



PREMIO ALBERTO RÁBANO 2011



*Colegio Oficial de Médicos de Madrid*

*Madrid, 29 de noviembre de 2012*



*Excelentísima  
Sra. Dña. María Gallo Riu*



*Excelentísimo  
Sr. D. Andrés Romanillos*



TESIS DOCTORAL

*Almudena Ávila Fernández*

*CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y GENÉTICA  
DE FAMILIAS ESPAÑOLAS AFECTADAS  
DE RETINOSIS PIGMENTARIA  
CASOS RECESIVOS Y ESPORÁDICOS*

*Directora: Dra. Carmen Ayuso García*

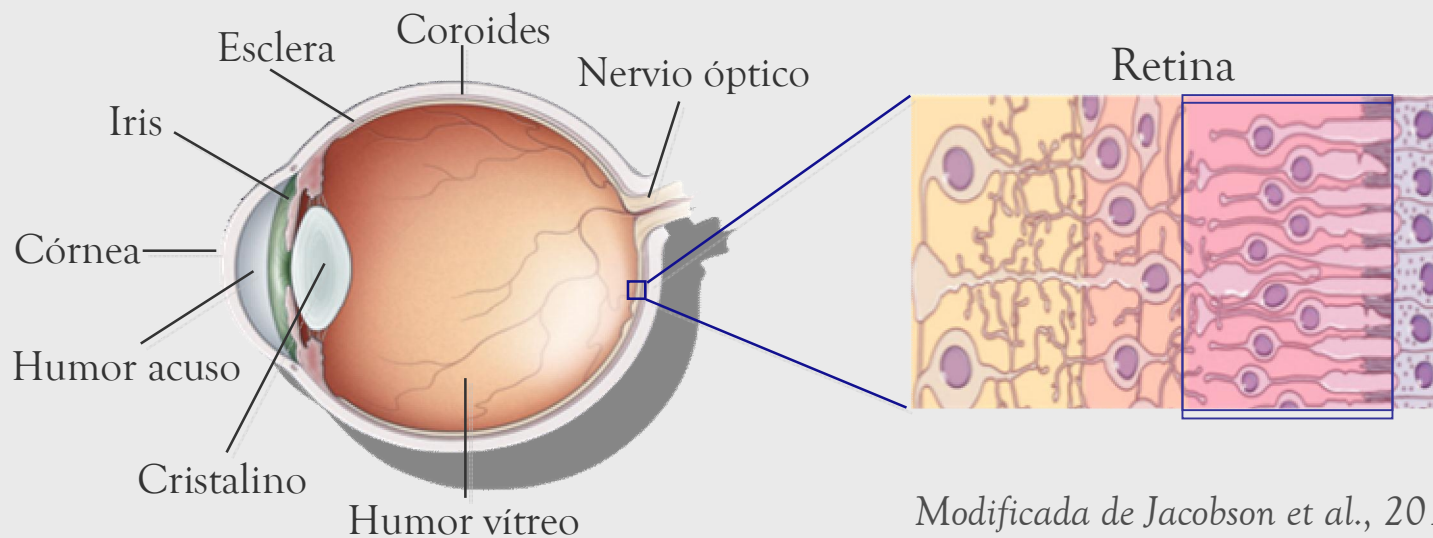
*Tutor: Prof. José Fernández Piqueras*

*Madrid, 14 de abril de 2011*

# *INTRODUCCIÓN*

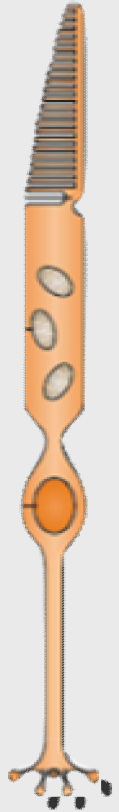
## LA VISIÓN, EL OJO HUMANO

- ✓ La **visión**, o **sentido de la vista**, es el proceso mediante el cual una señal luminosa se transforma en una señal química y eléctrica, que es enviada hacia el cerebro por el nervio óptico.
- ✓ El órgano responsable es el **ojo** o **globo ocular**
- ✓ La **retina** es el tejido donde tiene lugar la recogida de la señal luminosa y comienza el proceso de fototransducción



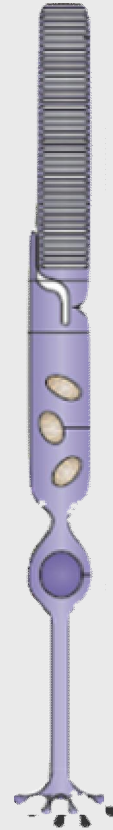
*Modificada de Jacobson et al., 2010*

## CÉLULAS FOTORRECEPTORAS



### CONOS

- ✓ Forma de **cono**. Discos unidos a membrana
- ✓ Representan el 5%. Mácula, concentrados en la fovea. **Visión central**
- ✓ Tres pigmentos: *opsinas* (rojo, verde y azul) **Visión cromática**
- ✓ Baja sensibilidad **Visión diurna**



### BASTONES

- ✓ Forma de **bastón**. Discos no unidos a membrana
- ✓ Representan el 95%. Distribuidos por toda la retina, excepto en la fovea. **Visión periférica**
- ✓ Un pigmento: *rodopsina* **Visión monocromática**
- ✓ Alta sensibilidad **Visión nocturna**

## *LAS DISTROFIAS HEREDITARIAS DE LA RETINA*

- ✓ Conjunto de enfermedades causadas por la afectación primaria de los fotorreceptores
  - ✓ Su prevalencia es de 1 cada 3000 individuos
- ✓ Son hereditarias, progresivas y actualmente no existe tratamiento
  - ✓ Elevada heterogeneidad clínica y genética

## CLASIFICACIÓN DE LAS DISTROFIAS DE LA RETINA

### FORMAS CENTRALES

Degeneración 1<sup>aria</sup> de los **conos**

**Fotofobia y pérdida de agudeza visual** inicial

Alteración en la percepción de **colores**

Enfermedad de Stargardt, distrofia macular, distrofia de conos

### FORMAS PERIFÉRICAS

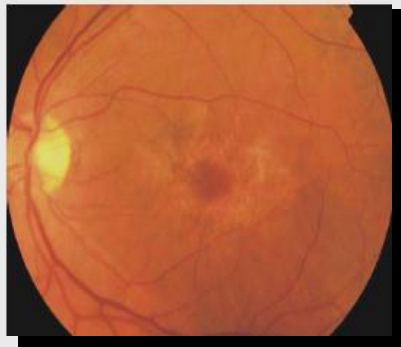
Degeneración 1<sup>aria</sup> de los **bastones**

