



FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

**TERAPIA GÉNICA PARA
EL TRATAMIENTO DE
RETINOPATÍAS**

**GENE THERAPY FOR THE
TREATMENT OF
RETHINOPATIES**

Autor/a: *Pablo Díaz Fernández*

Director/es: *Gabriel Moncalián Montes*

Santander, Mayo 2023

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. LA RETINA	4
2.1. ¿Qué es la retina?	4
2.2. Visión anatómica.....	4
3. RETINOPATÍAS.....	7
3.1. ¿Qué son las retinopatías y cuáles son las más frecuentes?	7
3.2. Retinosis pigmentaria (RP) y síndrome de Usher (USH).....	7
3.3. Amaurosis congénita de Leber (LCA)	9
3.4. Coroideremia (CHM)	11
3.5. Acromatopsia (ACHM)	13
3.6. Enfermedad de Stargardt (STGD1)	14
3.7. Retinosquiasis ligada al cromosoma X (XLR5)	15
3.8. Neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON).....	16
4. TERAPIA GÉNICA.....	18
4.1. Introducción (concepto, tipos, aplicaciones y vectores)	18
4.2. Mecanismos de terapia génica ocular	21
4.3. Vectores más utilizados en retinopatías y vías de administración	23
5. REALIZACIÓN DE TERAPIA GÉNICA EN RETINOPATÍAS HEREDITARIAS	25
5.1. Retinosis pigmentaria (RP) y síndrome de Usher (USH).....	25
5.2. Amaurosis congénita de Leber (LCA)	28
5.3. Coroideremia (CHM)	33
5.4. Acromatopsia (ACHM)	35
5.5. Enfermedad de Stargardt (STGD1)	37
5.6. Retinosquiasis ligada al cromosoma X (XLR5)	38
5.7. Neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON).....	40
6. CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	43

RESUMEN

Las mutaciones en un elevado número de genes son responsables de retinopatías hereditarias, una serie de trastornos que producen una discapacidad visual significativa debido a la afectación de la retina, la parte del ojo sensible a la luz localizada en la superficie posterior. La terapia génica ofrece una gran promesa en el tratamiento de estas condiciones retrasando la progresión de la enfermedad y, en algunos casos, restaurando la función visual. Las ventajas del ojo como diana para esta terapia se atribuyen a su fácil accesibilidad y la presencia de una barrera hemato-retiniana que lo hace inmunoprivilegiado. La modalidad de terapia génica más empleada para ensayos clínicos en estas patologías es el aumento de genes, que se basa en el reemplazo del gen causante de la enfermedad por una copia funcional de este. Proporciona la información genética terapéutica mediante el uso de vectores, en especial los virales adenoasociados administrados mediante inyección intravítrea o subretiniana. La histórica aprobación del medicamento Luxturna para la amaurosis congénita de Leber asociada al gen RPE65 produjo un gran optimismo respecto al desarrollo de terapia génica para otras retinopatías hereditarias, existiendo numerosos ensayos clínicos en curso o completados recientemente. Los trastornos diana de terapia génica que se profundizarán son la retinosis pigmentaria y síndrome de Usher, amaurosis congénita de Leber, coroideremia, acromatopsia, enfermedad de Stargardt, retinosquiasis ligada al cromosoma X y neuropatía óptica hereditaria de Leber.

