

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Facultad de Medicina

División de Estudios de Posgrado



Departamento de Genética

TESIS DE POSGRADO

Para obtener la especialidad en Oftalmología

**“Caracterización molecular en pacientes mexicanos con Amaurosis Congénita de Leber y Distrofias Retinianas de inicio Temprano”**

Autora: Dra. Blanca Celia Flores Sánchez

Asesora: Dra. Cristina Villanueva Mendoza



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

# JURADO

---

DRA. CRISTINA VILLANUEVA MENDOZA

PRESIDENTE

---

DR. ABELARDO A. RODRÍGUEZ REYES

SECRETARIO

---

DR. MARCO PEDRO HERNÁNDEZ ÁBREGO

VOCAL

---

DR. DANIEL OCHOA CONTRERAS

VOCAL

---

DR. RAFAEL CASTAÑEDA DIEZ

VOCAL

## ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
3. MARCO TEÓRICO.....	4
4. OBJETIVOS.....	10
5. HIPÓTESIS.....	10
6. JUSTIFICACIÓN.....	10
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
8. RESULTADOS.....	13
9. DISCUSIÓN.....	18
10. CONCLUSIONES.....	19
11. ANEXOS.....	20
12. BIBLIOGRAFÍA.....	23

## 1. INTRODUCCIÓN

La Amaurosis Congénita de Leber (ACL) es un grupo de distrofias retinianas con herencia autosómica recesiva (AR) en la mayoría de los casos, definida y unificada por el inicio de ceguera o déficit visual severo al nacimiento y ausencia de señales eléctricas en el electroretinograma (ERG). Es una entidad rara, pero es la causa más común de ceguera infantil en escuelas para ciegos y se estima que 200 000 humanos son afectados alrededor del mundo.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Se podrán identificar genes antes no descritos en pacientes mexicanos con Amaurosis Congénita de Leber y Distrofias Retinianas de Inicio Temprano?

## 3. MARCO TEÓRICO

A la fecha, 15 genes conocidos se han asociado con ACL y las mutaciones en estos genes explican el 60% de los casos. Los 15 genes codifican proteínas de retina que participan en una amplia variedad de ciclos retinianos y funciones, incluyendo desarrollo retiniano (*CRB1*, *CRX*), fototransducción (*GUCY2D*, *AIPL1*), metabolismo de vitamina A (*RPE65*, *LRAT*, *RDH12*) y formación y función ciliares (*CEP290*, *TULP*, *RPGRIP1*, *LCA5*). Además, la función de *RD3* aun no se conoce.<sup>1</sup>

La ACL comparte muchas características clínicas con otras distrofias de retina, como la Retinitis Pigmentosa (RP). La RP juvenil, a diferencia de la ACL, tiene inicialmente un fenotipo menos agresivo. Dada la sobreposición clínica de estas entidades se espera que sean causadas en algunos casos por mutaciones en los mismos genes. De hecho, al menos 7 de los genes causantes de ACL incluyendo *CRX*, *CRB1*, *RPE65*, *RDH12*, *LRAT*, *MERTK* y *TULP1* han sido ligadas a RP juvenil en otras familias. De forma similar, mutaciones en genes de ACL también pueden estar asociadas a otras enfermedades retinianas, tales como distrofia cono-bastón (*CRX*, *AIPL1* y *GUCY2D*), y con enfermedades sistémicas tales como el síndrome de Joubert, el síndrome de Meckel y el síndrome de Bardet-Biedl (*CEP290*).<sup>1</sup>

Recientemente se han encontrado mutaciones en el gen *IQCB1* como causantes de ACL. Este gen se encuentra localizado en el cromosoma 3 y está asociado al síndrome de Senior-Loken, el cual se caracteriza por nefronoptosis y degeneración retiniana. Hasta el momento los pacientes con ACL tienen una función renal adecuada, sin embargo podría haber un riesgo elevado de falla renal en base a estos hallazgos.<sup>2</sup>

Además de los 15 genes de ACL, 2 loci genéticos (*LCA3* en 14q24 y *LCA9* en 1p36) han sido identificados pero los genes subyacentes permanecen desconocidos. Mutaciones en *RPE65* y *LRAT* causan aproximadamente el 10% de todos los casos de ACL.<sup>1</sup>

### **Características fenotípicas** <sup>3,4,5</sup>

- **Función visual y evolución.** La agudeza visual en los pacientes varía de 20/200 a no percepción de luz. Agudezas visuales de 20/50 se han descrito en pacientes con mutaciones en *CRB1*, *LRAT* y *RPE65*. La mayoría de los pacientes con ACL tiene función visual estable o relativamente estable pero algunos progresan y pierden agudeza visual, mientras que rara vez presentan mejoría. Pacientes con mutaciones en *CEP290* y *GUCY2D* parecen tener pérdida visual muy significativa pero permanecen estables después; pacientes con mutaciones en *AIPL1* y *RPGRIP1* tienen pérdida de agudeza visual progresiva. El resultado visual es distinto y clínicamente reconocible en pacientes con mutaciones en *RPE65* y *GUCY2D*. El primer grupo se caracteriza por agudezas medibles y nictalopia, mientras que el segundo se caracteriza por mala agudeza visual, fotofobia y falta de nictalopia.
- **Variabilidad fenotípica.** La apariencia de la retina varía considerablemente desde una apariencia normal hasta atenuación vascular leve, pseudopapiledema del nervio óptico, maculopatía, coloboma macular, pigmentación en forma de espículas óseas, pigmentación numular, pigmentación en sal y pimienta, puntos amarillentos periféricos confluentes, puntos blancos, cambios retinianos marmóreos y reacción coatiforme. En general, los pacientes portadores no tienen cambios retinianos periféricos atróficos, únicamente aquellos con mutaciones de los genes *AIPL1* y *RPE65*, aunque la capacidad visual permanece conservada. Depósitos maculares tipo drusas se han observado en portadores de mutaciones en los genes *AIPL1*, *CRB1*, *RPE65* y *RPGRIP1*.
- **Otras alteraciones oculares.** Pacientes con ACL frecuentemente tienen altos defectos refractivos y la mayoría son hipermétropes altos, lo que sugiere que la ceguera congénita afecta significativamente el proceso de emetropización o que los genes alterados también juegan un papel determinante en el tamaño del ojo durante la infancia. La fotofobia puede ser un rasgo prominente, así como la nictalopia, y estos síntomas pueden estar asociados a genes específicos. El signo oculodigital de Franceschetti es frecuente pero no es exclusivo de esta enfermedad y consiste en empujar los nudillos o el dedo de forma profunda y repetitiva en el globo ocular. El fenómeno molecular exacto no está claro pero puede estar relacionado a la producción de fosfenos, lo cual produce destellos de luz que pueden satisfacer a los pacientes. Puede ser dañino y resultar en atrofia grasa orbitaria debido al empuje persistente, produciendo ojos hundidos (enoftalmos). También se ha sugerido que el queratocono es causado por el fenómeno oculodigital, aunque pudiera también estar relacionado con la causa genética.
- **Queratocono y cataratas.** Ambos están frecuentemente asociados a ACL y pueden disminuir la función visual aun más. Su etiología es una combinación de factores genéticos, ambientales y tóxicos.