**Ceguera nocturna** inicial

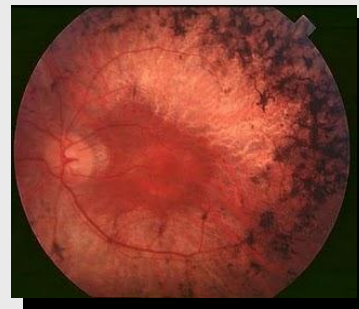
Pérdida de campo visual **periférico**

*Retinosis Pigmentaria (RP)*

### FORMAS MIXTAS



*Distrofia Macular (DM)*



*Distrofia conos-bastones (DC>B)*



*Retinosis Pigmentaria (RP)*

## RETINOSIS PIGMENTARIA (RP)

- ✓ Distrofia de retina más común
- ✓ Prevalencia 1 en 4000 individuos
- ✓ Heterogeneidad clínica: edad de inicio y progresión de la enfermedad

Ceguera nocturna (CN)

Pérdida de la visión periférica

Electrorretinograma disminuido o abolido (ERG)

Fondo de ojo: depósito de pigmento en la media periferia de la retina,  
estrechamiento de los vasos de la retina y palidez de la papila óptica

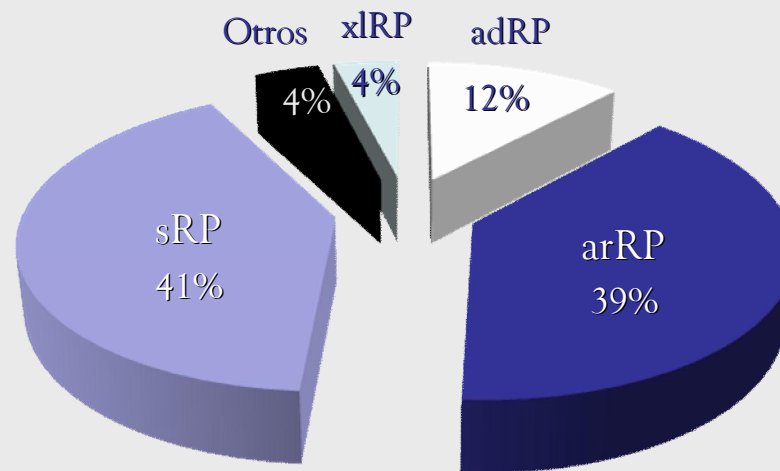
*Modificada de Ayuso & Millán et al., 2010*

- ✓ RP forma única o asociada a otras alteraciones sistémicas (RP sindrómica)



## ASPECTOS GENÉTICOS DE LA RP

- ✓ Enfermedad generalmente monogénica. Casos de digenismo [Kajiwara et al., 1994]
- ✓ Autosómica recesiva (arRP), autosómica dominante (adRP) o ligada al cromosoma X (xlRP). Otros tipos de herencia no mendeliana.

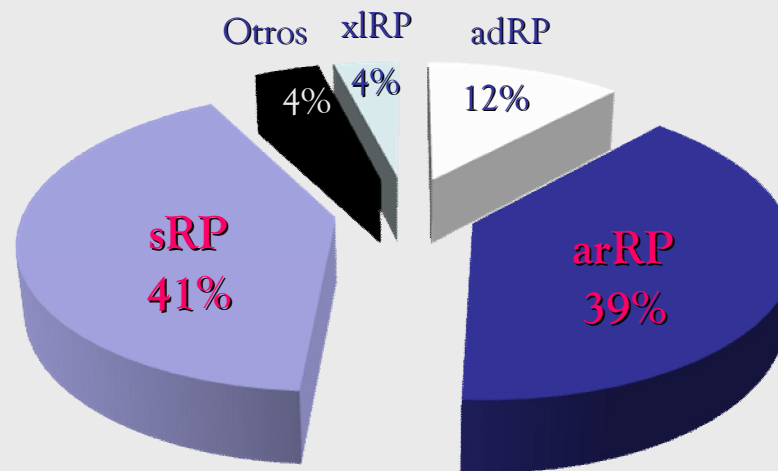


Ayuso et al., 1995

- ✓ Heterogeneidad genética: > de 50 genes en RP no sindrómica

## ASPECTOS GENÉTICOS DE LA RP

- ✓ Enfermedad generalmente monogénica. Casos de digenismo [Kajiwara et al., 1994]
- ✓ Autosómica recesiva (arRP), autosómica dominante (adRP) o ligada al cromosoma X (xlRP). Otros tipos de herencia no mendeliana.