ABSTRACT

Mutations in a large number of genes are responsible for inherited retinopathies, a series of disorders that result in significant visual impairment due to involvement of the retina, the light-sensitive part of the eye located on the posterior surface. Gene therapy offers great promise in treating these conditions by delaying disease progression and, in some cases, restoring visual function. The advantages of the eye as a target for this therapy are attributed to its easy accessibility and the presence of a blood-retinal barrier that makes it immunoprivileged. The most commonly used gene therapy modality for clinical trials in these pathologies is gene augmentation, which is based on the replacement of the disease-causing gene with a functional copy of it. It provides the therapeutic genetic information through the use of vectors, especially adeno-associated viral vectors administered by intravitreal or subretinal injection. The landmark approval of the drug Luxturna for Leber's congenital amaurosis associated with the RPE65 gene led to great optimism regarding the development of gene therapy for other inherited retinopathies, and numerous clinical trials are ongoing or have recently been completed. The gene therapy target disorders that will be further explored are retinitis pigmentosa and Usher syndrome, Leber congenital amaurosis, choroideremia, achromatopsia, Stargardt disease, X-linked retinoschisis, and Leber hereditary optic neuropathy.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades oculares hereditarias son un grupo variado de afecciones con un amplio espectro de manifestaciones representando hasta el 29,6% de las causas de ceguera en niños. Las técnicas de diagnóstico genético han identificado a día de hoy más de 270 variantes asociadas con estas patologías. Durante las últimas décadas ha experimentado una gran evolución un tratamiento basado en la modificación del ADN defectuoso en diferentes tejidos para restaurar la función adecuada, convirtiéndose en una opción terapéutica prometedora para enfermedades de esta índole que presentan una baja incidencia en la población.

Para explicar la novedad que supuso la idea de esta terapia nos tenemos que remontar a los años 40 cuando se evidenció que los nucleótidos o componentes del ADN contenían nuestro código genético y la transferencia de estos en una célula permitía a la célula receptora utilizar esta información y desempeñar un gran abanico de funciones. Posteriormente a finales de los años 60 se promovió la idea de transferir una copia funcional de la variante enferma dentro de un vector, constituyendo ambos hallazgos históricos las áreas de investigación principales que supondrían una innovación en el campo de la oftalmología alcanzando su mayor éxito a finales del siglo XX, sumado a los rápidos avances diagnósticos que se produjeron en estas patologías.

El ojo por tanto se considera un órgano diana atractivo para este tratamiento, ya que además es fácilmente accesible a través de inyecciones o cirugía, se puede evaluar funcional y estructuralmente con pruebas no invasivas, y se considera inmunoprivilegiado (tiene barreras celulares estrechas y un ambiente que inhibe la acción de las células inmunes, y regula activamente la respuesta inmunitaria de todo el cuerpo). El desarrollo de técnicas diagnósticas para enfermedades oftálmicas genéticas abre un nuevo horizonte terapéutico, existiendo nuevos desafíos como la búsqueda de nuevos tratamientos dirigidos a las alteraciones de una variante concreta y que actúen sobre todo en las patologías hereditarias que pueden producir ceguera, así como la evaluación de su alcance terapéutico y eficacia.^{1,2}

2. LA RETINA

2.1. ¿Qué es la retina?

La retina es una membrana sensorial compleja situada en la superficie posterior de la capa más interna del globo ocular y que presenta sensibilidad a la luz, con la función de recibir las imágenes del exterior para luego transformarlas en señales nerviosas que serán transmitidas al cerebro a través del nervio óptico (fototransducción). De forma general la retina muestra un color rojizo o anaranjado debido a la gran abundancia de vasos sanguíneos situados justo detrás. La parte exterior de la retina está encargada de la visión periférica que permite abarcar hasta 180° con la vista y la zona situada en el medio realiza la visión central que nos sirve para reconocer caras de personas o leer.^{3,4}

2.2. Visión anatómica

La retina constituye una estructura fundamental dentro del ojo humano, una de las partes más expresivas de nuestro cuerpo, siendo este un órgano complejo y la valiosa estructura sensorial responsable de la vista, uno de los sentidos que más se ha desarrollado en la especie humana. Aunque tiene un tamaño relativamente pequeño está compuesto por multitud de partes y músculos que tienen funciones diferentes, distinguiéndose una serie de capas de afuera hacia dentro (Figura 1).⁴