- **Retraso mental.** Alström y Olson en 1957 fueron los primeros en sugerir la asociación de ACL con retraso mental y encontraron que 17% de los pacientes sufrían retraso mental o crisis convulsivas, mientras otros investigadores reportaron entre 26% y 52%. En la mayoría de estos pacientes, el estudio de Tomografía Axial Computada (TAC) no estaba todavía disponible pero, en estudios donde el cerebro fue evaluado mediante neumoencefalografía, la mayoría de los pacientes tuvieron anormalidades por lo que se excluyó el diagnóstico de ACL. Es probable que estos pacientes con ceguera congénita tuvieran una enfermedad sindrómica como la enfermedad de Batten o trastornos peroxisomales. De acuerdo a estos hallazgos, Nickel y Hoyt (1982) solo encontraron un niño con retraso mental en su serie de 31 pacientes con ACL. En la actualidad, no se han reportado casos de retraso mental en pacientes con la definición estricta de ceguera congénita, nistagmo, pupilas amauróticas, señales ausentes en el ERG y una herencia autosómica recesiva con genotipo conocido. En otro estudio, 6/40 familias con mutaciones en el gen *CEP290* presentaron retraso mental (Perrault et al., 2007). En una familia, uno de cada 2 pacientes con ACL era mentalmente discapacitado mientras en otra familia solo 2 de cada 5 pacientes presentaba retraso mental. En los 4 casos restantes no familiares, a 2 se les realizó una Resonancia Magnética cerebral y se encontró el signo del diente molar, confirmando el diagnóstico de síndrome de Joubert y excluyendo el de ACL.
- **Autismo.** El autismo representa un desorden del desarrollo cerebral caracterizado por interacción social y habilidades de comunicación afectadas, lo que lleva a un comportamiento repetitivo característico. Es un desorden muy común en la población pediátrica general, con una prevalencia estimada de 1 a 2 casos por 1000 niños. La conexión entre el autismo y ACL no está clara. Rogers y Newhart-Larson (1989) encontraron autismo en 5 pacientes con ACL pero no en 5 pacientes congénitamente ciegos por otras causas, usando la escala de Reynell-Zinkin. Concluyeron que el autismo en ACL es atribuible a un desorden neurológico concurrente. Otros investigadores estudiaron 24 niños con ACL y no encontraron comportamiento autista en 20 de ellos, y reportaron tendencias autísticas leves en 4 usando la escala de autismo para niños (Fazzi et al., 2007).
- **Disfunción olfatoria.** Existe disfunción olfatoria en pacientes con ACL y mutaciones del gen *CEP290* pero no en pacientes con ACL o RP y mutaciones del *RPGRIP1* y *RPGR*. También se estableció que la disfunción olfatoria no se debe a ausencia ciliar o a defectos estructurales, como es el caso del síndrome de Bardet-Biedl, sino debido a la mala localización de las proteínas G de los cilios olfatorios. (McEwen et al., 2007).

### **Correlación fenotipo-genotipo**

Dependiendo de la sintomatología y los hallazgos clínicos, las distrofias de retina se pueden dividir en distrofia cono-bastón y distrofia bastón-cono. Las características de

ambos grupos y la correlación con los genes involucrados se observa en el siguiente cuadro:

**Cuadro 1. Correlación fenotipo-genotipo**<sup>6</sup>

Al nacimiento o en los primeros meses de vida	Entre el primer y segundo año de vida	Después de los 2 años de vida	Genes implicados
<p><b>Nistagmo</b> <b>Deficiencia visual severa</b> <b>ERG no registrable</b></p>	<p><b>DISTROFIAS CONO-BASTÓN</b>  Fotofobia</p>	<p>Hipermetropía &gt;+7 Degeneración macular y periférica tempranas Agudeza visual = Percepción de luz a cuenta dedos</p>	<i>GUCY2D</i>
		<p>Hipermetropía &lt; +7 Degeneración macular y periférica tempranas Agudeza visual= Cuenta dedos a &lt;1/20</p>	<i>RPGRIP1</i> <i>NPHP6</i>
		<p>Hipermetropía inconstante y variable Degeneración periférica rápidamente progresiva seguida de degeneración macular Agudeza visual= Cuenta dedos a &lt;1/20</p>	<i>LCA5</i>
	<p><b>DISTROFIAS BASTÓN-CONO</b>  Nictalopia</p>	<p>No Hipermetropía Degeneración periférica temprana (aspecto de Retinosis Pigmentaria) Degeneración macular y periférica tempranas Agudeza visual= 1/10 a 2/10</p>	<i>RPE65</i> <i>TULP1</i> <i>RDH12</i>
		<p>Hipermetropía Reorganización macular Degeneración macular y periférica tempranas +/- Queratocono Agudeza visual= 1/10 a 2/10</p>	<i>CRB1</i>  <i>CRX</i> <i>AILP1</i>



