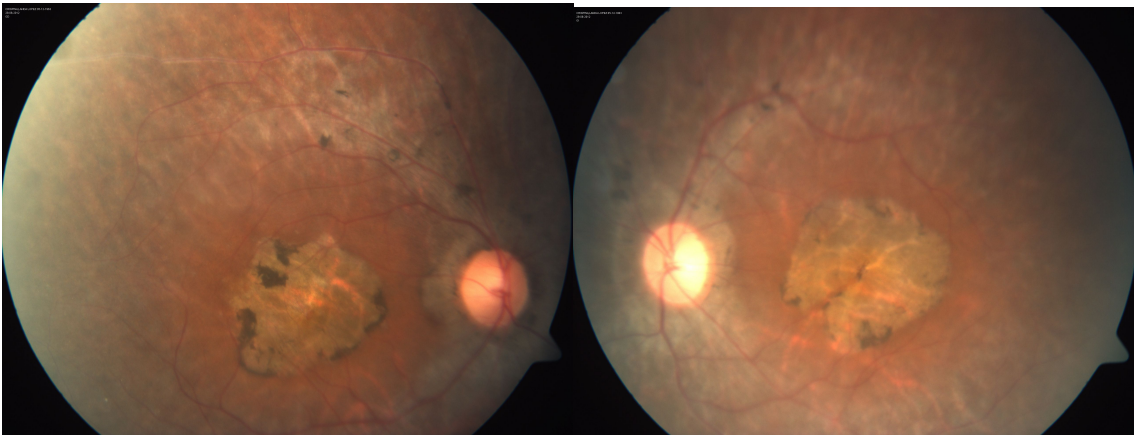
Tabla 12A – Datos Clínicos Familia 12 (RPAR 2740)

Número total de Hermanos	Numero de hermanos Afectados	Procedencia	Edad y Sexo	Diagnóstico	Manifestaciones sistémicas	Consanguinidad por árbol genealógico
3	2	San José de Abajo, Veracruz	48, Fem	Retinosis Pigmentaria Clásica	No	No. Pueblo pequeño.
			49, Fem	Retinosis Pigmentaria Clásica	No.	

Caso Índice Familia 12

Femenino de 48 años de edad quien refiere disminución de la agudeza visual, acompañado de nictalopía desde la edad de 36 años. Los padres no conocen vinculo consanguíneo entre ellos, más son de San José de Abajo, Estado de Veracruz, una comunidad de 400 habitantes. Son tres hermanos de los cuales una hermana presenta el mismo cuadro. Tiene otros tres medios hermanos, hijos de su madre sin patología ocular alguna.

Su capacidad visual es de 20/400 en ambos ojos, sin error refractivo. La retina de ambos ojos presenta, espículas óseas de predominio en el trayecto de las cuatro arcadas vasculares, en periferia y ecuador. En la mácula presenta una lesión tipo atrofia geográfica. El nervio óptico esta pálido y las arcadas vasculares disminuidas en su calibre. Se clasifico a ambos miembros afectados de esta familia con retinosis pigmentaria clásica.

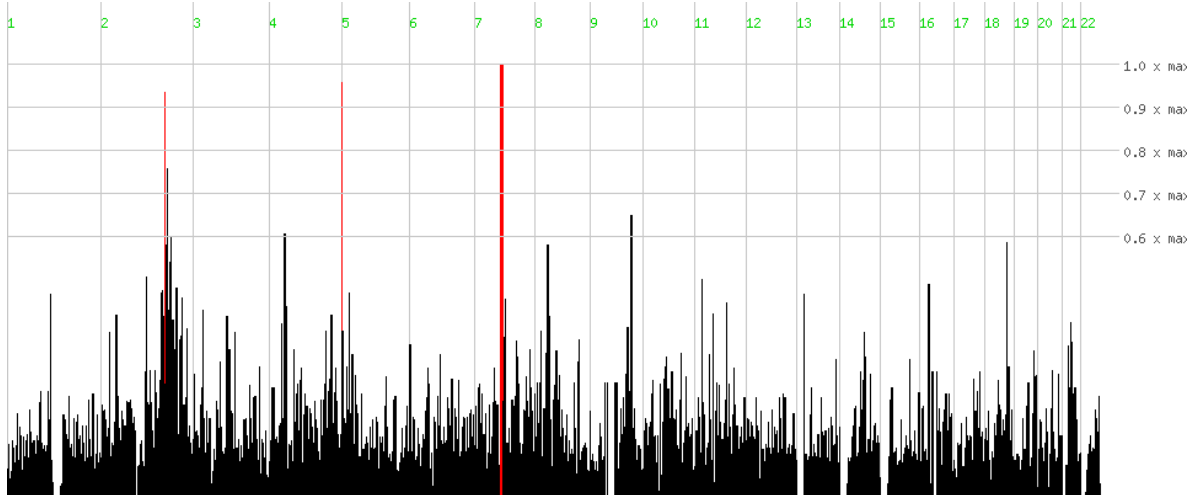


A

B

Fotos Clínicas 12 - Caso Índice familia 12: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 12



Grafica 12 – Familia 12: No se encuentran genes candidatos en las distintas regiones homocigotas.

Tabla 12B - Familia 12: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Cromosoma	Score	Intervalo Genómico	Número de genes en la región	Genes relacionados con fenotipo ocular	Genes Candidatos (relacionados a distrofias retinianas o a función retiniana)
2q	233	De (bp) 167405905 - a (bp) 169771214. Del SNP rs9807964 al SNP rs10497347.	10	-	-

5p	239	De (bp) 28949 - a (bp) 2937136. Del SNP rs7704488 al SNP rs1304798.	47	SLC12A7, LPCAT1	-
7q	250	De (bp) 69805412 - a (bp) 76270576. Del SNP rs1464786 al SNP rs1799119.	108	GTF2IRD1, HIP1, POR	-

Familia 13 (RPAR 2773)

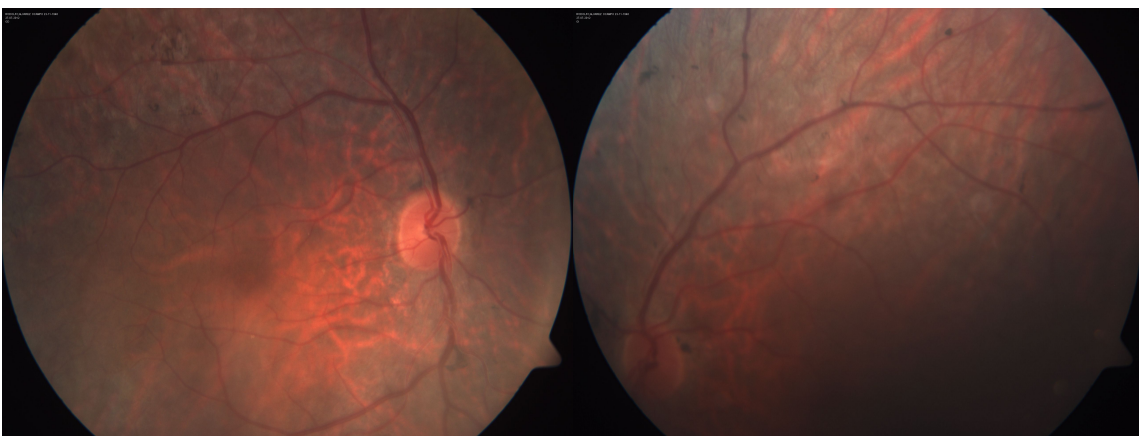
Tabla 13A – Datos Clínicos Familia 13 (RPAR 2773)