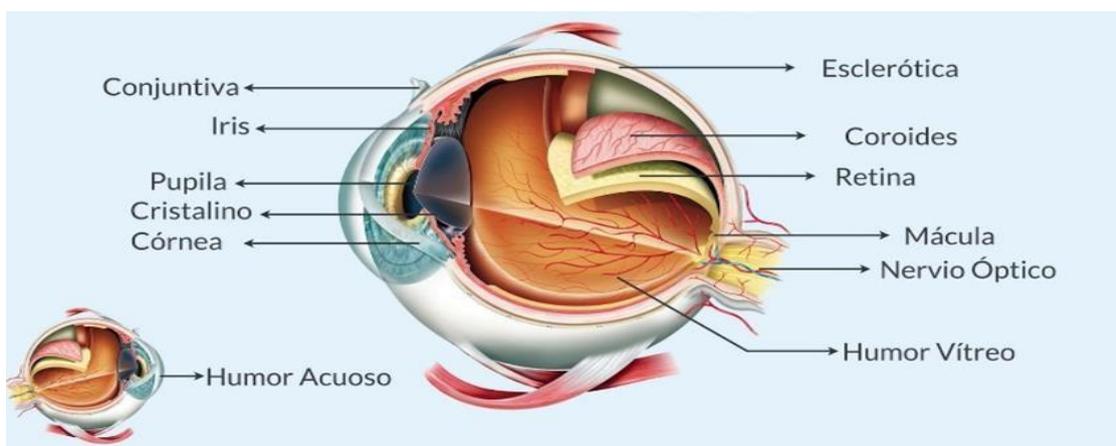


Figura 1. Partes del ojo. Se distinguen la capa externa formada por la esclerótica recubierta por conjuntiva, y la córnea, la capa media con coroides, iris, cristalino detrás del iris y pupila en el centro del iris, y la capa interna con retina, mácula, nervio óptico, humor acuoso y humor vítreo. Fuente adaptada: [4]

PABLO DÍAZ FERNÁNDEZ
TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE RETINOPATÍAS

Las partes de la retina y su composición anatómica se describen desde dos niveles estructurales: microscópico y macroscópico.³

En lo que respecta a la estructura microscópica podemos ver como la retina se agrupa en diez capas paralelas con distintos tipos celulares (Figura 2), siendo el epitelio pigmentario de la retina (EPR) la capa más externa limitando con la coroides, formado por células cúbicas con gránulos de melanina, sustancia que las otorga la característica pigmentación, y que se encargan del metabolismo de los fotorreceptores. La siguiente es la capa fotorreceptora constituida por dos clases de células, los conos que están más concentrados en el centro de la retina siendo responsables de la agudeza visual y de la visión en color (visión fotópica), y los bastones que son más abundantes en el borde externo de la retina, encargados de la visión periférica, son más sensibles a la luz que los conos y se responsabilizan de casi toda la visión nocturna (visión escotópica).^{3,6}