**Tabla 1. Variantes genéticas de ACL** <sup>7</sup>

<b>SÍMBOLO</b>	<b>LOCUS</b>	<b>GEN</b>	<b>FRECUENCIA DE MUTACIÓN</b>	<b>FUNCIÓN DEL GEN</b>	<b>HALLAZGOS CLÍNICOS</b>
LCA 1	17p13.1	<i>GUCY2D</i>	11.7%	Hidrólisis GMPc	Muy mala agudeza visual, fondo de ojo normal, fotofobia
LCA 2	1p31	<i>RPE65</i>	6%	Ciclo visual de la vitamina A	Nictalopia, mejoría transitoria de la visión, buena visión relativa en los primeros años de vida
LCA 3	14q31.1	<i>SPATA7</i>	Desconocido	Desconocido	Mala agudeza visual, atrofia retiniana, atenuación vascular
LCA 4	17p13.1	<i>AILP1</i>	5.3%	Chaperona de la enzima PDE de bastones	Maculopatía atrófica, mala visión, nictalopia
LCA 5	6q11-q16	<i>Lebercilina</i>	1.8%	Transporte de proteínas (cilios)	Mácula con lesiones parecidas a coloboma
LCA 6	14q11	<i>RPGRIPI</i>	4.2%	Transporte de proteínas (cilios)	Pérdida visual severa, retina de apariencia normal inicialmente que progresa a retinopatía pigmentaria
LCA 7	19q13.3	<i>CRX</i>	1%	Desarrollo de fotorreceptores	Pérdida visual severa, nistagmo desde la infancia, algunos casos dominantes
LCA 8	1q13.3	<i>CRB1</i>	9.9%	Interacción fotorreceptor-célula de Müller	Reacción coatiforme, retinitis pigmentosa para-arteriolar, retina aparece engrosada y desorganizada en la tomografía de coherencia óptica
LCA 9	1p36	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Único reporte de familia Pakistaní
LCA 10	6q21.3	<i>CEP290</i>	15%	Transporte de proteínas (cilios)	La más común, muy mala agudeza visual en la mayoría de los pacientes
LCA 11	7q31.3-q32	<i>IMPDH1</i>	8.3%	Síntesis de guanina	Rara, moteado retiniano difuso, sin depósitos pigmentarios
LCA 12	1q32.3	<i>RD3</i>	0.1%	Desconocido	Mala agudeza visual, cambios atróficos maculares, rara
LCA 13	14q23.3	<i>RDH12</i>	2.7%	Ciclo visual de la vitamina A	Cambios pigmentarios en patrón reticular, reacción coatiforme
Sin numeración	4q31	<i>LRAT</i>	0.5%	Ciclo visual de la vitamina A	Clínicamente semejante a Retinitis Pigmentosa juvenil
Sin numeración	6p21.3	<i>TULP1</i>	0.8%	Transporte de proteínas (cilios)	Retinopatía pigmentaria

## **ACL relacionada a mutaciones en el gen *RPE65*<sup>7,,8,9,10</sup>**

El cuadro clínico se caracteriza por una afectación visual moderada en la infancia que progresa a ceguera total en la edad adulta. El gen *RPE65* codifica una isomerasa retiniana involucrada en el metabolismo de la vitamina A que regenera el 11-cis retinal después de la exposición a la luz. Una de las características únicas de la ACL relacionada al gen *RPE65* es la preservación relativa de las células de la retina a pesar del daño visual severo. Esto va en contraste con otras formas de ACL en donde los fotorreceptores se encuentran histológicamente ausentes desde el inicio de la enfermedad. La terapia génica requiere la preservación celular como blanco terapéutico. Por lo tanto, el gen *RPE65* se ha vuelto el primer candidato para investigaciones de terapia génica y tiene mayor potencial para restaurar la visión y detener la degeneración retiniana. La terapia génica para esta enfermedad se basa en la habilidad de corregir el defecto bioquímico al insertar un reemplazo del gen *RPE65* hacia las células del epitelio pigmentario de la retina en individuos afectados. Para hacer esto se usa un vector adenoviral recombinante que transporta el gen. El vector es inyectado en el espacio subretiniano a través de técnicas quirúrgicas vitreoretinianas convencionales.

Hay 2 especies animales que se han usado para llevar a cabo estudios de terapia génica para ACL, el perro Pastor de Brie que tiene mutaciones en *RPE65* y dos cepas murinas. Similar al cuadro clínico en humanos, estos modelos animales se caracterizan por baja visión, nistagmo (especies caninas) y ERG no registrable. Histológicamente, la retina se encuentra intacta en edades tempranas pero presenta degeneración tardía con extensa pérdida celular en animales adultos. El modelo canino recibió el vector adenoviral con ADN complementario de *RPE65* en el espacio subretiniano en un ojo. Se realizó ERG, pupilometría y estudios de comportamiento visual para evaluar la función después del tratamiento. Se encontró una mejoría importante en las medidas del ERG con restauración de las fases fotópica y escotópica. Las amplitudes del nistagmo también disminuyeron. La sensibilidad a la luz aumentó en un 50% al evaluar los reflejos pupilares comparado con los sujetos control. El comportamiento visual se evaluó mediante la habilidad de deambular por un camino de obstáculos a diferentes niveles de iluminación, encontrando menos errores de navegación comparado con las medidas basales. Estudios histológicos y el análisis bioquímico confirmaron la presencia de la proteína de *RPE65* y su expresión. Mas de 9 años después de la terapia génica inicial estos animales mantienen la función visual.

Debido a la eficacia y seguridad de los estudios preclínicos en animales, investigadores en el Children's Hospital de Philadelphia, Universidad de Pensilvania; London Moorfield's Eye Hospital en Reino Unido y la Universidad de Florida/Universidad de Pensilvania, comenzaron ensayos clínicos enfocándose en la eficacia y seguridad de la terapia génica en humanos con ACL relacionada a mutaciones de *RPE65*. En total 9 adultos fueron incluidos en los 3 ensayos clínicos y los resultados fueron publicados en 2008. Después de las inyecciones subretinianas del vector de *RPE65* 3 pacientes demostraron mejoría de

agudeza visual significativa y todos, a excepción de 2 pacientes, tuvieron un aumento en la percepción de luz. La sensibilidad a la luz también fue reportada en 1 paciente. No hubo cambios significativos en el trazo del ERG. En general, los ojos tratados mostraron una mayor respuesta pupilar a la luz comparado con las medidas iniciales y con el ojo contralateral que no fue tratado.

#### 4. OBJETIVOS

**Objetivos Generales.** Realizar la caracterización molecular de pacientes mexicanos con diagnóstico clínico y de electrofisiología compatible con Amaurosis Congénita de Leber y Distrofia Retiniana de Inicio Temprano.

**Objetivos Específicos.**

- Describir el fenotipo de los pacientes.
- Establecer una correlación entre el fenotipo y el genotipo encontrado.

#### 5. HIPÓTESIS

**Hipótesis general.** Los pacientes mexicanos con Amaurosis Congénita de Leber tienen una forma única de distrofia de retina en los cuales se identificarán nuevos intervalos que no se relacionan con genes causales ya conocidos.