Número total de Hermanos	Numero de hermanos Afectados	Procedencia	Edad y Sexo	Diagnóstico	Manifestaciones sistémicas	Consanguinidad por árbol genealógico
10	3	Almoloya de Juárez, Edo. De México	65, Masc	Retinosis Pigmentaria Clásica	No	No
			78, Fem	Retinosis Pigmentaria Clásica	No	

Caso Índice Familia 13

Masculino de 65 años de edad quien desde 6 años atrás presenta nictalopía y disminución de agudeza visual. Desciende de padres no consanguíneos provenientes de Almoloya de Juárez, Estado de México. Tiene 7 hermanos ocularmente sanos y dos hermanas con mismo cuadro clínico ocular, más ellas iniciaron su padecimiento alrededor de la edad de 30 años. No existe ningún otro antecedente familiar sugerente de distrofia retiniana.

Tiene agudeza visual de 20/200 en ojo derecho y de 20/400 en ojo izquierdo con error refractivo de +1.50=-2.00 x 15 ojo derecho y +1.00=-1.00 x 0 ojo izquierdo. Presenta catarata subcapsular posterior 1 y nuclear 1, con pigmento en vítreo anterior. La retina presenta un moteado pálido de predominio en ecuador, así como espículas óseas en ecuador y periferia. Las arcadas vasculares se encuentran atenuadas en su calibre y la mácula de ambos ojos esta relativamente respetada. El electroretinograma presenta fases escotópica abolidas y fotópica disminuida en la amplitud de su respuesta en ambos ojos. A ambos miembros de esta familia que tuvimos oportunidad de revisar presentan un cuadro de retinosis pigmentaria clásica.

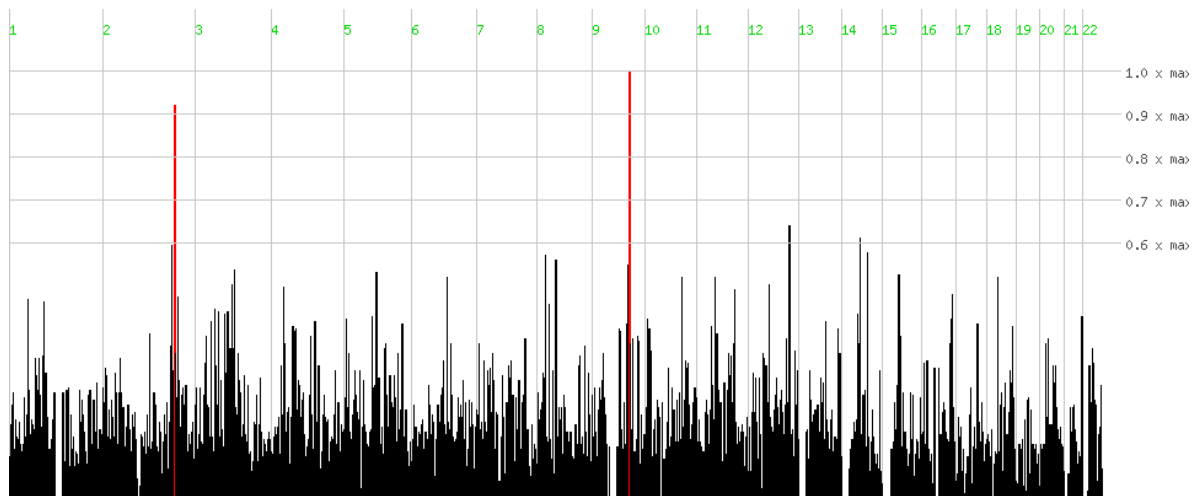


A

B

Fotos Clínicas 13 - Caso Índice familia 13: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 13



Grafica 13 – Familia 13: No se encuentran genes candidatos en las distintas regiones homocigotas.

Tabla 13B - Familia 13: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Cromosoma	Score	Intervalo Genómico	Número de genes en la región	Genes relacionados con fenotipo ocular	Genes Candidatos (relacionados a distrofias retinianas o a función retiniana)
2q	161	De (bp) 188515037 - a (bp) 190603780. Del SNP rs16829183 al	17	COL5A2, SLC40A1	-

		SNP rs1550388.			
9q	195	De (bp) 97682788 - a (bp) 99914050. Del SNP rs7029570 al SNP rs10980874.	42	PTCH1, CDC14B	-

Familia 14 (RPAR 2788)

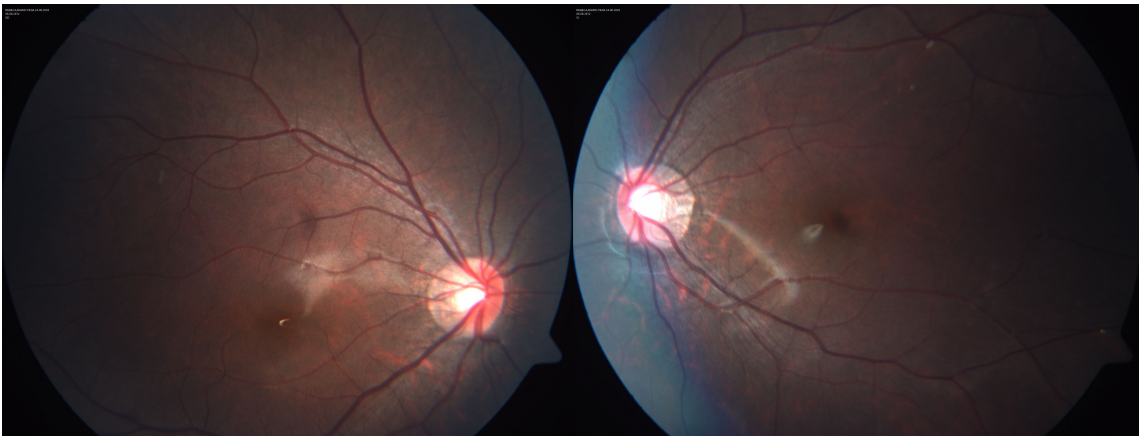
Tabla 14A – Datos Clínicos Familia 14 (RPAR 2788)

Número total de Hermanos	Numero de hermanos Afectados	Procedencia	Edad y Sexo	Diagnóstico	Manifestaciones sistémicas	Consanguinidad por árbol genealógico
5	3	Pachuca, Hidalgo	9, Fem	Amaurosis Congénita de Leber	No	No
			7, Masc	Amaurosis Congénita de Leber	No	
			6, Masc	Amaurosis Congénita de Leber	No	

Caso Índice Familia 14.

Femenino de 9 años de edad quien los padres notaron mala agudeza visual y nistagmos desde la edad de 3 meses de nacida. No existe consanguinidad de los padres los cuales son originarios de Pachuca, Estado de Hidalgo. Son 5 hermanos de los cuales 3 están afectados con la misma patología ocular desde temprana edad.