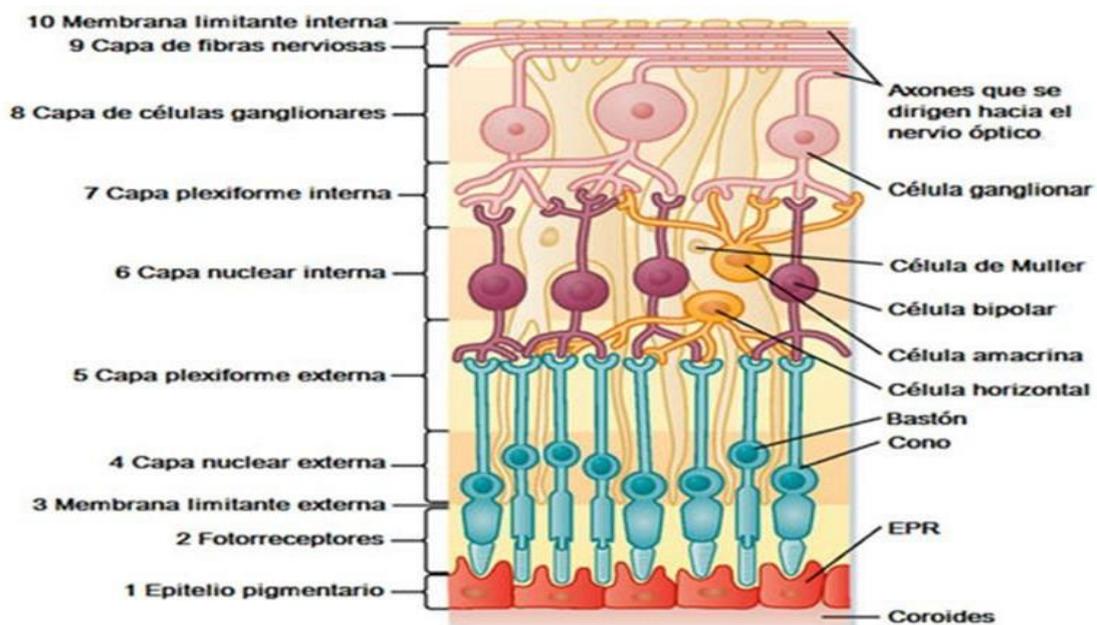


Figura 2. Capas de la retina y tipos de células. Las capas se enumeran desde la más externa o EPR (1) limitando con la coroides hasta la más interna o membrana limitante interna (10). Fuente: [6]

Se continúa con la capa limitante externa que se compone de la unión entre células cuya superficie externa se rodea de una zona con material filamentoso denso, células fotorreceptoras y células de Müller. La capa nuclear o granular externa se encuentra formada por los núcleos y cuerpos de las células fotorreceptoras, y es seguida por la capa plexiforme externa donde se realiza la

sinapsis entre células fotorreceptoras y bipolares. Más internamente encontramos la capa granular o nuclear interna formada por los núcleos de las células bipolares, horizontales, de Müller y amacrinas, y la capa plexiforme interna formada por un denso tejido de fibrillas con disposición en red que conecta sinápticamente células bipolares, amacrinas y ganglionares. Es continuada con la capa de células ganglionares formada por los núcleos de estas, localizadas en la superficie interna retiniana y que reciben la información de los fotorreceptores a través de neuronas intermedias de las capas anteriores (bipolares, horizontales y amacrinas). En la capa de fibras del nervio óptico podemos hallar los axones de las células ganglionares que van a formar el nervio óptico y llegar al cerebro. La última capa es la limitante interna que hace de separación entre retina y humor vítreo, un líquido transparente y gelatinoso ubicado entre retina y cristalino que ayuda a mantener la forma del globo ocular y contribuye a una recepción nítida de imágenes.³

Referente a la estructura macroscópica podemos observar diversas estructuras (Figura 3) en la superficie de la retina, entre ellas la papila o disco óptico que es una zona circular situada en la retina central desde donde salen los axones de las células ganglionares que forman el nervio óptico, y que también se conoce como “punto ciego” porque es un área sin sensibilidad a estímulos lumínicos. Otra estructura es la mácula ocular, la zona responsable de la visión central que nos permite ver con la máxima agudeza visual, pues es la zona de la retina situada en el centro con mayor densidad de células fotorreceptoras, que se encarga de la visión en detalle y el movimiento, distinguiendo gracias a ella rostros, colores y todo tipo de objetos pequeños. En el centro de la mácula

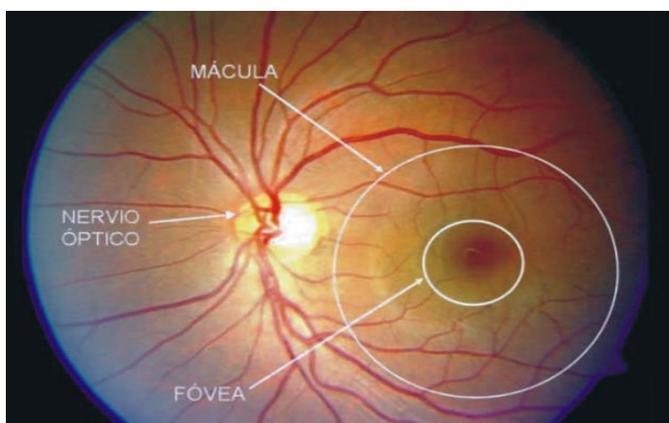


Figura 3. Fondo de ojo. Se muestran el nervio óptico, la mácula y la fovea en el polo posterior del ojo. Fuente: [5]

encontramos la fovea, una hendidura de poca profundidad responsable de la mayor parte de la agudeza visual total, puesto que es el foco receptor de los rayos de luz que llegan a la retina, teniendo únicamente fotorreceptores conos.^{3,5}

3. RETINOPATÍAS

3.1. ¿Qué son las retinopatías y cuáles son las más frecuentes?