**Hipótesis específicas.** Hipótesis Alternativa: Se identificarán genes o loci antes descritos en pacientes con ACL y DRIT.

#### 6. JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento con los genes conocidos se puede explicar la causa genética del padecimiento en aproximadamente 60% de los casos. Con el desarrollo de las técnicas recientes de biología molecular se podrán identificar genes nuevos responsables de la patología. Por otro lado con el conocimiento de estos genes y sus funciones mejorará el entendimiento de la enfermedad haciendo posible el encontrar terapias seguras y eficaces que intenten disminuir la pérdida severa de agudeza visual que caracteriza a los pacientes afectados. No existen aún reportes sobre la caracterización molecular de ACL en pacientes mexicanos.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1 Diseño del estudio**

Estudio clínico, observacional, descriptivo y transversal.

### **7.2 Metodología**

#### **Lugar y duración**

Departamento de Genética de la Asociación para Evitar la Ceguera en México.

Departamento de Genética Ocular. McGill University Health Centre. Montreal, QC, Canada.

Duración aproximada del estudio: 2 años.

#### **Población**

**Unidad de Observación.** Pacientes con diagnóstico clínico y electrofisiológico de Amaurosis Congénita de Leber y Distrofias de Retina de Inicio Temprano. Se incluirán también pacientes con diagnóstico de retinosis pigmentaria por el involucro de los mismos genes.

**Universo y tamaño de la muestra.** 21 pacientes del Servicio de Genética de la APEC.

#### **Método de muestreo.**

En los pacientes seleccionados de los expedientes se realizará una valoración oftalmológica y sistémica completas a fin de tener la caracterización del fenotipo incluyendo: agudeza visual, refracción, biomicroscopía especular, fotografía de fondo de ojo y electroretinograma.

El diagnóstico de amaurosis congénita de Leber se establecerá en pacientes con pérdida visual bilateral en los primeros meses de vida, la presencia de nistagmo y falta de respuesta en el electroretinograma.

El diagnóstico de distrofia de retina de inicio temprano se establecerá en pacientes con pérdida visual en los primeros años de vida y falta de respuesta en el electroretinograma.

Se tomará muestra de sangre periférica en el propósito y hermanos afectados, así como en padres para extracción de ADN.

Mediante el uso de “chips de microarreglos” para los genes conocidos de amaurosis congénita de Leber y retinosis pigmentaria se descartarán las mutaciones más comunes en estos genes (APEX technology).

El “chip de microarreglos” está basado en la técnica APEX (Arrayed Primer Extension) que se emplea para la detección de mutaciones conocidas y su fundamento es el mismo que el de la secuenciación automática: el empleo de nucleótidos dideoxi (ddNTP). Para ello existen portaobjetos comerciales donde se encuentran inmovilizados una serie de oligos por el extremo 5’ y cuya secuencia es específica de una mutación concreta.

El ADN del paciente se amplifica mediante PCR y se añade al portaobjetos para su hibridación. El fragmento hibridará con el oligo inmovilizado dejando sin aparear la base siguiente al extremo 3’ de la muestra del paciente, que es el nucleótido que se quiere detectar.

Para la detección del nucleótido desapareado en el extremo 3’ se añaden nucleótidos dideoxi marcados con fluorocromos, los cuales se unirán de forma complementaria a la base desapareada e impidiendo la unión de otros nucleótidos ya que los dideoxis impiden la elongación gracias a la modificación del grupo OH por un H, es decir, la técnica de terminación de cadena de Sanger. La detección de este dideoxi permitirá conocer la base en esa posición en el paciente.

Una vez descartadas mutaciones comunes en los genes conocidos se buscarán en todo el genoma regiones homocigotas usando genotipificación con SNP (Illumina Infinium HD).

Las regiones de interés se analizarán mediante el software: Illumina Bead Studio y P-link.

Finalmente mediante un análisis combinado usando las bases de datos, ontología génica y perfiles de expresión génica se tratará de identificar genes candidatos.

La selección de pacientes, la fenotipificación y la toma de muestras se realizará en el Hospital “Dr. Luis Sánchez Bulnes” de la Asociación Para Evitar la Ceguera en México.

Todas las técnicas de laboratorio y análisis molecular se llevarán a cabo en McGill University Health Centre, Montreal, QC, Canada.

**Obtención de la población.** Se revisaron los registros de pacientes del Servicio de Genética de 1999 a 2009 con diagnóstico de ACL, DRIT y Retinosis pigmentaria, y se les contactó vía telefónica o telegráfica para invitarlos a participar en el protocolo.

### **Criterios de inclusión**

- Pacientes que cumplieron con las características clínicas y/o electrofisiológicas compatibles con ACL, DRIT y Retinosis pigmentaria.
- Cualquier edad.
- Sexo indistinto.
- Expediente clínico completo y disponible.

### **Criterios de exclusión**

- Pacientes que no pudieron ser contactados.
- Pacientes que no aceptaron participar en el protocolo.

## **8. RESULTADOS**

Se estudiaron 21 pacientes. Las características demográficas de este grupo de pacientes se observa en el siguiente cuadro:

**Tabla 2. Características demográficas de pacientes incluidos en el protocolo**

	<b>Edad</b>	<b>Sexo</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Consanguinidad</b>	<b>Herencia</b>
Paciente 1	8 años	Masculino	Amaurosis Congénita de Leber	No	Caso esporádico
Paciente 2	12 años	Femenino	Distrofia de retina de inicio temprano	Si	Caso esporádico
Paciente 3	3 años	Masculino	Amaurosis Congénita de Leber	No	Caso esporádico
Paciente 4	22 años	Masculino	Amaurosis Congénita de Leber	No	Autosómico recesivo
Paciente 5	28 años	Femenino	Amaurosis Congénita de Leber	No	Autosómico recesivo
Paciente 6	7 años	Femenino	Amaurosis Congénita de Leber	Si	Caso esporádico
Paciente 7	25 años	Masculino	Retinosis Pigmentaria	No	Autosómico recesivo
Paciente 8	51 años	Femenino	Retinosis Pigmentaria	No	Autosómico recesivo