A la exploración oftalmología se pudo observar, nistagmos horizontal sin posición compensadora de la cabeza de bloqueo. Presenta capacidad visual de movimiento de manos en ambos ojos, con error refractivo aproximado de +2.00 dioptrías esféricas en ambos ojos. Clínicamente la retina se ve bastante preservada en ambos ojos, siendo visible un moteado fino en el ecuador y periferia consistente con atrofia clínica del EPR, lo cual se manifiesta con mayor claridad con la angiografía retiniana con fluoresceína. Presenta escasas espículas óseas en la periferia, y no son registrables respuestas en las distintas fases del electroretinograma. Los tres casos de esta familia presentan un cuadro clínico de amaurosis congénita de Leber.

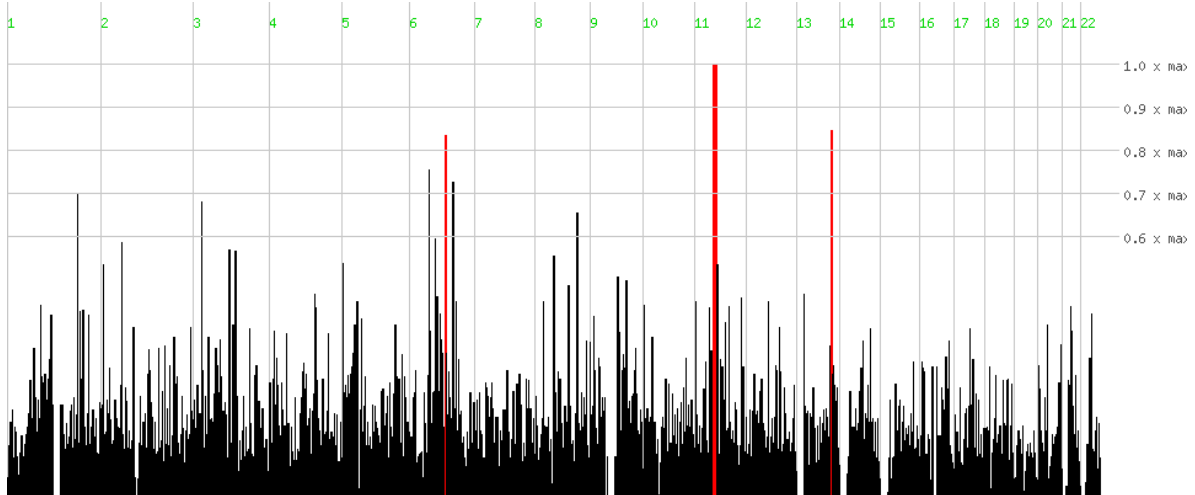


A

B

Fotos Clínicas 14 - Caso Índice familia 14: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 14



Grafica 14 – Familia 14: No se encuentran genes candidatos en las distintas regiones homocigotas.

Tabla 14B - Familia 14: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Cromosoma	Score	Intervalo Genómico	Número de genes en la región	Genes relacionados con fenotipo ocular	Genes Candidatos (relacionados a distrofias retinianas o a función retiniana)
6q	208	De (bp) 94104527 - a (bp) 96290092. Del SNP rs549965	5	-	-

		al SNP rs4557527.			
11q	250	De (bp) 47873883 - a (bp) 57344761. Del SNP rs6485788 al SNP rs2729360.	204	-	-
13q	211	De (bp) 93319737 - a (bp) 94859263. Del SNP rs10507993 al SNP rs1581826.	3	-	-

Familia 15 (RPAR 2793)

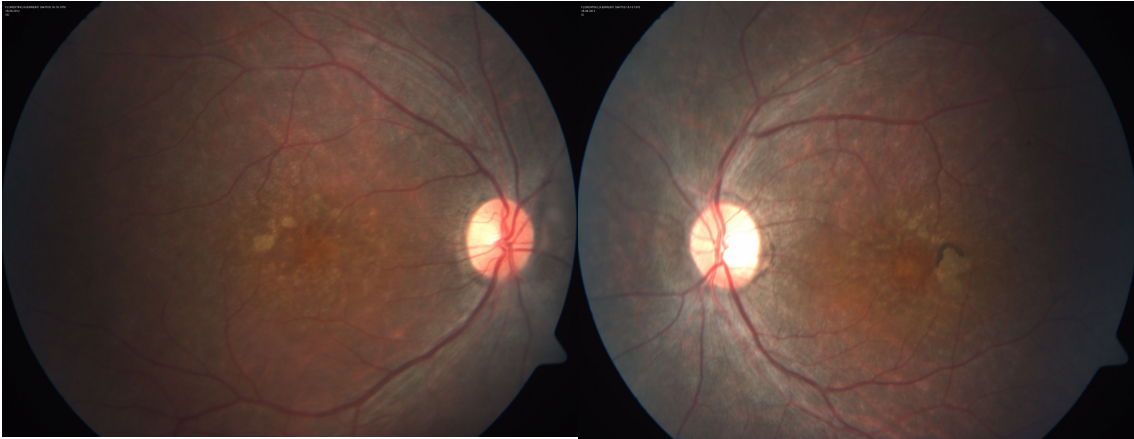
Tabla 15A – Datos Clínicos Familia 15 (RPAR 2793)

Número total de Hermanos	Numero de hermanos Afectados	Procedencia	Edad y Sexo	Diagnóstico	Manifestaciones sistémicas	Consanguinidad por árbol genealógico
9	2	Nochistlan, Oaxaca	35, Masc	Retinosis Pigmentaria Clásica	No	No.
			46, Fem	Retinosis Pigmentaria Clásica	No.	

Caso Índice Familia 15

Masculino de 35 años de edad quien inicio su sintomatología hace 5 años con nictalopía y disminución de la agudeza visual de 2 años de evolución. Proviene de Nochistlan, Estado de Oaxaca, de una familia de 9 hermanos, de los cuales una hermana y él están afectados de una distrofia retiniana. No existe consanguinidad en esta familia.

Presenta capacidad visual de 20/80 en ambos ojos sin corrección óptica. Presenta pigmento en vítreo anterior, retina con espículas óseas, dispersión de pigmento a nivel del EPR, con atrofia clínica del mismo, de predominio en ecuador y periferia, con maculopatía consistente en acumulo de pigmento, con atrofia clínica del EPR. En el electroretinograma presenta fase escotópica abolida y fotópica apenas registrable. Con estos datos se hizo un diagnóstico de retinosis pigmentaria clásica en ambos miembros afectados de esta familia.