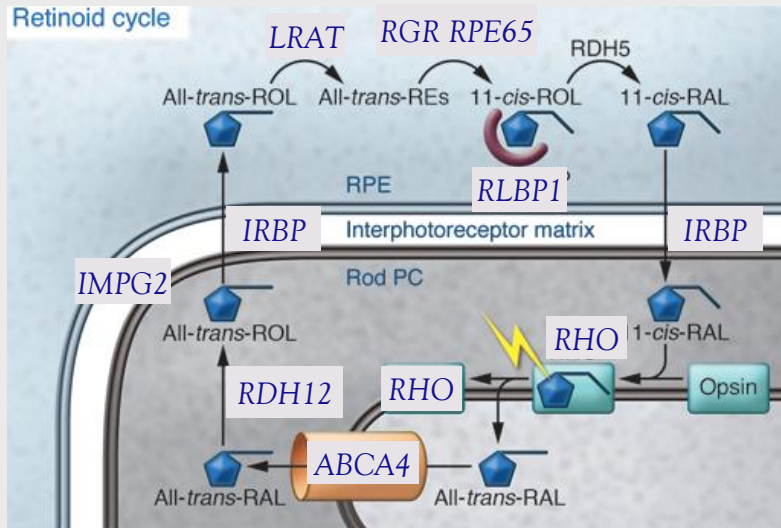


Ayuso et al., 1995

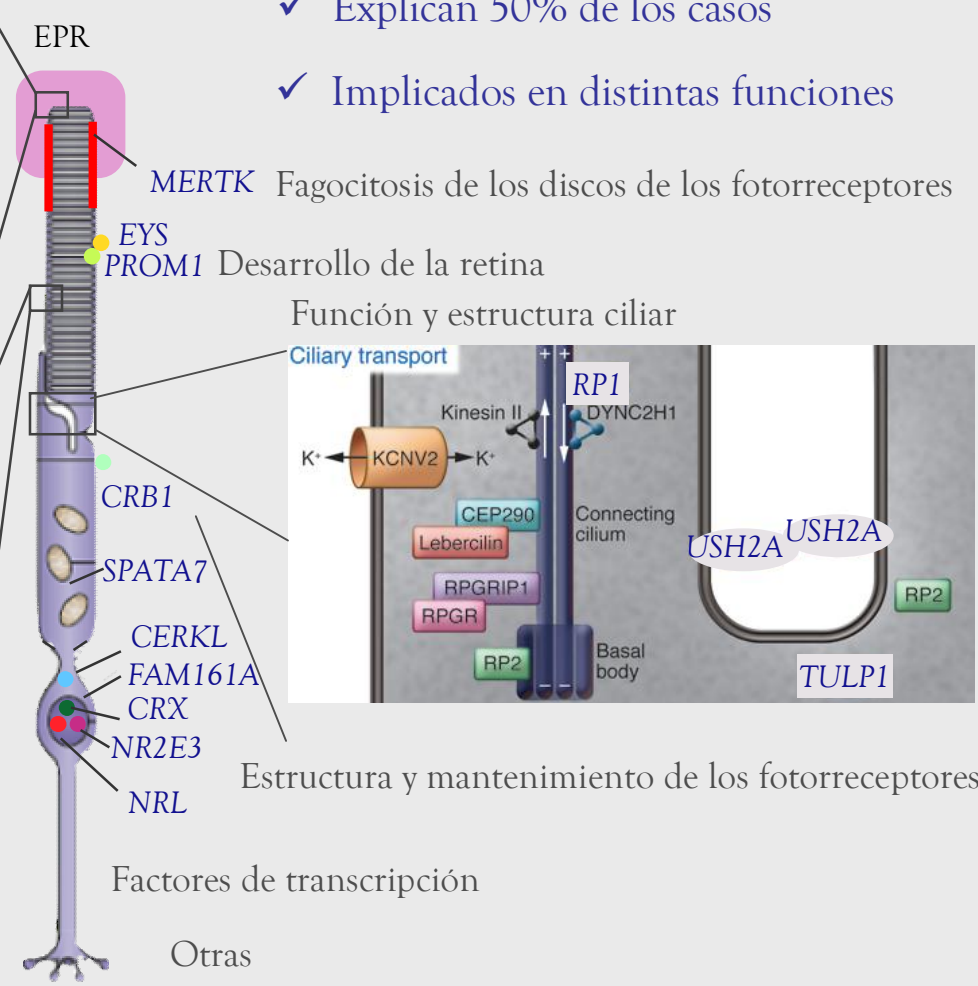
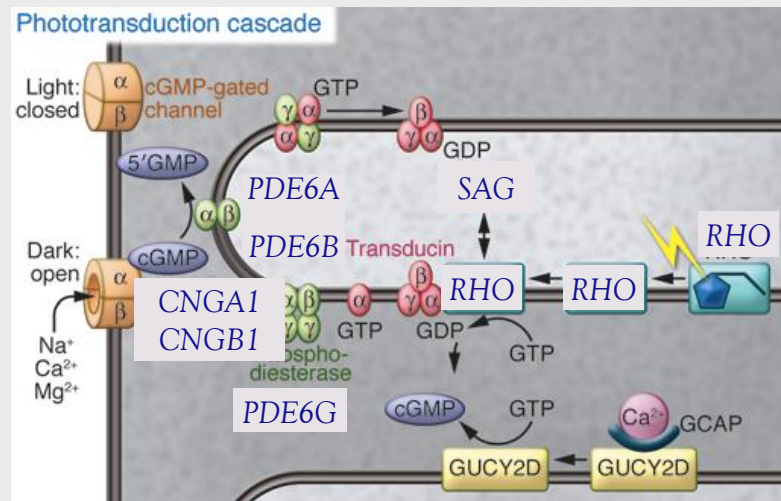
- ✓ Heterogeneidad genética: > de 50 genes en RP no sindrómica

# ASPECTOS GENÉTICOS DE LA ARRP

## Ciclo Visual



## Cascada de la fototransducción



- ✓ 34 genes asociados a arRP
- ✓ Explican 50% de los casos
- ✓ Implicados en distintas funciones

## IMPORTANCIA DE LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS FAMILIAS

- ✓ Elevada heterogeneidad genética dificulta el diagnóstico de la RP
  
- ✓ Ventajas
  - Consejo genético
  - Confirmación del diagnóstico clínico preliminar
  - Correlación genotipo-fenotipo. Pronóstico
  - Tratamiento. Selección de casos terapia dirigida genéticamente

*OBJETIVOS*

## ✓ OBJETIVO GENERAL

Profundizar bases genéticas y moleculares de casos familiares y esporádicos. Identificar y caracterizar mutaciones y genes responsables. Abordaje metodológico múltiple. Agilizar y optimizar el diagnóstico genético en las DR en población española.

## ✓ OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Metodología específica para el diagnóstico molecular de rutina.
2. Papel etiológico de las mutaciones en los genes responsables. Conocer las similitudes y diferencias entre los grupos de pacientes.
3. Análisis epidemiológico molecular en pacientes españoles.
4. Nuevas mutaciones, regiones y/o genes implicados en retinosis pigmentaria mediante localización de regiones de homocigosidad.
5. Correlación genotipo-fenotipo.

## *PACIENTES Y MÉTODOS*

## PACIENTES EN ESTUDIO

*281 familias españolas no emparentadas* que presentaban los signos clínicos de *RP* establecidos internacionalmente [Marmor et al., 1983]:

Bilateralidad y simetría  
Ceguera nocturna (CN)  
Pérdida de visión periférica  
Electrorretinograma (ERG) escotópico alterado

### ✓ Criterio Genético

*115 familias Retinosis Pigmentaria  
autosómica recesiva (arRP)*

*166 familias Retinosis Pigmentaria  
Esporádica (sRP)*

### ✓ Criterio Clínico

*89 familias Retinosis Pigmentaria Juvenil  
Síntomas  $\leq$  10 años de edad*

*192 familias Retinosis Pigmentaria Típica  
Síntomas  $>$  10 años de edad*

*67/281 familias consanguíneas* (progenitores parentesco de hasta tercer grado)