La retinopatía se refiere a todas las enfermedades no inflamatorias que afectan a la retina, resultantes de una variedad de causas incluyendo los factores genéticos y las condiciones ambientales. La retinopatía diabética se trata de la entidad más común, consistiendo principalmente en una complicación vascular de la diabetes que afecta visualmente a aquel que la padece, seguida en frecuencia por la retinopatía hipertensiva causada por complicaciones en el control de la hipertensión arterial.^{7,8} A pesar de ser las más frecuentes no se suele contemplar en ellas la terapia génica, no siendo así en las entidades hereditarias de clara etiología genética que se abordarán.

3.2. Retinosis pigmentaria (RP) y síndrome de Usher (USH)

La RP es una entidad clínica que afecta aproximadamente a 1 de cada 5000 personas en todo el mundo, lo que la convierte en la enfermedad hereditaria más común de la retina. Puede provocar clínica sola representando la mayoría de los casos con un 70-80%, o bien ocurrir junto a una enfermedad sistémica siendo la forma más comúnmente asociada el USH. Las mutaciones genéticas responsables de RP afectan específicamente a los fotorreceptores bastón provocando su muerte. Los defectos se asocian con múltiples vías de lesión, incluyendo apoptosis, disfunción de los cilios y estrés del retículo endoplásmico. Aproximadamente 20% de los casos de RP son autosómicos recesivos, 10-20% autosómicos dominantes y 10% recesivos ligados al cromosoma X, siendo los casos restantes esporádicos.⁹

Se han identificado más de 67 genes causantes, destacando mutaciones en el gen RPGR que codifica una proteína cuyo papel es fundamental para mantener la integridad de los fotorreceptores y está involucrada en el transporte ciliar que es importante para el tráfico de nutrientes y otras sustancias en la retina (Figura 4) causando la RP ligada al cromosoma X (XLRP-RPGR), mutaciones en el gen MERTK que altera el proceso de fagocitosis de los fotorreceptores por parte del epitelio pigmentario de la retina, también en el gen RHO que codifica una proteína que es el pigmento visual presente en los segmentos externos de los

bastones siendo responsable del 25% de casos de RP autosómica dominante (ADRP), y mutaciones en otros genes como RLBP1 y PDE6B.^{10,25,28}