Paciente 9	4 años	Femenino	Amaurosis Congénita de Leber	No	Caso esporádico
Paciente 10	27 años	Masculino	Amaurosis Congénita de Leber	No	Autosómico recesivo
Paciente 11	37 años	Femenino	Amaurosis Congénita de Leber	No	Autosómico recesivo
Paciente 12	19 años	Masculino	Amaurosis Congénita de Leber	No	Autosómico recesivo
Paciente 13	21 años	Femenino	Amaurosis Congénita de Leber	No	Autosómico recesivo
Paciente 14	5 años	Masculino	Amaurosis Congénita de Leber	No	Caso esporádico
Paciente 15	10 años	Masculino	Distrofia de retina de inicio temprano	Si	Autosómico recesivo
Paciente 16	4 años	Femenino	Amaurosis Congénita de Leber	No	Caso esporádico
Paciente 17	71 años	Masculino	Distrofia de retina de inicio temprano	No	Autosómico recesivo
Paciente 18	73 años	Masculino	Distrofia de retina de inicio temprano	No	Autosómico recesivo
Paciente 19	36 años	Masculino	Amaurosis Congénita de Leber	Si	Caso esporádico
Paciente 20	6 años	Femenino	Amaurosis Congénita de Leber	No	Caso esporádico
Paciente 21	21 años	Masculino	Amaurosis Congénita de Leber	No	Caso esporádico

En ninguno de los casos se encontraron mutaciones descritas previamente para distrofias de retina utilizando los “chips de microarreglos” para ACL y RP.

Una vez descartadas mutaciones comunes en los genes conocidos se buscaron regiones homocigotas usando genotipificación con SNP (Illumina Infinium HD) encontrándose en 9 pacientes 8 regiones homocigotas que coincidieron en 5 pacientes, teniendo los intervalos más grandes en los cromosomas 1 y 20. Actualmente los resultados de estas regiones se encuentran en proceso de análisis para la identificación de los posibles genes candidatos. Las características de los pacientes se describen en los siguientes cuadros.

**Tabla 3. Capacidad visual y defecto refractivo de pacientes con regiones homocigotas**

	<b>Agudeza visual mejor corregida OD</b>	<b>Agudeza visual mejor corregida OI</b>	<b>Refracción OD</b>	<b>Refracción OI</b>
Paciente 1	20/200	20/200	+1.00 = -1.00 x 0°	+0.50 = -1.00 x 180°
Paciente 2	20/200	20/100	+8.00 = -1.50 x 0°	+7.25 = -1.00 x 10°
Paciente 3	20/50 (Lea)	20/60 (Lea)	+1.00 = -1.00 x 0°	+1.00 = -1.00 x 180°
Paciente 4	No percepción de luz	No percepción de luz	No registrable	No registrable
Paciente 5	20/800	20/800	-7.75 = -7.00 x 44°	-5.75 = -4.75 x 179°
Paciente 6	20/50 (Lea)	20/60 (Lea)	+1.00 = -1.00 x 0°	+1.00 = -1.00 x 180°
Paciente 7	20/30	20/25	-1.00 = -2.00 x 170°	-1.25 = -1.50 x 180°
Paciente 8	Cuenta dedos a 4 metros	20/80	-10.25 = -2.75 x 30°	-1.25 = -1.50 x 180°
Paciente 9	Sigue objetos	Sigue objetos	+1.25 = -3.50 x 180°	+1.25 = -2.75 x 0°

OD= ojo derecho, OI= ojo izquierdo

**Tabla 4. Características clínicas de pacientes con regiones homocigotas**

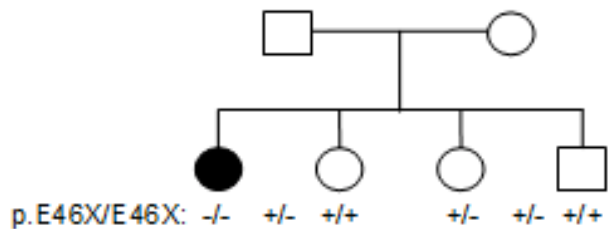
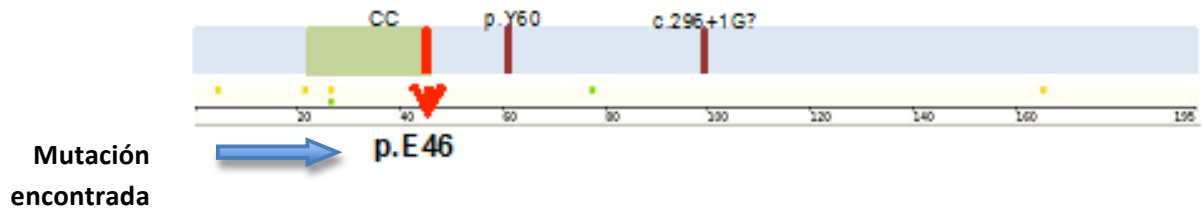
	<b>Características clínicas</b>	<b>Biomicroscopía</b>	<b>Estudios de gabinete</b>	<b>Alteraciones sistémicas</b>
Paciente 1	Nistagmo, baja visión, fotofobia, no signo oculodigital	Retina sin alteraciones	ERG no registrable	Obesidad
Paciente 2	No nistagmo, estrabismo, baja visión, nictalopia	Iridotomías con YAG laser por cámara estrecha. Retina pálida con cambios del EPR en periferia y mácula, pigmento en vítreo, pseudopapiledema	ERG no registrable	Ninguna



Paciente 3	Nistagmo horizontal sin punto de bloqueo, posición compensadora de la cabeza izquierda	Palidez de retina, papila normal, reflejo foveolar presente	ERG no disponible PVE disminuidos	Ninguna
Paciente 4	Baja visión desde el nacimiento, nistagmo horizontal, signo oculodigital presente, fotofobia	Queratocono ambos ojos con hidrops resuelto y leucoma secundario. Retina sin alteraciones, papila excavada	ERG no disponible	Ninguna
Paciente 5	Baja agudeza visual desde el nacimiento, nistagmo horizontal, signo oculodigital positivo, fotofobia.	Adelgazamiento central corneal (probable queratocono), cristalino con opacidad subcapsular posterior, retina con palidez generalizada y adelgazamiento vascular, papila pálida	ERG no registrable	Ninguna
Paciente 6	Nistagmo, baja visión, fotofobia, no signo oculodigital	Retina con cambios pigmentarios en periferia, papila pálida	ERG no disponible	Ninguna
Paciente 7	Nictalopia desde los 9 años de edad, pérdida de campo visual evidente desde los 18 años de edad	Retina atrófica con espículas óseas	ERG no registrable Campos visuales con visión tubular	Ninguna
Paciente 8	Baja agudeza visual y nictalopia desde la niñez, pérdida de campo visual evidente a los 43 años	Retina con fondo coroideo, atenuación vascular, alteraciones hipopigmentarias perimaculares	ERG no registrable	Ninguna
Paciente 9	Nistagmo desde el nacimiento, signo oculodigital presente	Retina pálida, atenuación vascular, atrofia macular, palidez de nervio óptico	ERG no registrable	Ninguna

En la paciente 9 se encontró una mutación en el gen *RD3*. Se trata de una mutación sin sentido, que produce un codón de terminación y por lo tanto una proteína truncada. En el árbol genealógico se observa que hubo una cosegregación en el genotipo familiar en donde solo el caso índice tiene las 2 copias del gen mutadas y tanto los padres como 2 hermanas son heterocitotos para la mutación. En ellos la exploración oftalmológica es normal. En nuestra paciente, se pueden observar cambios atróficos maculares en el segmento posterior (ver Anexo 1); sin alteraciones en el segmento anterior.