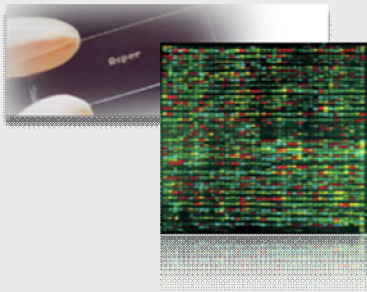
# METODOLOGÍA I

✓ *Caso índice de 272/281 familias*



## Parte I

*Microarray de genotipado  
arRP (Asper Biotech)*

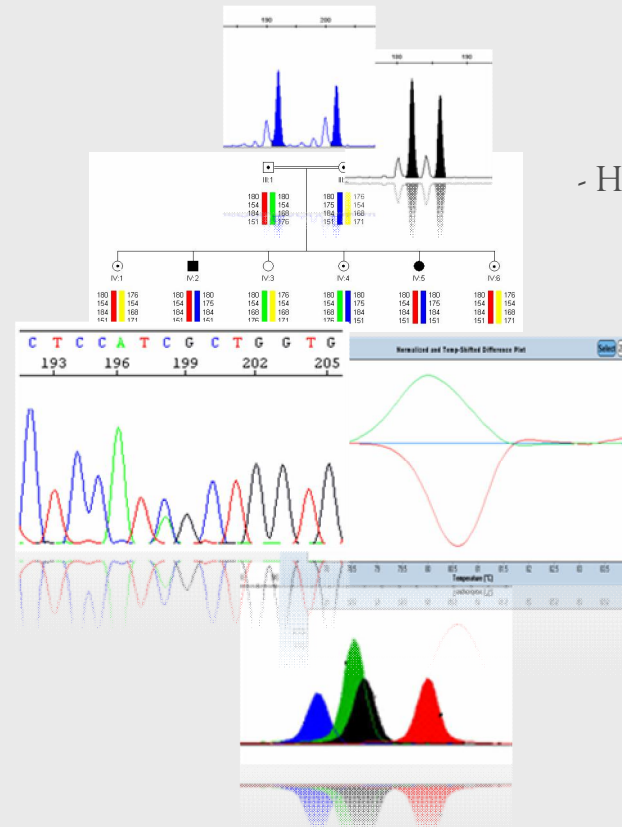


501 variantes en 16 genes

*CERKL, CNGA1, CNGB1, CRB1,  
MERTK, NR2E3, PDE6A, PDE6B,  
RDH12, RGR, RLBP1, RPE65,  
SAG, TULP1, USH2A, USH3A*

## Parte II

*Otras Técnicas*



- Estudio familiar (STRs)
- Secuenciación automática
- High Resolution Melting (HRM) y ensayo de restricción
- Haplotipos SNaPshot



## *RESULTADOS Y DISCUSIÓN*

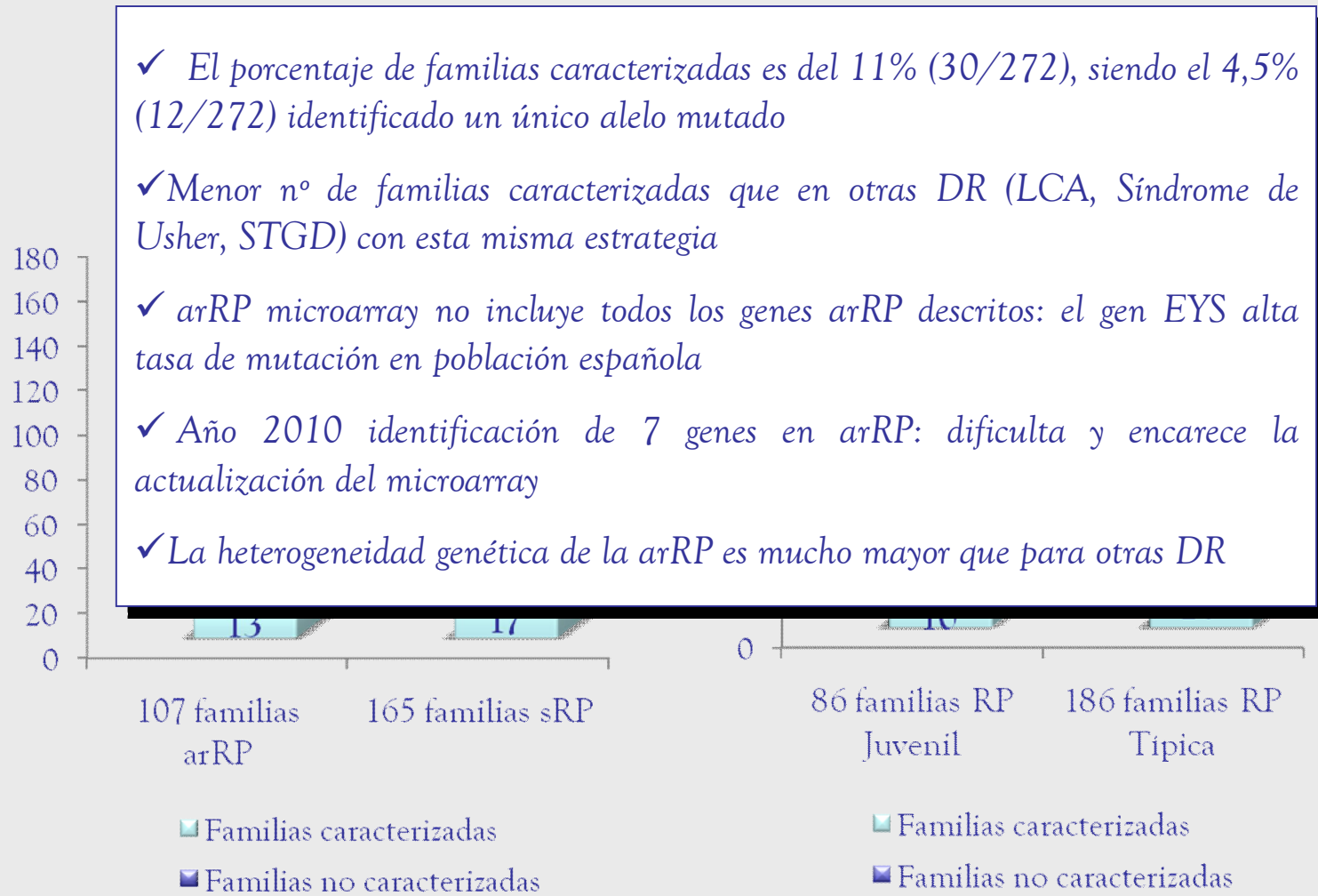
*Parte I. Microarray de genotipado arRP y análisis mutacional*