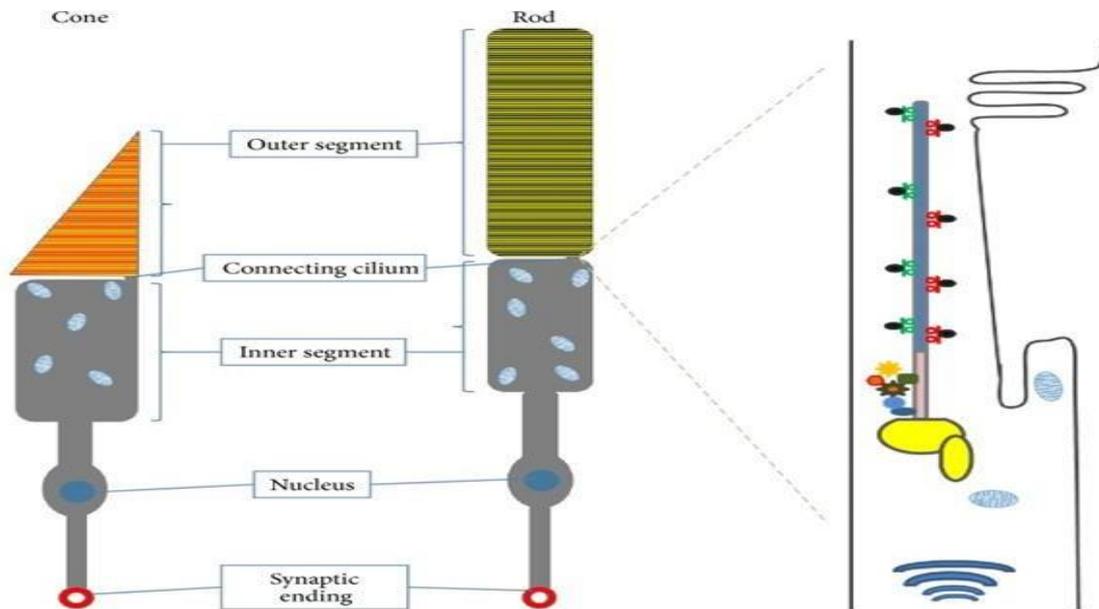


Figura 4. Papel ciliar en los fotorreceptores. Se observan las diferentes partes de cono y bastón que incluyen segmentos externo e interno, cilios, núcleos y terminación sináptica (izquierda) y el tráfico de proteínas en el cilio conectivo del fotorreceptor (derecha). Fuente adaptada: [10]

Más del 75% de individuos serán sintomáticos cuando tengan 30 años. Suele ser una afectación bilateral, siendo la primera manifestación clínica la nictalopía o pérdida de visión nocturna, continuada por un estrechamiento gradual de los campos visuales. Con el tiempo, la visión de túnel o pérdida completa de la visión pueden ser el resultado y puede desarrollarse pérdida de la discriminación del color con eventual pérdida de agudeza visual. La mayoría mantendrá cierta percepción de estímulos luminosos incluso en la etapa tardía puesto que la mácula continúa funcionando.⁹

Si bien podemos encontrar un examen externo ocular normal, tres hallazgos clínicos típicos de la RP en el fondo de ojo constituyen la “tríada clásica” y son la presencia de pigmentación de la espícula ósea, estrechamiento vascular y palidez del nervio óptico (Figura 5).^{9,11}

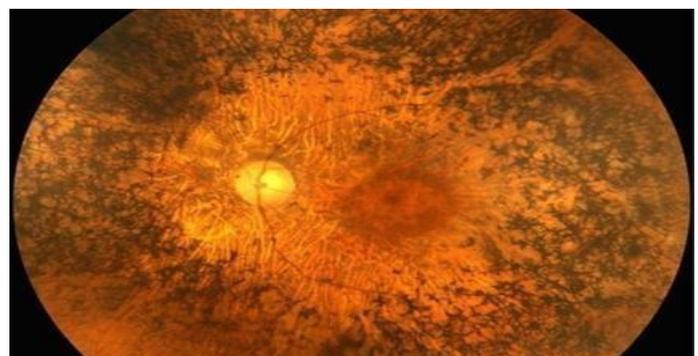


Figura 5. Fondo de ojo en RP. Se observan las típicas alteraciones pigmentarias, atrofia del nervio óptico y atenuación vascular generalizada. Fuente: [11]

Los depósitos pigmentarios de melanina, denominados así por su característica forma estrellada de espícula ósea, se deben a las células epiteliales pigmentarias retinianas, que son desprendidas y migran a ubicaciones perivasculares en la retina, y estos pueden no evidenciarse al principio de la enfermedad. Otros hallazgos que podemos encontrar incluyen cataratas subcapsulares y edema macular. Los pacientes con RP tienen un mayor riesgo de queratocono comparado con la población general al igual que más errores refractivos. Otros métodos diagnósticos de utilidad son la electrorretinografía (ERG) que detecta las anomalías en la respuesta eléctrica de los fotorreceptores precozmente y la oftalmoscopia láser de barrido de óptica adaptativa (AOSLO) que detecta el daño de los bastones al principio de la RP.⁹

El USH tiene una prevalencia de entre 4 y 17 por cada 100 000 personas en todo el mundo representando el 5% de todos los casos de sordera congénita. Los genes Usher codifican varias proteínas que se expresan en el oído interno y la retina, donde realizan funciones vitales en el desarrollo y la función sensorial de las células ciliadas y el mantenimiento de fotorreceptores. Se han identificado 10 genes causantes de USH, con MYO7A que representa >50% del tipo 1 y USH2A contribuye al 80% del USH tipo 2.