#### Mutaciones conocidas para el gen RD3



#### Cosegregación familiar

## 9. DISCUSIÓN

El mapeo de regiones homocigotas constituye una estrategia adecuada en la búsqueda de nuevos genes involucrados con padecimientos con gran heterogeneidad genética como es el grupo de amaurosis congénita de Leber, distrofias de retina de inicio temprano, así como la misma retinosis pigmentaria.<sup>11</sup>

En esta pequeña cohorte de 21 pacientes Mexicanos con diagnósticos de amaurosis congénita de Leber, DRIT y RP se encontraron en 9 casos (42%) regiones homocigotas que pueden contener a los genes responsables de la patología. Estas regiones aún están en proceso de análisis en cuanto se refiere a la identificación de los genes.

Hasta el momento en un caso se ha identificado al gen responsable y es consistente con el gen *RD3*. La mutación encontrada fue p.E46X y afecta el dominio “coiled-coil” de la proteína. (c.1368 G→T). Las características clínicas de polo posterior de la paciente son las siguientes: nervio óptico pálido y con excavación amplia; retina con atenuación vascular generalizada (signo del actividad celular metabólica disminuida), sin cambios pigmentarios periféricos y área macular con cambios hipopigmentarios y pérdida del brillo foveolar que sugieren atrofia.

No se conoce con claridad la función del gen *RD3*. El gen *GUCY2D* codifica la guanilato ciclasa 1 (GC1) y fue el primer gen asociado a ACL. Las guanilato ciclasas, GC1 y GC2, se localizan en los segmentos externos de los fotorreceptores sensibles a la luz, en donde juegan un papel crucial en la fototransducción al catalizar la síntesis de GMPc, el segundo mensajero de la fototransducción, y al regular los niveles de calcio intracelular en combinación con canales iónicos mediados por GMPc. El gen *RD3* codifica una proteína de función desconocida asociada con la degeneración de fotorreceptores en humanos con ACL tipo 12. En modelos animales interactúa con la GC1 y GC2 en conos y bastones en ratones normales. La GC1 y GC2 no pueden detectarse mediante técnicas de inmunofluorescencia en fotorreceptores de ratones con deficiencia de *RD3*. Estudios de expresión celular han mostrado que *RD3* media la exportación de GC1 desde el retículo endoplásmico hacia las vesículas endosomales, y que la terminal C de la GC1 es necesaria para la unión a *RD3*. Por lo tanto, se cree que la degeneración de los fotorreceptores en pacientes con ACL tipo 12 es causada por la alteración de la expresión y transporte de guanilato ciclasa mediados por *RD3*. La consecuente deficiencia en la síntesis de GMPc y el cierre de los canales iónicos mediados por este segundo mensajero producen una reducción en el calcio intracelular a niveles menores que los requeridos para la supervivencia a largo plazo de los fotorreceptores.<sup>12</sup>

Hay 2 mutaciones previamente descritas para el gen *RD3*. La primera fue reportada en 2006 por Friedman y colaboradores en 2 hermanas originarias de la India con diagnóstico de ACL. Ambas presentaban baja agudeza visual desde el nacimiento, nistagmo, lesiones maculares atróficas y migración de pigmento retiniano (ver Anexo 2). Se encontró una transición G → A en el sitio de unión al final del exón 2 en ambas hermanas (c.296 +1 G →A). Cuando el

sitio de unión es removido, el codón 99 todavía codifica para arginina y es seguido de un codón de terminación, lo que sugiere que la proteína se trunca prematuramente. El análisis de los otros miembros de la familia demostró que el cambio homocigoto estaba presente solo en los miembros afectados, siendo el resto de los familiares heterocigotos para la mutación.<sup>13</sup>

La segunda mutación fue reportada en 2010 por Preising y colaboradores, identificada en una familia kurda con antecedente de consanguinidad y diagnóstico de ACL autosómica recesiva en 5 miembros de edad pediátrica. Los pacientes presentaban nistagmo, baja agudeza visual desde el nacimiento, fotosensibilidad y disminución progresiva del campo visual. A la exploración oftalmológica se encontró atenuación vascular e irregularidades pigmentarias a nivel periférico y macular. La secuenciación de *RD3* mostró una mutación homocigota sin sentido (p.Y60X) en el exón 2.<sup>14</sup>

Tanto en las mutaciones previamente descritas como en nuestro caso clínico, existe una correlación entre los cambios atróficos a nivel macular y la mutación del gen *RD3*.

## 10. CONCLUSIONES

El mapeo de regiones homocigotas constituye una estrategia adecuada en la búsqueda de nuevos genes involucrados con amaurosis congénita de Leber y distrofias de retina de inicio temprano.

Mediante esta técnica se identificaron 8 regiones las cuales pueden contener a los genes responsables de la patología.