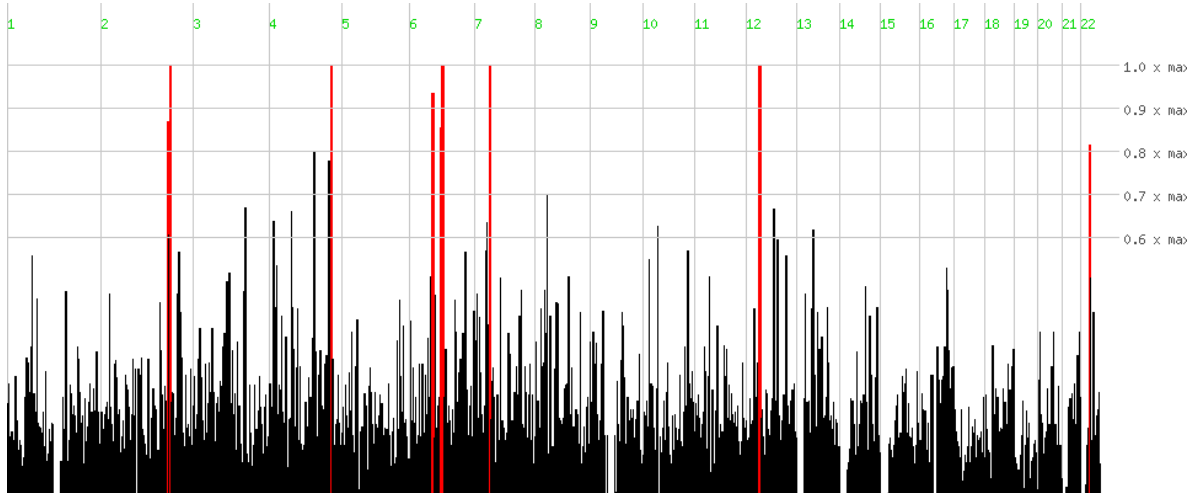


A

B

Fotos Clínicas 15 - Caso Índice familia 15: A: ojo derecho, B: Ojo izquierdo

Resultado de Mapeo por Homocigosidad Familia 15



Grafica 15 – Familia 15: No se encuentran genes candidatos en las distintas regiones homocigotas.

Tabla 15B - Familia 15: Datos del resultado del Mapeo por Homocigosidad

Cromosoma	Score	Intervalo Genómico	Número de genes en la región	Genes relacionados con fenotipo ocular	Genes Candidatos (relacionados a distrofias retinianas o a función retiniana)
2q	217	De (bp) 176017065 - a (bp) 177967165. Del SNP rs11894840 al SNP rs1444414	27	ATF2, HOXD13	-
2q	250	De (bp) 181767184 - a (bp) 184379416 Del SNP rs4666954 al SNP rs10497627	19	NEUROD1	-
4q	250	De (bp) 165307934 - a (bp) 167651241 Del SNP rs1027755 al SNP	26	-	-

		rs7658503			
6q	233	De (bp) 58702889 - a (bp) 64855302. Del SNP rs4928469 al rs9353533 SNP	17	-	-
6q	213	De (bp) 80576353 - a (bp) 82214369. Del SNP rs346305 al SNP rs1124000	9	ELOVL4	-
6q	250	De (bp) 84541953 - a (bp) 88865821. Del SNP rs1325476 al SNP rs2057276	51	-	-
7p	250	De (bp) 38051586 - a (bp) 41609934. Del SNP rs10227912 al	43	-	-

		SNP rs17704818.			
12q	250	De (bp) 33588120 - a (bp) 40849473 Del SNP rs2389198 al SNP rs3912855	23	-	-
22q	203	De (bp) 22729134 - a (bp) 26250645 Del SNP rs8136328 al SNP rs5752236.	150	SMARCB1, GGT5, ADORA2A, GGT1, CRYBB2	-

2.- Resultado de Secuenciación de Genes Candidatos

Tabla 16A – Resumen de regiones secuenciadas y resultados de la secuenciación.

Familia	Gen Candidato	Número de Exones del Gen	Exones - Intrones Secuenciados	Mutaciones o Polimorfismos encontrados
Familia 1 – RPAR 2666	USH2A	73	Exones 9, 10, 13, 18, 34, 50, 63 y 64	rs10864219
Familia 2 – RPAR 464	CEP290	54	Intrón 26	Ninguna
Familia 3 – RPAR 475	ARL6	10	Completo	Ninguna
Familia 3 – RPAR 475	MYO7A	49	Exón 20	Ninguna
Familia 7 – RPAR 2258	LRRC4C	2	Completo	Ninguna
Familia 8 – RPAR 2691	CLN3	17	Completo	c.565G>C, p.(G189R).

Una vez obtenidas mediante el análisis de ligamiento las grandes regiones homocigotas en las 15 familias con retinosis pigmentaria autosómica recesiva, se analizaron las regiones utilizando el programa <http://www.genedistiller.org>, y apoyados con la literatura médica se seleccionaron los genes candidatos para ser secuenciados. En los casos donde los genes/transcritos fueron muy extensos se hizo una nueva selección de aquellos exones o regiones de dicho gen donde se hayan reportado en la literatura las mutaciones más frecuentes, y en dichos genes se secuenciaron exclusivamente estas regiones.

En 5 de 15 familias pudimos seleccionar genes candidatos a secuenciar. En el análisis de secuenciación pudimos encontrar en la Familia 1 – RPAR 2666 un polimorfismo (rs10864219) en el exón 34 del gen USH2A, el cual ya había sido previamente reportado en la literatura y considerado no patogénico.

En la Familia 8 – RPAR 2691 se identificó en el gen CLN3 en su exón 10 una mutación HOMOCIGOTA nueva en la base 565 presentando un cambio en sentido equivocado de una guanina por una citosina cambiando el aminoácido 189 de una Glicina por una Arginina. En el análisis *in silico* de esta mutación se pudo predecir que el alelo está dañado y afecta un aminoácido conservado y se predice que la función de la proteína se encuentra alterada. Este hallazgo fue publicado en un artículo médico en Hum Genet (2014) 133:331–45 (69).

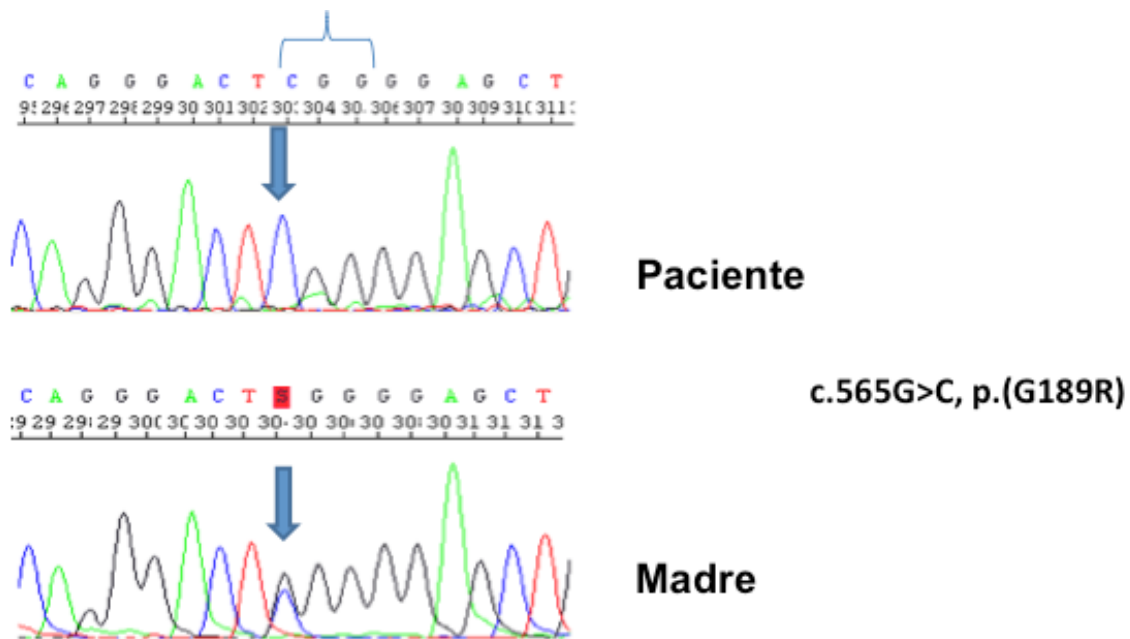


Figura 9: Imagen del resultado de secuenciación de la familia RPAR 2691: Arriba: mutación nueva homocigota c.565G>C, p.(G189R) en el paciente afectado Abajo: imagen de un portador obligado (Madre) con la misma mutación en un solo alelo (heterocigoto).