Este síndrome implica una combinación de pérdida auditiva neurosensorial bilateral con un fondo de ojo que incluye hallazgos similares a RP con atrofia o despigmentación del EPR. La autofluorescencia del fondo de ojo (FAF) muestra un anillo de hiperautofluorescencia en la mácula y la tomografía de coherencia óptica de dominio espectral (SD-OCT) revela pérdida de estructura externa retiniana preservando la fovea hasta el final de la enfermedad. Otras pruebas de utilidad son la angiografía por tomografía de coherencia óptica (OCTA) que mostró una densidad de vasos retinianos reducida con cambios en el plexo capilar superficial y profundo, y la perimetría estática y dinámica que detectó pérdida de visión periférica.¹²

3.3. Amaurosis congénita de Leber (LCA)

LCA es una de las formas más tempranas y graves de retinopatías hereditarias. Representa el 5% de todas ellas con una prevalencia de 1/81.000 a 1/30.000 y constituye el 20% de la ceguera en niños en edad escolar.

Se han identificado 19 tipos de LCA con mutaciones en genes específicos que se heredan la mayoría con patrón autosómico recesivo. Las mutaciones más comunes que ocurren con una frecuencia de aproximadamente 10% o más, incluyen GUCY2D, RPE65, CEP290, y otros genes como CRB1 y RDH12. GUCY2D es el primer gen identificado en LCA, que codifica la guanilato ciclasa-1 retiniana involucrada en la fototransducción y es expresado en el segmento externo del fotorreceptor con un nivel más alto en los conos. La mutación en este gen representa el 6-21% de los casos de LCA, siendo responsable del tipo 1. El gen RPE65 codifica la isomerasa retinoide, que es una enzima expresada abundantemente en el EPR y responsable del metabolismo de la vitamina A en el ciclo retinoide, resultando la deficiencia en una falta de regeneración de 11-cis-retiniana. La mutación en este gen representa el 4-16% de los casos de LCA, produciendo LCA tipo 2. El gen CEP290 codifica una proteína que se localiza en los segmentos de los fotorreceptores que conectan el cilio siendo responsable de su formación, estabilidad y función de transporte. Las mutaciones en CEP290 se asocian con varias enfermedades sistémicas y es la causa más común de LCA tipo 10 en caucásicos, representando en estos el 15-30%.

Generalmente los pacientes con LCA presentan mala visión y nistagmo o la ausencia de fijación a las 6 semanas de edad. La pérdida de visión varía desde la agudeza visual funcional hasta percepción de la luz solamente, y aproximadamente tres cuartas partes son estacionarios. La fluctuación es observada puntualmente en la primera o segunda década de la vida hasta que se produce un deterioro progresivo. El error refractivo más común es la hipermetropía, especialmente con la mutación del gen GUCY2D, el paciente puede cursar con fotofobia o nictalopía, y el queratocono y las cataratas juveniles son unas de las complicaciones oculares asociadas.¹³

La respuesta de ERG no detectable es típica en LCA, pero podría detectarse una respuesta de cono residual con mutación en GUCY2D y una de bastón residual en RPE65. La imagen del fondo de ojo y la FAF parecen casi normales en la mayoría de los casos en la infancia (Figura 6), pero aún así existen distintos hallazgos diagnósticos como pigmentación periférica y maculopatía central con o sin patrón de ojo de buey. También existen casos con despigmentación en el fondo de ojo, FAF reducida, atenuación vascular o edema pseudopapilar.^{13,14}