*Parte II. Mapeo: regiones de ligamiento y homocigosidad*

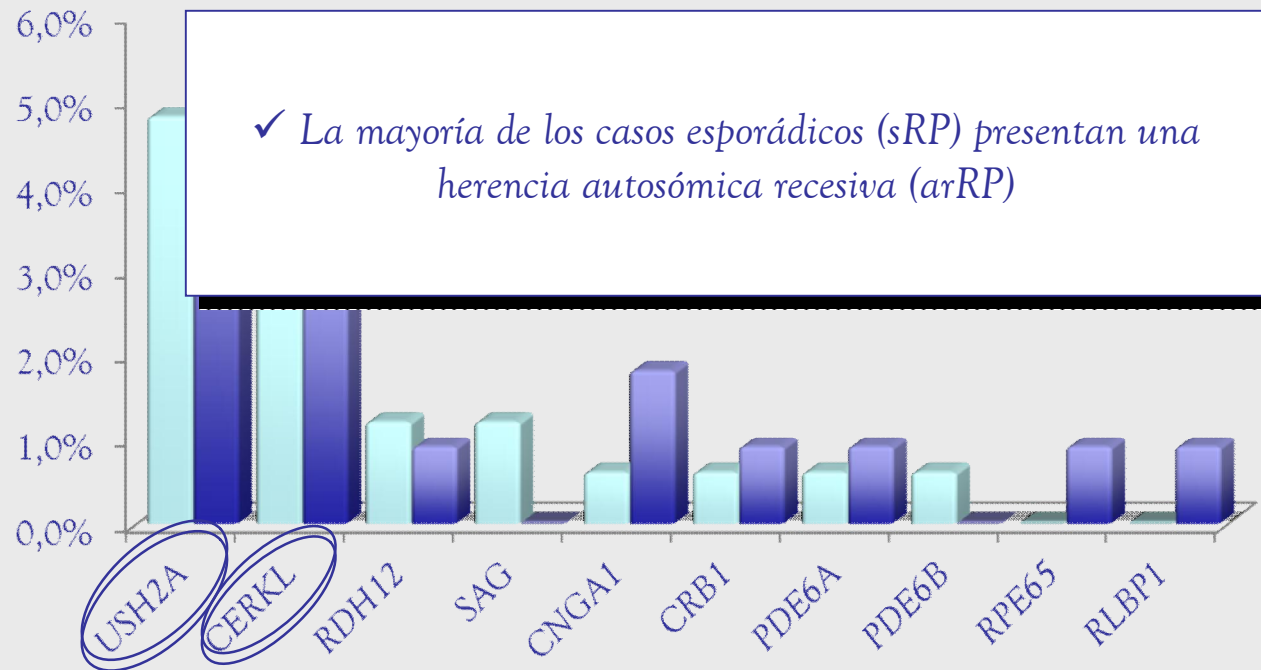
*Parte III. Correlación genotipo-fenotipo*

*Parte IV. Algoritmo diagnóstico*

## Parte I. Familias caracterizadas

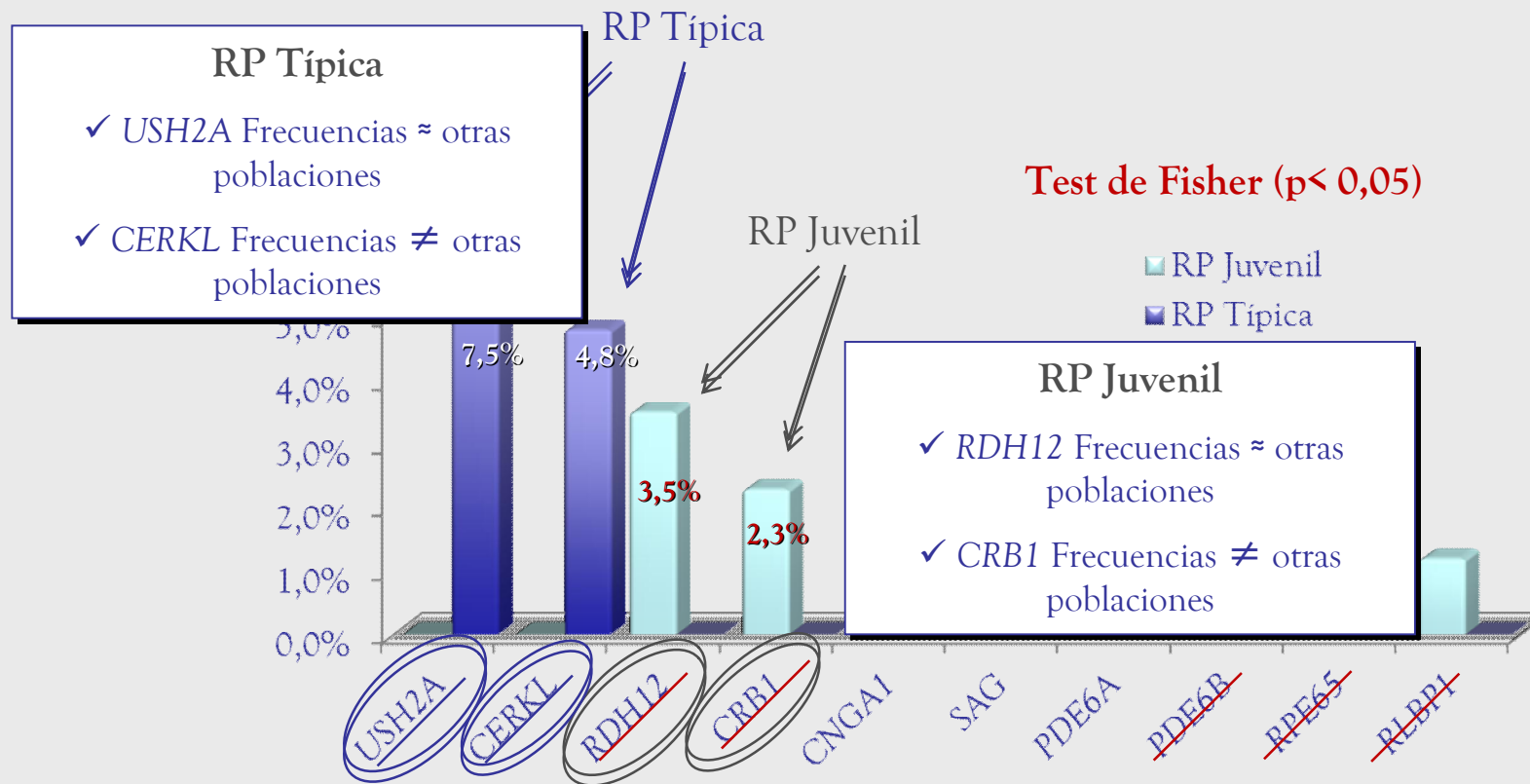


Parte I. Espectro de genes responsables en arRP y sRP



Distribución de los genes implicados para los grupos arRP y sRP

Parte I. Espectro de genes responsables en RP Típica y RP Juvenil



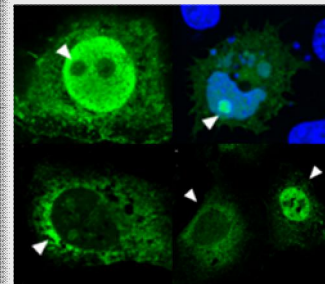
Distribución de los genes implicados para los grupos RP Típica y RP Juvenil

## Parte I. Mutaciones frecuentes en las familias con RP Típica

**p.Arg257ter** [Tuson et al., 2004] en el gen CERKL (2q31.2-q32.3) es la mutación **más frecuente**



Distribución geográfica de las familias



Localización subcelular  
Modificada de Tuson et al., 2009

- CERKL identificado 2004 [Tuson et al.]