III.- Discusión.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la utilidad del abordaje de mapeo de homocigosidad a genoma completo para la identificación de los genes mutantes responsables de distrofias retinianas en una muestra de pacientes Mexicanos. Se incluyeron un total de 15 familias, que corresponde a la serie de casos más grande de pacientes analizados con el método de análisis de homocigosidad por ligamiento de SNP's en población Mexicana,. Zenteno et al. (67, 68, 69, 70), han demostrado la utilidad de este método para identificar mutaciones en familias Mexicanas con patrón de herencia autosómica recesiva y padecimientos genéticos oftalmológicos. Este tipo de estudios con utilidad ampliamente demostrada en la literatura médica, son de suma importancia para conocer su utilidad específica en nuestra población.

El método de análisis ligamiento de homocigosidad por SNP's, para identificar mutaciones en pacientes con distrofias retinianas, tiene una eficacia en la literatura internacional de entre 12.8% a 66.6% (71, 72). En nuestro estudio encontramos una mutación homocigota en 1 de 15 casos (6.66%), lo cual esta por abajo del promedio de identificación de mutaciones de lo reportado en otros estudios.

El bajo porcentaje de identificación de mutaciones en este estudio se puede deber en parte a que las mutaciones causales podrían estar alojadas en la regiones no secuenciadas de los genes candidatos de gran tamaño que identificamos (MYO7, CEP290 y USH2A). Debido al gran tamaño de estos genes, decidimos analizar mediante secuenciación directa de Sanger solo porciones de estos genes, específicamente aquellas regiones donde se han localizado mutaciones con mayor frecuencia en la literatura médica. Aun cuando no detectamos mutaciones causales en estas porciones seleccionadas de estos genes de gran tamaño, no podemos categóricamente descartar que en ellos no estén localizadas las mutaciones causantes de enfermedad.

Otra probable explicación para la baja frecuencia de mutaciones en nuestro estudio es el que en nuestra población existan muchos casos de retinosis pigmentaria

autosómica recesiva por heterocigosidad compuesta. Heterocigosidad compuesta en genética médica es la condición de tener dos alelos con mutaciones distintas en cada alelo en un mismo locus, que pueden causar enfermedad genética en un estado heterocigótico. Es decir, un organismo es un heterocigoto compuesto si tiene dos alelos con mutaciones recesivas para el mismo gen, pero los dos alelos tiene diferentes mutaciones el uno del otro. Esto significa que muchos casos de enfermedad surgen en individuos que tienen dos alelos no relacionados, que técnicamente son heterocigotos, pero ambos alelos son defectuosos. Casos de heterocigosidad compuesta pueden ocurrir aun en familias consanguíneas. En México se han realizado muy pocos estudios de genotipificación por lo cual carecemos de información amplia de cuales son las mutaciones existentes causales de enfermedad. Casos con heterocigosidad compuesta en población Mexicana con distrofias retinianas han sido documentados en diversos estudios realizados en la unidad de investigación del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana (69, 70, 81). En los casos de heterocigosidad compuesta el análisis de ligamiento por homocigosidad en las distrofias retinianas carece de utilidad lo cual ha sido reconocido en estudios previos (73, 74, 75) ya que no puede identificar grandes fragmentos homocigotos donde se encuentra el gen con las dos mutaciones distintas, ya que los haplotipos vienen de distintas líneas familiares y por lo tanto algunos de los SNP's que acompañan los distintos alelos mutados pueden presentarse de manera heterocigota.

Una probable causa adicional a las ya expuestas en esta discusión que podría explicar la baja detección de mutaciones en este estudio, es que las mutaciones causantes de enfermedad en las familias estudiadas en este trabajo se encuentren localizadas en genes no conocidos. Es probable que en las grandes porciones homocigotas que identificamos en estas familias se encuentren genes aun no conocidos o genes ya identificados pero en los que aun no se han documentado mutaciones que causen distrofias retinianas. En casos como éstos, de genes no conocidos o conocidos pero no asociados a la enfermedad que se busca, el estudio de ligamiento por homocigosidad con SNP's tiene una utilidad, pero limitada, ya que es capaz de ligar una gran región

homocigota donde podría estar el gen mutado, sin embargo al no tener conocimiento previo de este gen, se dificulta el poder seleccionarlo como gen candidato para secuenciarlo con el método de Sanger. Sin embargo este mismo argumento es una razón más por lo cual es importante realizar estudios de ligamiento como el presentado en este trabajo de tesis, ya que con estos estudios se puede ir delimitando/ligando zonas donde pueden estar alojados genes no conocidos.

Teniendo esta información en cuenta, las tecnologías de secuenciación de siguiente generación podrían mostrar su utilidad para poder responder los cuestionamientos formulados en este trabajo, en relación a los motivos del bajo porcentaje de identificación de mutaciones. El método de análisis de ligamiento por homocigosidad con SNP's, al mostrar su baja eficacia en esta muestra de población Mexicana, abre el camino al siguiente paso que es la utilización de tecnologías de secuenciación masiva. Al ir conociendo la utilidad específica de los distintos métodos de genotipificación en nuestra población, se puede ir justificando la búsqueda de recursos y financiamiento para poder adquirir nuevas tecnologías que nos permitan responder nuestras preguntas de investigación. Además será interesante conocer la utilidad de la combinación de tecnologías como está, de análisis por homocigosidad con SNP's y la secuenciación de siguiente generación, ya que podremos secuenciar solo los fragmentos homocigotos encontrados, y así identificar mutaciones en porciones muy delimitadas de todo el genoma, lo cual sería más económico que secuenciar el genoma completo de un individuo.

En nuestro estudio, el único caso (RPAR 2691) donde fue posible localizar una mutación causal, fue en una paciente con distrofia retiniana no familiar y antecedente de padres consanguíneos. En este caso, se detectó una mutación en el gen CLN3 (Ceroid-lipofuscinosis, neuronal 3). Este gen localizado en el cromosoma 16 tiene 41 transcritos, siendo su transcrito más grande de una longitud de 428 aminoácidos (2374pb) (76). Mutaciones en este gen se sabe pueden causar un grupo de trastornos neurodegenerativos, caracterizados por la acumulación de lipopigmento (lipofuscinosis)

en distintos tipos de células. El cuadro clínico incluye demencia progresiva, convulsiones y pérdida visual progresiva. Las mutaciones en CLN3 clásicamente causan un cuadro neurodegenerativo de lipofuscinosis ceroides neuronal de presentación temprana (juvenil), entre la edad de 4 y 10 años, también llamado síndrome de Batten (77). Usualmente el déficit visual es rápidamente precedido de un deterioro cognitivo, presentando la mayoría de los pacientes problemas del comportamiento como arrebatos de enojo, violencia física y depresión. Igualmente presentan desorientación, problemas de memoria y movimientos finos torpes e hipotonía muscular, comúnmente antes de la edad de 11 años (77). Usualmente estos pacientes con síndrome de Batten no viven más de la edad de 40 años, aunque algunos casos han sobrevivido hasta una edad mayor de 50 años (78).