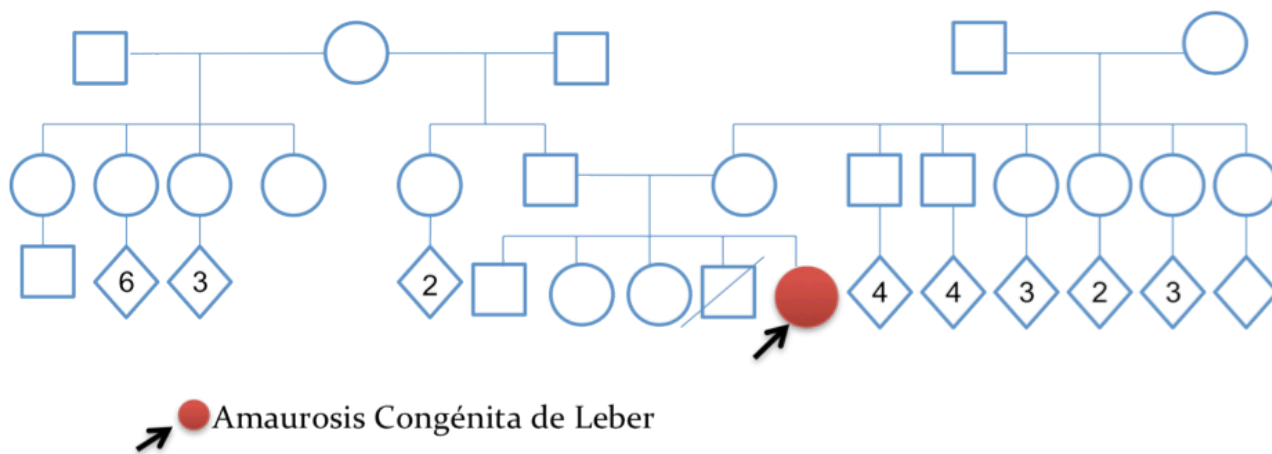
Se identificó una mutación nueva homocigota p. E46X en el gen *RD*; este gen se ha descrito previamente como causante de ACL, sin embargo se considera como una causa poco común del padecimiento.

Con el conocimiento de nuevos genes y sus funciones mejorará el entendimiento de la enfermedad haciendo posible el encontrar terapias seguras y eficaces que intenten disminuir la pérdida severa de agudeza visual que caracteriza a los pacientes afectados.

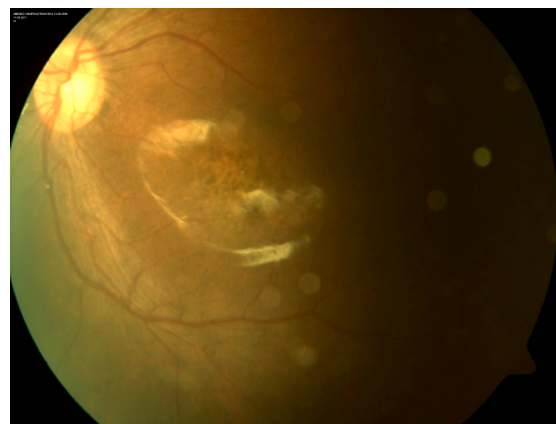
## 11. ANEXOS

### Anexo 1

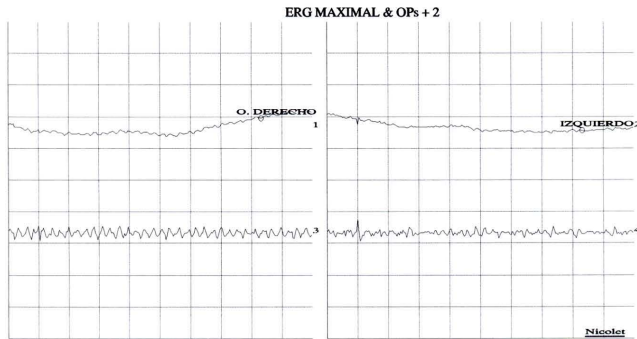
#### Paciente 9. Árbol genealógico



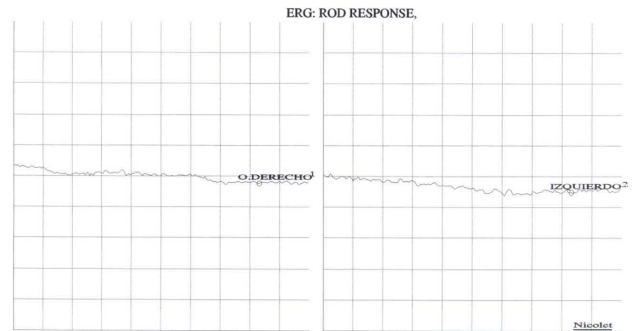
#### Paciente 9. Fotografías de polo posterior: atrofia macular



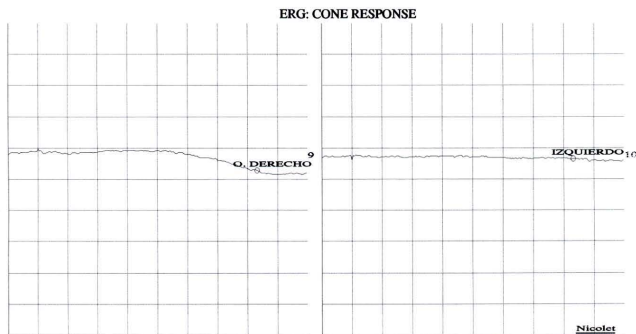
# Paciente 9. Electrorretinograma: trazo no registrable



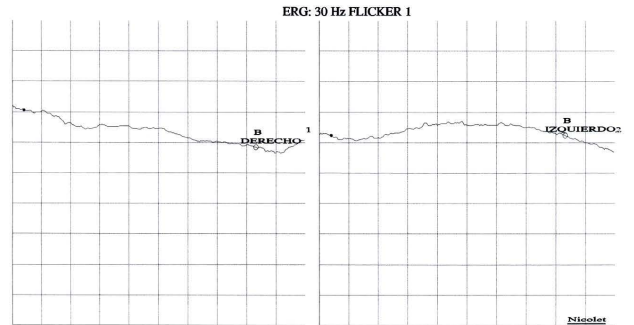
Sensitivity and Sweep Time Per Division			
1	2	3	4
100.00 uV 20.0 msec	100.00 uV 20.0 msec	20.00 uV 20.0 msec	20.00 uV 20.0 msec
ERG MAXIMAL & OPs + 2			
a wave		a wave	
A		A	
b wave		b wave	
B		B	
O.DERECHO 146.40ms		IZQUIERDO 146.40ms	
01		01	
02		02	
03		03	
04		04	



Sensitivity and Sweep Time Per Division			
1	2		
100.00 uV 20.0 msec	100.00 uV 20.0 msec		
ERG: ROD RESPONSE			
a wave		a wave	
A		A	
b wave		b wave	
B		B	
O.DERECHO 146.40ms		IZQUIERDO 146.40ms	