- Localización celular: capa células ganglionares, capa nuclear interna, capa fotorreceptores [Vekslin et al., 2010]

- Localización subcelular: núcleo, citosol, nucleolo, región perinuclear [Tuson et al., 2009]

- Función desconocida. Posible implicación en desarrollo [Vekslin et al., 2010] y neuroprotección [Tuson et al., 2009] de la retina

✓ En el **4,8%** (9/186) de las familias

✓ Frecuencia alélica **4,8%** (18/372)

✓ **Amplia distribución geográfica** de las familias

✓ Los pacientes comparten el **mismo haplotipo**

✓ Los pacientes han heredado regiones idénticas procedentes de un **origen ancestral común**

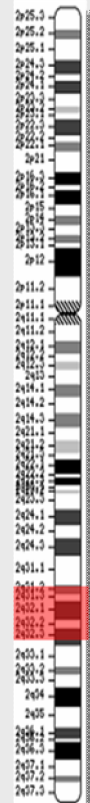
	RP-0211	RP-0218	RP-0320	RP-0325	RP-0535	RP-0595	RP-0828
rs720453	G	G	G	G	G	G	G
rs155107	C	C	C	C	C	C	C
rs1047307 (intragénico)	C	C	C	C	C	C	C
c.769C>T p.Arg257ter CERKL							
rs1449255 (intragénico)	G	G	G	G	G	G	G

Haplotipo asociado a la mutación p.Arg257ter

**CERKL Mutations and Associated Phenotypes in Seven Spanish Families with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa**

Abundena Avila-Fernandez,<sup>1</sup> Rosa Rivero-Alvarez,<sup>1</sup> Elena Vallespin,<sup>1</sup> Robert Wilke,<sup>2</sup> Ignacio Tapias,<sup>3</sup> Diego Canalapiedra,<sup>1</sup> Jana Aguirre-Lamban,<sup>1</sup> Ascension Gimenez,<sup>1</sup> Maria-jose Trujillo-Tiebas,<sup>1</sup> and Carmen Ayuso<sup>1</sup>

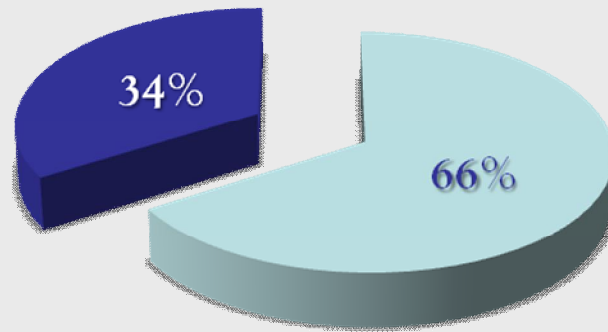
Investigative Ophthalmology & Visual Science, June 2008, Vol. 49, No. 6  
Copyright © Association for Research in Vision and Ophthalmology





Parte I. Análisis de homocigosidad. Familias con mutación en homocigosis

Familias Caracterizadas

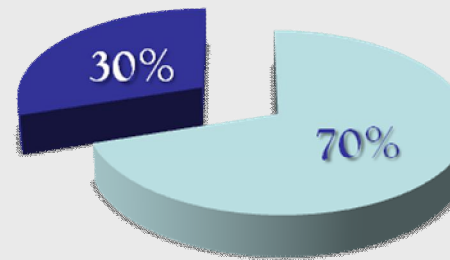


■ Mutación en homocigosis

■ Mutación en heterocigosis

35% Poblaciones de Europa occidental [Roux *et al.*, 2006; Littink *et al.*, 2010]

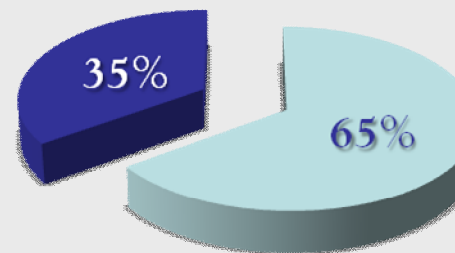
Familias Consanguíneas Caracterizadas



■ Mutación en homocigosis

■ Mutación en heterocigosis

Familias No Consanguíneas Caracterizadas



■ Mutación en homocigosis

■ Mutación en heterocigosis

*Parte I. Microarray de genotipado arRP y análisis mutacional*

*Parte II. Mapeo: regiones de ligamiento y homocigosidad*

*Parte III. Correlación genotipo-fenotipo*

*Parte IV. Algoritmo diagnóstico*

## Parte II. Parte II. Mapeo: regiones de ligamiento y homocigosidad

✓ Las mutaciones identificadas se localizan en las regiones de mayor tamaño [Schraders *et al.*, 2010, Littink *et al.*, 2010]

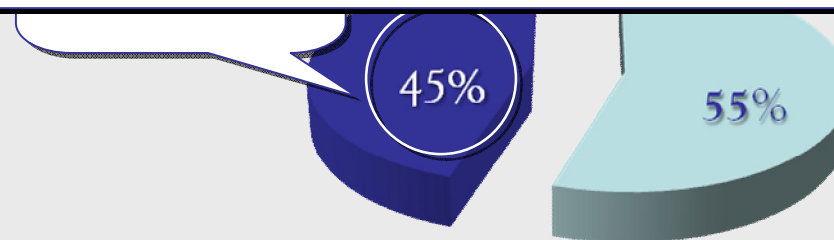
✓ M  
Holla  
más c

✓ Método eficaz en la identificación de mutaciones en familias consanguíneas informativas en nuestra población

✓ Er  
efecti  
2011]

✓ Menos eficaz en familias consanguíneas esporádicas ( $>$  n° regiones) [Hildebrant *et al.*, 2009] y no consanguíneas informativas ( $<$  probabilidad mutación en homocigosis  $<$  n° y tamaño regiones a estudiar) [Collin *et al.*, 2008, Littink *et al.*, 2010]