Esta paciente RPAR 2691 con la mutación en CLN3, hasta el momento no ha presentado datos degenerativos neuronales a una edad de 11 años, ya sea cognitivos, musculares o del comportamiento, datos muy característicos y usualmente de presentación temprana en el síndrome de Batten. Si bien ha presentado en una ocasión una convulsión tónico-clónica, hasta el momento no se ha podido integrar el diagnóstico de síndrome de Batten, por lo cual se ha clasificado con un diagnóstico de retinosis pigmentaria de inicio temprano no sindrómica. Si bien aun no se puede descartar que en el futuro desarrolle un cuadro degenerativo, creemos posible que pueda tratarse de un cuadro de RP aislado.

Los hallazgos de esta mutación homocigota en CLN3 encontrada en este trabajo de tesis, fueron publicados en un artículo médico (65), junto con la información de material no perteneciente a este estudio, de otros casos de mutaciones en CLN3 sin cuadro clínico de síndrome de Batten. Dentro de este material publicado en dicho artículo está el caso aislado de una mujer mexicana de 57 años con una mutación heterocigota compuesta en CLN3 con retinosis pigmentaria aislada, al igual que otros dos casos familiares no mexicanos con mutaciones de CLN3 (una familia con mutación homocigota y otra más heterocigota compuesta) y edad avanzada (entre 40 y 60 años) que solamente presentaban distrofias retinianas sin enfermedad neurodegenerativa. Estos resultados

indican por primera vez que mutaciones en CLN3 pueden llevar a una degeneración retiniana no sindrómica y establece a CLN3 como un nuevo gen causante de RP aislada. Esta información, junto con el seguimiento dado a esta paciente RPAR 2691, estudiada en este trabajo de tesis por casi 3 años sin evidencia de deterioro neuronal, apoyan nuestra idea de que se trate de un caso aislado de RP lo cual implica un pronóstico más favorable.

Esta no es la primera vez que un gen "sindrómico" ha sido reclasificado posteriormente como causante de enfermedades retinianas aisladas. CLN3 ahora se une a una creciente lista de este tipo de genes. Otros ejemplos incluyen el gen BBS1 que puede causar síndrome de Bardet-Biedl o RP no sindrómica cuando está mutado (66) y CEP290, que puede causar síndrome de Joubert o amaurosis congénita de Leber aislada (79). Este fenómeno nuevo extiende nuestro entendimiento de las correlaciones genotipo-fenotipo. Cómo un gen mutado puede causar un síndrome extenso y complejo en un paciente y RP aislada en otro, no es algo totalmente entendido en la actualidad, pero se ha postulado que puede ser el resultado de una interacción compleja entre modificadores genéticos y diferencias ambientales (80).

En resumen aportamos información de una utilidad más limitada del estudio de análisis de ligamiento por homocigosidad con SNP's cuando se utiliza en población mexicana en comparación con otras poblaciones que muestran una eficacia mayor de este método en la detección de mutaciones. También se aporta con estos resultados a la información molecular de las mutaciones en CLN3 así como al mejoramiento de la exactitud de los diagnósticos y por lo tanto de los pronósticos en los pacientes portadores de mutaciones causales de enfermedad en este gen.

IV.- Referencias.

- 1.- Fine BS, Yanoff M. Ocular histology. A text and atlas. New York: Harper & Row; 1976: 111 - 24.
- 2.- Krebs W, Krebs I. Quantitative morphology of the central fovea in the primate retina. *Am J Anat.* 1989; 184: 225-36.
- 3.- Spitznas M. Anatomical features of the human macula. In: IÉsperance FA, ed. *Current diagnosis and management of retinal disorders.* St Louis: CV Mosby; 1977.
- 4.- Friedman NJ, Káiser PK, Trattler WB. *Review of Ophthalmology.* Edinburgh; New York, NY: Elsevier Saunders; 2006: 295-353.
- 5.- Yanoff M, Duker JJ. *Ophthalmology. Second Edition.* St Louis: Mosby; 2004: 771-782.
- 6.- Mann I. *The development of the human eye.* New York: Grune & Stratton; 1950: 1-45.
- 7.- Ryan S. *Retina. Fifth Edition.* New York, NY: Elsevier Mosby; 2013: 330-482.
- 8.- Rea MS, Figueiro MG, Bullough JD, Bierman A. A model of phototransduction by the human Circadian system. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005; 50: 213-28.
- 9.- Douglas R. Circadian Biology: The Physiology of Inner Retinal Photoreceptors. *Curr Biol.* 2003; 13: R667-9.
- 10.- Dacey DM. Primate Retina: Cell Types, Circuits and Color Opponency. *Prog Retin Eye Res.* 1999;18: 737-63.
- 11.- Vaney DI, Taylor WR. Direction Selectivity in the Retina. *Curr Opin Neurobiol.* 2002; 12: 405-10.
- 12.- Masland RH. Sensory Systems: Fine-Tuning the Visual Scene. *Curr Biol.* 2005; 15: R808-10.
- 13.- Masland RH. Neural diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol.* 2001; 11: 431-36.
- 14.- Choi SY, Sheng Z, Kramer RH. Imaging light-modulated release of synaptic vesicles in the intact retina: Retinal physiology at the dawn of the post-electrode era. *Vision Res.* 2005; 45: 3487-95.
- 15.- Gallermore RP et al. Retinal Pigment Epithelial Transport Mechanisms and Their Contributions to the Electroretinogram. *Prog Retin Eye Res.* 1997; 16: 509-66.

- 16.- Wimmers S, Karl MO, Strauss O. Ion channels in the RPE. *Prog Retin Eye Res.* 2007; 26: 263-301.
- 17.- Jiménez-Sierra JM, Ogden T, Van Boemel G. *Inherited Retinal Diseases: A diagnostic Guide.* St. Louis: Mosby; 1989: 30-88.
- 18.- Berger W, Kloeckener-Gruissem B, Neidhardt J. The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2010; 29: 335–75.
- 19.- RetNet. The Retinal Information Network 2013. Retrieved from <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/>. Revisado en Nov 2013.
- 20.- C. Hamel. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis.* 2006; 1: 40.
- 21.- Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet.* 2006; 368: 1795–1809.
- 22.- Chang S, Vaccarella L, Olatunji S, Cebulla C, Christoforidis J. Diagnostic challenges in retinitis pigmentosa: Genotypic multiplicity and phenotypic variability. *Curr Genomics.* 2011; 12: 267–75.
- 23.- Chizzolini M, Galan A, Milan E, Sebastiani A, Costagliola C, Parmeggiani F. Good epidemiologic practice in retinitis pigmentosa: From phenotyping to biobanking. *Curr Genomics.* 2011; 12: 260-66.
- 24.- Collin RW, Safieh C, Littink KW, Shalev SA, Garzozi HJ, Rizel L, Abbasi AH, Cremers FP, den Hollander AI, Klevering BJ, Ben-Yosef T. Mutations in C2ORF71 cause autosomal-recessive retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet.* 2010; 86: 783-88.
- 25.- Bessant DA, Ali RR, Bhattacharya SS. Molecular genetics and prospects for therapy of the inherited retinal dystrophies. *Curr Opin Genet Dev.* 2001; 11: 307-16.
- 26.- Zhang S, Wu J, Wu X, Xu P, Tian Y, Yi M, Liu X, Dong X, Wolf F, Li C, Huang Q. Enhancement of rAAV2-mediated transgene expression in retina cells in vitro and in vivo by coadministration of low-dose chemotherapeutic drugs. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012; 53: 2675-84.
- 27.- Allocca M, Manfredi A, Iodice C, Di Vicino U, Auricchio A. AAV-mediated gene replacement, either alone or in combination with physical and pharmacological agents, results in partial and transient protection from photoreceptor degeneration associated with betaPDE deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52: 5713-19.