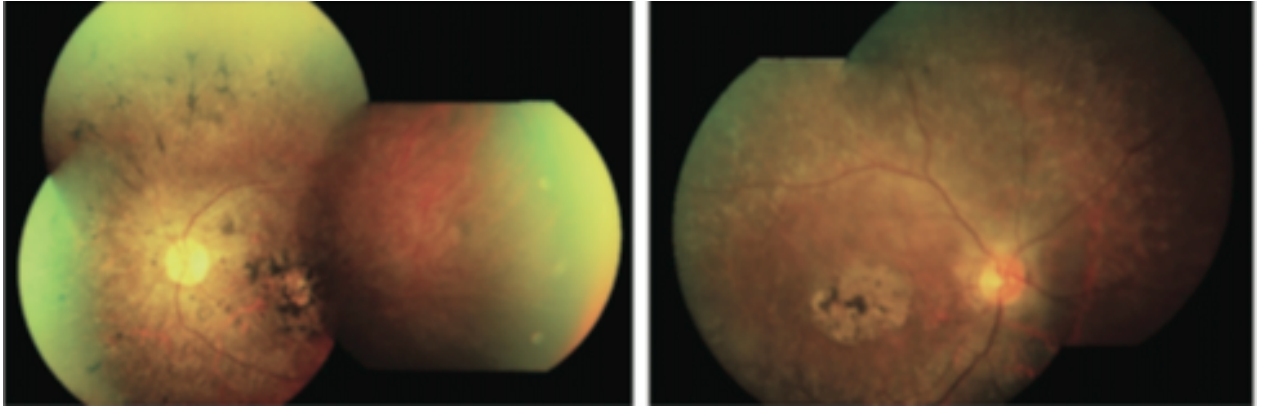
Sensitivity and Sweep Time Per Division			
9	10		
100.00 uV 20.0 msec	100.00 uV 20.0 msec		
ERG: CONE RESPONSE			
a wave		a wave	
A	123.05uV	A	
b wave	1.42uV	b wave	
B	1.42uV	B	
O.DERECHO 146.40ms		IZQUIERDO 146.40ms	



Sensitivity and Sweep Time Per Division			
1	2		
100.00 uV 20.0 msec	100.00 uV 20.0 msec		
ERG: 30 Hz FLICKER 1			
B		B	
DERECHO 123.05uV		B	
B		B	
IZQUIERDO 1.42uV		B	166.40ms
B	166.40ms	B	
B		B	
B		B	

**Anexo 2**

**Características de segmento posterior de una paciente con la mutación c.296 +1 G---- A del gen RD3**



## 12. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Wang H, den Hollander AI, Moayed Y, Abulimiti A, Li Y, Collin RW, Hoyng CB, Lopez I, Abboud EB, Al-Rajhi AA, Bray M, Lewis RA, Lupski JR, Mardon G, Koenekoop RK, Chen R. Mutations in *SPATA7* cause Leber congenital amaurosis and juvenile retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 2009; 84(3):380-7.
- 2) Estrada-Cuzcano A, Koenekoop RK, Coppieters F, Kohl S, Lopez I, Collin RW, De Baere EB, Roeleveld D, Marek J, Bernd A, Rohrschneider K, van den Born LI, Meire F, Maumenee IH, Jacobson SG, Hoyng CB, Zrenner E, Cremers FP, den Hollander AI. IQCB1 mutations in patients with Leber congenital amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 11; 52(2): 834-9.
- 3) den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, Cremers FP. Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res* 2008; 7(4):391-419.
- 4) Walia S, Fishman GA, Jacobson SG, Aleman TS, Koenekoop RK, Traboulsi EI, Weleber RG, Pennesi ME, Heon E, Drack A, Lam BL, Allikmets R, Stone EM. Visual acuity in patients with Leber's congenital amaurosis and early childhood-onset retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 2010; 117(6):1190-8.
- 5) Jennifer A. Galvin, Gerald A. Fishman, Edwin M. Stone, Robert K. Koenekoop. Clinical phenotypes in carriers of Leber congenital amaurosis mutations. *Ophthalmology Volume 112, Issue 2, February 2005, Pages 349-356.*
- 6) Kaplan J. Leber congenital amaurosis: from darkness to spotlight. *Ophthalmic Genet* 2008; 29(3): 92-8.
- 7) Chung DC, Traboulsi EI. Leber congenital amaurosis: clinical correlations with genotypes, gene therapy trials update, and future directions. *J AAPOS* 2009; 13(6): 587-92.
- 8) Koenekoop RK. Successful *RPE65* gene replacement and improved visual function in humans. *Ophthalmic Genet* 2008; 29(3): 89-91.
- 9) Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L, Conlon TJ, Boye SL, Flotte TR, Byrne BJ, Jacobson SG. Treatment of Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther* 2008; 19(10): 979-90.
- 10) Palczewski K. Blind dogs that can see: pharmacological treatment of Leber congenital amaurosis caused by a defective visual cycle. *Arch Ophthalmol.* 2010 Nov; 128(11): 1483-5.



- 11) Collin RW, van den Born LI, Klevering BJ, de Castro-Miró M, Littink KW, Arimadyo K, Azam M, Yazar V, Zonneveld MN, Paun CC, Siemiatkowska AM, Strom TM, Hehir-Kwa JY, Kroes HY, de Faber JT, van Schooneveld MJ, Heckenlively JR, Hoyng CB, den Hollander AI, Cremers FP. High-resolution homozygosity mapping is a powerful tool to detect novel mutations causative of autosomal recessive RP in the Dutch population. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 6, 52(5): 2227-39.
- 12) Azadi S, Molday LL, Molday RS. *RD3*, the protein associated with Leber congenital amaurosis type 12, is required for guanylate cyclase trafficking in photoreceptor cells. *Proc Natl Acad Sci, U S A,* 2010; 7; 107(49): 21158-63.
- 13) Friedman JS, Chang B, Kannabiran C, Chakarova C, Singh HP, Jalali S, Hawes NL, Branham K, Othman M, Filippova E, Thompson DA, Webster AR, Andréasson S, Jacobson SG, Bhattacharya SS, Heckenlively JR, Swaroop A. Premature truncation of a novel protein, *RD3*, exhibiting subnuclear localization is associated with retinal degeneration. *Am J Hum Genet* 2006; 79(6): 1059-70.
- 14) Preising Markus, Hausotter-Will Nora1, Solbach Manuel, Friedburg Christoph, Rüschemdorf Franz, Lorenz Birgit. *RD3* mutation in a consanguineous LCA family. Abstract Preview, European Paediatric Ophthalmological Society.