✓ Familias arRP con 1 mutación en homocigosis 66,6%. Otras poblaciones europeas 35% [Roux *et al.*, 2006; Littink *et al.*, 2010]. Aproximación eficaz para la caracterización de familias españolas



■ Familias caracterizadas

■ Familias no caracterizadas

*Parte I. Microarray de genotipado arRP y análisis mutacional*

*Parte II. Mapeo: regiones de ligamiento y homocigosidad*

*Parte III. Correlación genotipo-fenotipo*

*Parte IV. Algoritmo diagnóstico*

### Parte III. Correlación genotipo-fenotipo

#### Genes **CNGA1** y **PDE6A**

✓ Fenotipo juvenil [Paloma *et al.*, 2002, Zhang *et al.*, 2004, Huang *et al.*, 1995, Riazuddin *et al.*, 2006, Cortón *et al.*, 2010]. Las familias RP-1080 y RP-0881 fenotipo de inicio tardío. *Variabilidad clínica o expresividad variable*

#### Gen **RDH12**

✓ *Amaurosis Congénita de Leber (LCA)* y RP Juvenil [Janecke *et al.*, 2004]. Familias RP juvenil. Variabilidad fenotípica.

#### Gen **USH2A**

✓ RP no sindrómica, Us  
Seyedahmadi *et al.*, 2004,  
descarta aparición en edad

- ✓ Valoración y seguimiento de la función auditiva de los pacientes con mutaciones en el gen **USH2A**
- ✓ Sobreestimación de la contribución de este gen en población afecta de RP no sindrómica

ernal *et al.*, 2003,  
era congénita no

#### Gen **MERTK**

✓ RP Juvenil con afectación macular estadios tempranos [McHenry *et al.*, 2004, Tschernutter *et al.*, 2006, Mackay *et al.*, 2010].

#### Gen **RLBP1**

✓ Mutación **p.Arg151Gln** *Retinosis Punctata Albences (RPA)* con afectación macular [Maw *et al.*, 1997].

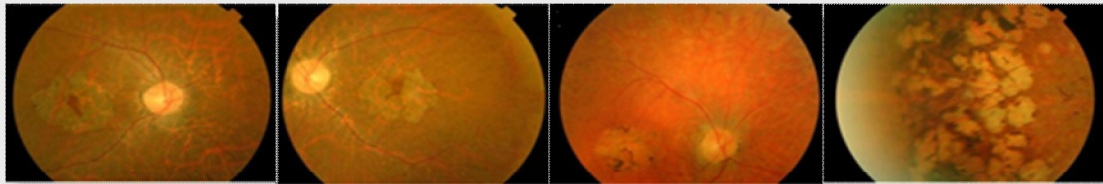
#### Gen **RPE65**

✓ Ceguera nocturna, disminución campo visual y nistagmo en edades muy tempranas. ERG escotópico no detectable. Visión suficiente en edad escolar. Ceguera legal tercera década de la vida [Thompson *et al.*, 2000, Thompson *et al.*, 2004] .

## Parte III. Correlación genotipo-fenotipo

### Gen CERKL

Primera asociación genotipo-fenotipo para mutaciones en el gen *CERKL*



Fondo de ojo pacientes con la mutación p.Arg759ter en el gen *CERKL*

*CERKL* Mutations and Associated Phenotypes in Seven Spanish Families with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa

Almudena Avila-Fernandez,<sup>1</sup> Rosa Rivero-Alvarez,<sup>1</sup> Elena Vallespin,<sup>1</sup> Robert Wilke,<sup>2</sup> Ignacio Taplas,<sup>3</sup> Diego Canialafedra,<sup>1</sup> Jana Aguirre-Lamban,<sup>1</sup> Ascension Gtmenez,<sup>1</sup> Maria-jose Trujillo-Tiebas,<sup>1</sup> and Carmen Ayuso<sup>1</sup>

Investigative Ophthalmology & Visual Science, June 2008, Vol. 49, No. 6  
Copyright © Association for Research in Vision and Ophthalmology

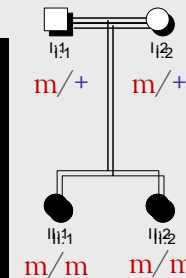
### Gen SPATA7

Nueva asociación fenotípica para mutaciones en el gen *SPATA7*

- ✓ Mutaciones en *SPATA7* asociadas a LCA y arRP Juvenil [Wang *et al.*, 2009]

m : c.253C>T p.Arg84ter *SPATA7*

- ✓ CN (25a)
- ✓ Disminución CV y AV (27a)
- ✓ CV normal (25a) constricción tubular (29a)
- ✓ ERG alterado

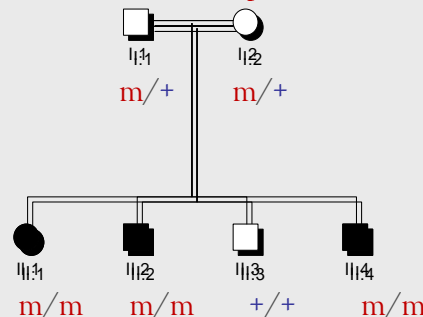


- ✓ No refiere síntomas (26a)
- ✓ ERG reducción moderada amplitud componente b (26a)

### Gen RPI

- ✓ Mutaciones en *RPI* asociadas a ADRP [Pierce *et al.*, 1999] y ARRP [Khaliq *et al.*, 2005]

m : c.1625C>G p.Ser541\*



- ✓ Hijos de unión primos terceros
  - ✓ I11, I12 y I14 RP Juvenil
  - ✓ I1 y I2 no refieren síntomas
  - ✓ No antecedentes familiares

Identification of a RPI Prevalent Founder Mutation and Related Phenotype in Spanish Early-onset Autosomal Recessive Retinitis Patients  
A Avila-Fernandez & Corton *et al.*; OPTHALMOLOGY 2012

Mutación nueva prevalente en RP precoz  
11/244 (4.5%)