- 28.- 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.* 2012; 130: 9-24.
- 29.- Pang JJ, Dai X, Boye SE, Barone I, Boye SL, Mao S, Everhart D, Dinculescu A, Liu L, Umino Y, Lei B, Chang B, Barlow R, Strettoi E, Hauswirth WW.. Long-term retinal function and structure rescue using capsid mutant AAV8 vector in the rd10 mouse, a model of recessive retinitis pigmentosa. *Mol Ther.* 2011; 19: 234-42.
- 30.- MacLaren RE, Pearson RA, MacNeil A, Douglas RH, Salt TE, Akimoto M, Swaroop A, Sowden JC, Ali RR. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature.* 2006; 444: 203-07.
- 31.- West EL, Gonzalez-Cordero A, Hippert C, Osakada F, Martinez-Barbera JP, Pearson RA, Sowden JC, Takahashi M, Ali RR. Defining the integration capacity of ES cell-derived photoreceptor precursors. *Stem Cells.* 2012; 30: 1424-35.
- 32.- Barry MP, Dagnelie G; Argus II Study Group. Use of the Argus II retinal prosthesis to improve visual guidance of fine hand movements. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012; 53: 5095-101.
- 33.- Zrenner E, Bartz-Schmidt KU, Benav H, Besch D, Bruckmann A, Gabel VP, Gekeler F, Greppmaier U, Harscher A, Kibbel S, Koch J, Kusnyerik A, Peters T, Stingl K, Sachs H, Stett A, Szurman P, Wilhelm B, Wilke R. Subretinal electronic chips allow blind patients to read letters and combine them to words. *Proc Biol Sci.* 2011; 278: 1489-97.
- 34.- Audo I, Bujakowska KM, Léveillard T, Mohand-Saïd 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.* 2012; 7: 8.
- 35.- den Hollander AI, van Lith-Verhoeven JJ, Arends ML, Strom TM, Cremers FP, Hoyng CB. Novel compound heterozygous TULP1 mutations in a family with severe early-onset retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol.* 2007; 125: 932-35.
- 35.- Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol.* 2007; 125: 151-58.

- 36.- Musarella MA, Macdonald IM. Current concepts in the treatment of retinitis pigmentosa. *J Ophthalmol*. 2011; Article ID 753547: 8 pages.
- 37.- Ferrari S, Di Iorio E, Barbaro V, Ponzin D, Sorrentino FS, Parmeggiani F. Retinitis pigmentosa: Genes and disease mechanisms. *Curr Genomics*. 2011; 12: 238-49.
- 38.- Williams DS. Usher syndrome: Animal models, retinal function of Usher proteins, and prospects for gene therapy. *Vision Res*. 2008; 48: 433-41.
- 39.- 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*. 1999; 36: 437-46.
- 40.- The Human Gene Mutation Database. <http://www.hgmd.org>. Revisado en Enero 2014.
- 41.- Daiger SP, Sullivan LS, Bowne SJ. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Clin Genet* 2013; 84: 132–41.
- 42.- Koenekoop RK, Lopez I, den Hollander AI, Allikmets R, Cremers FP. Genetic testing for retinal dystrophies and dysfunctions: benefits, dilemmas and solutions. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2007; 35: 473-85.
- 43.- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74: 5463-67.
- 44.- Metzker ML. Sequencing technologies – The next generation. *Nat Rev Genet*. 2010; 11: 31-46.
- 45.- Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*. 2008; 26: 1135-45.
- 46.- Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet*. 2011; 52: 413-35.
- 47.- Bowne SJ, Sullivan LS, Koboldt DC, Ding L, Fulton R, Abbott RM, Sodergren EJ, Birch DG, Wheaton DH, Heckenlively JR, Liu Q, Pierce EA, Weinstock GM, Daiger SP. Identification of disease-causing mutations in autosomal dominant retinitis pigmentosa (adRP) using next-generation DNA sequencing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52: 494-503.

- 48.- Glockle N, Kohl S, Mohr J et al. Panel-based next generation sequencing as a reliable and efficient technique to detect mutations in unselected patients with retinal dystrophies. *Eur J Hum Genet.* 2014; 22: 99-104.
- 49.- Neveling K, Collin RW, Gilissen C et al. Next-generation genetic testing for retinitis pigmentosa. *Hum Mutat* 2012; 33: 963–72.
- 50.- O’Sullivan J, Mullaney BG, Bhaskar SS et al. A paradigm shift in the delivery of services for diagnosis of inherited retinal disease. *J Med Genet.* 2012; 49: 322–26.
- 51.- Shanks ME, Downes SM, Copley RR et al. Next-generation sequencing (NGS) as a diagnostic tool for retinal degeneration reveals a much higher detection rate in early-onset disease. *Eur J Hum Genet.* 2013; 21: 274–80.
- 52.- Sato-Otsubo A, Sanada M, Ogawa S. Single-nucleotide polymorphism array karyotyping in clinical practice: Where, when, and how?. *Semin Oncol.* 2012; 39: 13-25.
- 53.- Tucker T, Schlade-Bartusiak K, Eydoux P, Nelson TN, Brown L. Uniparental disomy: Can SNP array data be used for diagnosis?. *Genet Med.* 2012; 14: 753-56.
- 54.- Bibikova M, Lin Z, Zhou L, Chudin E, Garcia EW, Wu B, Doucet D, Thomas NJ, Wang Y, Vollmer E, Goldmann T, Seifart C, Jiang W, Barker DL, Chee MS, Floros J, Fan JB. High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res.* 2006; 16: 383-93.
- 55.- Lin M, Wei LJ, Sellers WR, Lieberfarb M, Wong WH, Li C. DChipSNP: Significance curve and clustering of SNP-array-based loss-of-heterozygosity data. *Bioinformatics.* 2004; 20: 1233-40.
- 56.- Piñeiro-Gallego T, Álvarez M, Pereiro I, Campos S, Sharon D, Schatz P, Valverde D. Clinical evaluation of two consanguineous families with homozygous mutations in BEST1. *Mol Vis.* 2011; 17: 1607-17.
- 57.- Hoffmann TJ, Kvale MN, Hesselton SE, Zhan Y, Aquino C, Cao Y, Cawley S, Chung E, Connell S, Eshragh J, Ewing M, Gollub J, Henderson M, Hubbell E, Iribarren C, Kaufman J, Lao RZ, Lu Y, Ludwig D, Mathauda GK, McGuire W, Mei G, Miles S, Purdy MM, Quesenberry C, Ranatunga D, Rowell S, Sadler M, Shapero MH, Shen L, Shenoy TR, Smethurst D, Van den Eeden SK, Walter L, Wan E, Wearley R, Webster T, Wen CC, Weng L, Whitmer RA, Williams A, Wong SC, Zau C, Finn A, Schaefer C, Kwok PY, Risch N. Next generation genome-wide association tool: Design and coverage of a high-throughput European-optimized SNP array. *Genomics.* 2011; 98: 79-89.

- 58.- Duggal P, Ibay G, Klein AP. Current gene discovery strategies for ocular conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52: 7761-70.
- 59.- Krjutskov K, Andreson R, Mägi R, Nikopensus T, Khrunin A, Mihailov E, Tammekivi V, Sork H, Remm M, Metspalu A. Development of a single tube 640-plex genotyping method for detection of nucleic acid variations on microarrays. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36: e75.
- 60.- Dev Borman A, Ocaka LA, Mackay DS, Ripamonti C, Henderson RH, Moradi P, Hall G, Black GC, Robson AG, Holder GE, Webster AR, Fitzke F, Stockman A, Moore AT. Early onset retinal dystrophy due to mutations in LRAT – Molecular analysis and detailed phenotypic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53: 3927-38.
- 61.- Pulst SM. Genetic Linkage Analysis. *Arch Neurol*. 1999; 56: 667-72.
- 62.- Vardhanabhuti S, Blakemore SJ, Clark SM, Ghosh S, Stephens RJ, Rajagopalan D. A comparison of statistical tests for detecting differential expression using Affymetrix oligonucleotide microarrays. *OMICS*. 2006; 10: 555-66.
- 63.- Seelow D, Schuelke M, Hildebrandt F, Nürnberg P. HomozygosityMapper—an interactive approach to homozygosity mapping. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37: W593-9.
- 64.- Corton M, Avila-Fernandez A, Vallespín E et al. Involvement of LCA5 in Leber Congenital Amaurosis and Retinitis Pigmentosa in the Spanish Population. *Ophthalmology*. 2014; 121: 399-407.
- 65.- Goldenberg-Cohen N, Banin E, Zalstein Y, Cohen B, Rotenstreich Y, Rizel L, Basel-Vanagaite L, Ben-Yosef T. Genetic heterogeneity and consanguinity lead to a "double hit": homozygous mutations of MYO7A and PDE6B in a patient with retinitis pigmentosa. *Mol Vis*. 2013; 19: 1565-71.
- 66.- 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*. 2012; 130: 1425–32.
- 67.- Zenteno JC, Buentello-Volante B, Ayala-Ramirez R, Villanueva-Mendoza C. Homozygosity mapping identifies the Crumbs homologue 1 (Crb1) gene as responsible for a recessive syndrome of retinitis pigmentosa and nanophthalmos. *Am J Med Genet A*. 2011; 155A: 1001-06.

- 68.- Ali M, Buentello-Volante B, McKibbin M, Rocha-Medina JA, Fernandez-Fuentes N, Koga-Nakamura W, Ashiq A, Khan K, Booth AP, Williams G, Raashid Y, Jafri H, Rice A, Inglehearn CF, Zenteno JC. Homozygous FOXE3 mutations cause non-syndromic, bilateral, total sclerocornea, aphakia, microphthalmia and optic disc coloboma. *Mol Vis*. 2010; 16: 1162-68.
- 69.- Wang F, Wang H, Tuan HF, Nguyen DH, Sun V, Keser V, Bowne SJ, Sullivan LS, Luo H, Zhao L, Wang X, Zaneveld JE, Salvo JS, Siddiqui S, Mao L, Wheaton DK, Birch DG, Branham KE, Heckenlively JR, Wen C, Flagg K, Ferreyra H, Pei J, Khan A, Ren H, Wang K, Lopez I, Qamar R, Zenteno JC, Ayala-Ramirez R, Buentello-Volante B, Fu Q, Simpson DA, Li Y, Sui R, Silvestri G, Daiger SP, Koenekoop RK, Zhang K, Chen R. Next generation sequencing-based molecular diagnosis of retinitis pigmentosa: identification of a novel genotype-phenotype correlation and clinical refinements. *Hum Genet*. 2014; 133: 331-45.
- 70.- Chacon-Camacho OF, Jitskii S, Buentello-Volante B, Quevedo-Martinez J, Zenteno JC. Exome sequencing identifies RDH12 compound heterozygous mutations in a family with severe retinitis pigmentosa. *Gene*. 2013; 528: 178-82.
- 71.- Beryozkin A, Zelinger L, Bandah-Rozenfeld D, Shevach E, Harel A, Storm T, Sagi M, Eli D, Merin S, Banin E, Sharon D. Identification of mutations causing inherited retinal degenerations in the israeli and palestinian populations using homozygosity mapping. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014; 55: 1149-60.
- 72.- Bocquet B, Marzouka NA, Hebrard M, Manes G, Sénéchal A, Meunier I, Hamel CP. Homozygosity mapping in autosomal recessive retinitis pigmentosa families detects novel mutations. *Mol Vis*. 2013; 19: 2487-500.
- 73.- Benayoun L, Spiegel R, Auslender N, Abbasi AH, Rizel L, Hujeirat Y, Salama I, Garzoni HJ, Allon-Shalev S, Ben-Yosef T. Genetic heterogeneity in two consanguineous families segregating early onset retinal degeneration: the pitfalls of homozygosity mapping. *Am J Med Genet A*. 2009; 149A: 650-56.
- 74.- Ducroq D, Shalev S, Habib A, Munnich A, Kaplan J, Rozet JM. Three different ABCA4 mutations in the same large family with several consanguineous loops affected with autosomal recessive cone-rod dystrophy. *Eur J Hum Genet*. 2006; 14: 1269-73.
- 75.- Miano MG, Jacobson SG, Carothers A, Hanson I, Teague P, Lovell J, Cideciyan AV, Haider N, Stone EM, Sheffield VC, Wright AF. Pitfalls in homozygosity mapping. *Am J Hum Genet*. 2000; 67: 1348-51.

- 76.- Lerner TJ, Boustany RM, MacCormack K, Gleitsman J, Schlumpf K, Breakefield XO, Gusella JF, Haines JL. Linkage disequilibrium between the juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis gene and marker loci on chromosome 16p12.1. *Am J Hum Genet.* 1994; 54: 88-94.
- 77.- Boustany, RM. Neurology of the neuronal ceroid-lipofuscinoses: late infantile and juvenile types. *Am J Med Genet.* 1992; 42: 533-35.
- 78.- Sarpong A, Schottmann G, Rütger K, Stoltenburg G, Kohlschütter A, Hübner C, Schuelke M. Protracted course of juvenile ceroid lipofuscinosis associated with a novel CLN3 mutation (p.Y199X). *Clin Genet.* 2009; 76: 38-45.
- 79.- 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.* 2006; 79: 556–61
- 80.- Wang X, Wang H, Cao M, Li Z, Chen X, Patenia C, Gore A, Abboud EB, Al-Rajhi AA, Lewis RA, Lupski JR, Mardon G, Zhang K, Muzny D, Gibbs RA, Chen R. Whole-exome sequencing identifies ALMS1, IQCB1, CNGA3, and MYO7A mutations in patients with Leber congenital amaurosis. *Hum Mutat.* 2011; 32: 1450–59.
- 81.- Chacón-Camacho OF, Granillo-Alvarez M, Ayala-Ramírez R, Zenteno JC. ABCA4 mutational spectrum in Mexican patients with Stargardt disease: Identification of 12 novel mutations and evidence of a founder effect for the common p.A1773V mutation. *Exp Eye Res.* 2013; 109: 77-82.