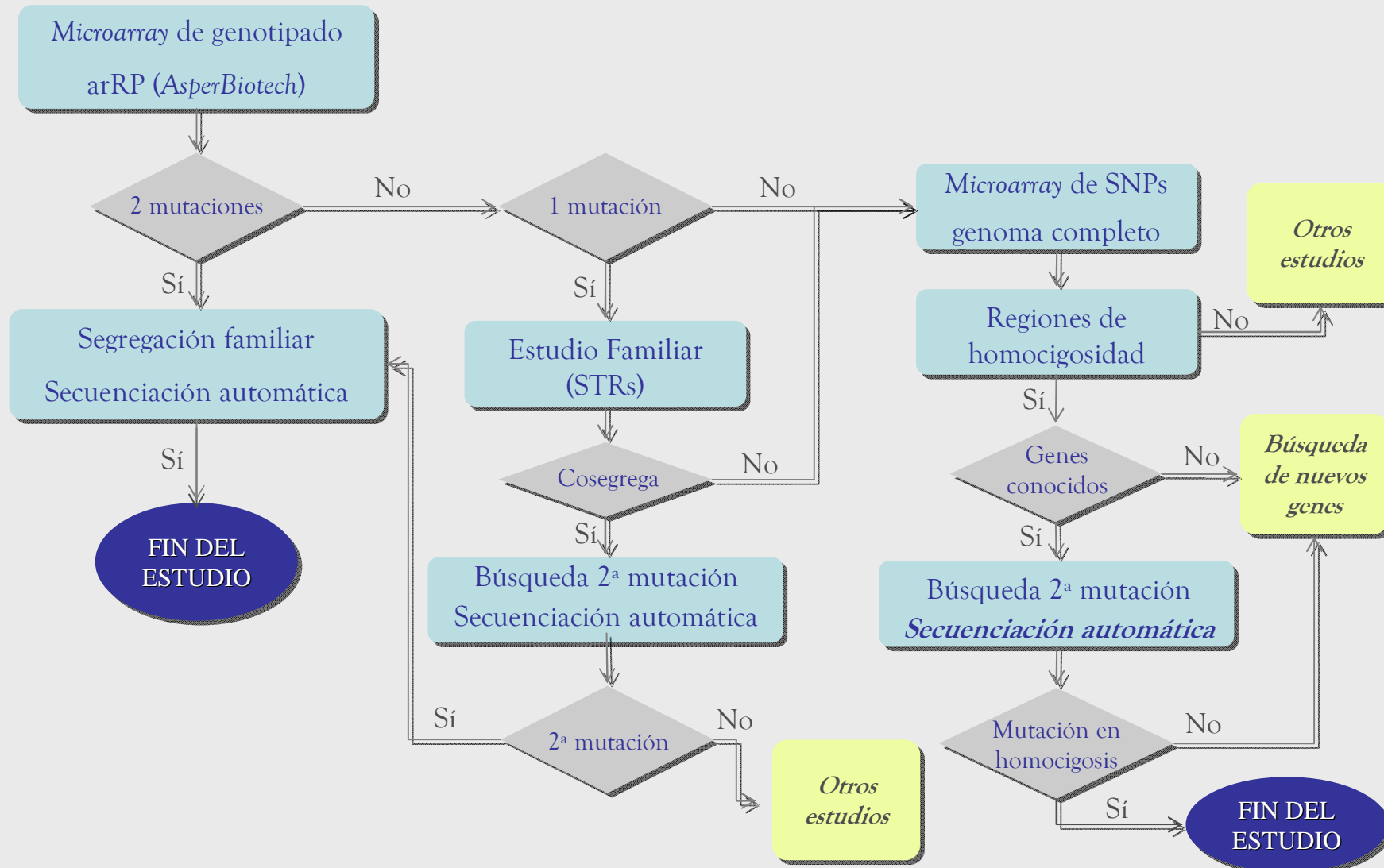
*Parte I. Microarray de genotipado arRP y análisis mutacional*

*Parte II. Mapeo: regiones de ligamiento y homocigosidad*

*Parte III. Correlación genotipo-fenotipo*

*Parte IV. Algoritmo diagnóstico*

Parte IV. Algoritmo diagnóstico





*CONCLUSIONES*

**Primera.** El uso de un microarray de genotipado específico de arRP, seguido del cribado de los genes candidatos mediante secuenciación automática, permite la caracterización molecular completa del 11% de las familias españolas afectadas de arRP y sRP, así como la identificación de un alelo mutado en un 4,5% adicional de ellas.

**Segunda.** El bajo número de familias diagnosticadas con esta estrategia de estudio, a diferencia de los datos descritos para otros tipos de DR con la misma técnica en población española, se debe a la mayor heterogeneidad genética de la arRP, así como a la no inclusión de varios genes candidatos.

**Tercera.** La mayoría de los casos esporádicos (sRP) en población española presentan un patrón autosómico recesivo, como lo demuestra la similitud en el porcentaje y tipo de genes mutados en ambos tipos de familias (sRP vs arRP).

**Cuarta.** El porcentaje de homocigosidad en población española es del 66% del total de las familias afectadas.

**Quinta.** Las familias RP juveniles y típicas son similares en cuanto al porcentaje de casos mutados detectados tras el uso del microarray de genotipado. Sin embargo, sus características genéticas son muy diferentes en cuanto al tipo de genes mutados.

**Sexta.** RDH12 es el gen con mayor tasa de mutación en familias españolas afectadas de arRP juvenil.

*Séptima.* Para las familias españolas afectadas de arRP típica, el gen con mayor tasa de mutación es el gen USH2A, seguido del gen CERKL.

*Octava.* En las familias afectadas de arRP juvenil no hay una mutación frecuente.

*Novena.* En las familias afectadas de arRP típica la mutación más frecuente es p.Arg257ter en el gen CERKL, seguida de la mutación p.Cys759Phe en el gen USH2A.

*Décima.* Todos los pacientes afectados de RP típica, que tienen la mutación p.Arg257ter en el gen CERKL en homocigosis, presentan un fenotipo característico y han heredado la región afectada de un origen ancestral común.

*Undécima.* El mapeo de homocigosidad es un abordaje eficaz para la caracterización molecular de familias españolas consanguíneas afectadas de arRP, permitiendo el diagnóstico genético del 55% de las familias estudiadas.

*Duodécima.* Para determinados genes y mutaciones, como el caso de los genes CERKL, MERTK, RLBP1 y RPE65, es posible establecer una correlación genotipo-fenotipo. Por el contrario, para otros genes como CNGA1, PDE6A y USH2A existe una mayor variabilidad clínica.

*Decimotercera.* La caracterización molecular de familias españolas diagnosticadas a priori de arRP ha permitido modificar el diagnóstico clínico de las familias RP-0043 y RP-0285.

*Decimocuarta.* Por todo lo anterior, el algoritmo propuesto para la caracterización de los casos familiares y esporádicos en población española afectada de RP juvenil y típica, consiste en la aplicación conjunta de un microarray de genotipado específico para arRP y cribado de los genes candidatos como primer abordaje al diagnóstico, seguido de otras estrategias, como el mapeo de homocigosidad.

# AGRADECIMIENTOS

“ Lo esencial es invisible a los ojos ” Antonie de Saint-Exupery (1900-1944)



Fundación Salud 2000

FIS PS09/00459

A LOS PACIENTES