Figura 6. Fondo de ojo en LCA. Se visualizan de izquierda a derecha, LCA tipo 1 con una apariencia normal, LCA tipo 2 con ligera atenuación vascular y LCA tipo 10 con cambios pigmentarios periféricos y vasos atenuados. Fuente adaptada: [14]

La SD-OCT revela una estructura anatómica alterada que incluye disminución del grosor en diferentes capas, especialmente la capa nuclear externa, pérdida de integridad en la zona elipsoide que es la que comunica segmentos externos e internos de los fotorreceptores y atrofia macular desorganizada. Se puede encontrar una fovea relativamente preservada en las mutaciones GUCY2D y RPE65.¹³

3.4. Coroideremia (CHM)

La CHM es una retinopatía rara manifestada como un trastorno degenerativo progresivo de la capa fotorreceptora, el EPR y la coroides con una prevalencia de 1 entre 50.000-100.000.

Es un trastorno hereditario recesivo ligado al cromosoma X causado por mutaciones en el gen CHM habiéndose identificado 280 variantes distintas. Como resultado se produce una alteración en la producción de la proteína de escolta Rab 1 (REP1) la cual tiene un papel esencial en el tráfico intracelular de proteínas, sustratos y orgánulos, siendo este un proceso regulado por pequeñas proteínas de unión al trifosfato de guanósina (GTP), las proteínas Rab. Estas últimas requieren una modificación lipídica apropiada denominada prenilación lográndose a través de la enzima geranyl-geranilo transferasa 2 (GGTasa2) y la unión de REP1 a las proteínas Rab es el primer paso crucial. La proteína Rab prenilada se escolta por REP1 y es entregada al compartimento intracelular objetivo (Figura 7).

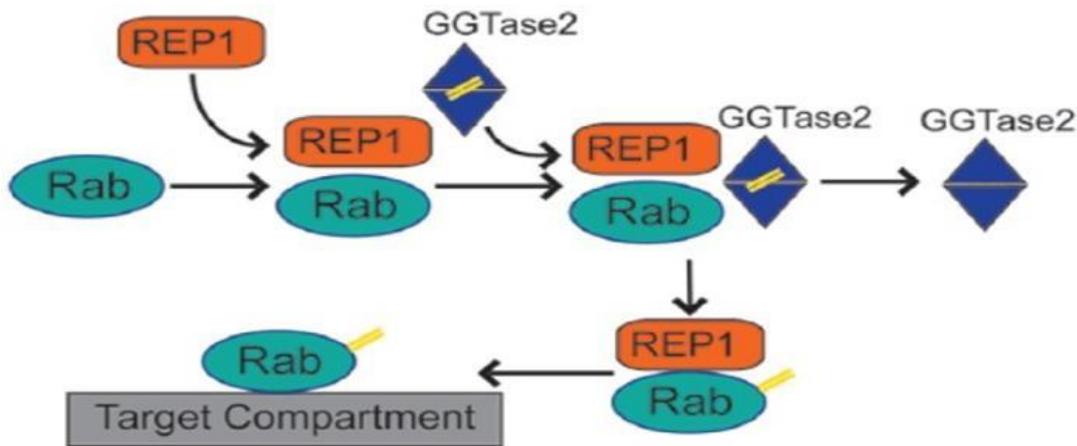


Figura 7. Vía de prenilación de las proteínas Rab. Las proteínas Rab requieren modificación lipídica (líneas amarillas dobles). REP1 se une a las proteínas Rab y facilita la interacción con la enzima GGTase2. Esta enzima realiza la prenilación y posteriormente REP1 suministra las proteínas Rab modificadas al compartimento intracelular objetivo. Fuente: [15]

En general, los pacientes muestran un patrón bilateral y simétrico de afectación ocular. Los pacientes masculinos afectados experimentan síntomas de nictalopía durante la primera década de la infancia. La pérdida progresiva del campo visual periférico continúa hasta la edad adulta culminando en la pérdida legal de la visión central alrededor de la quinta o sexta décadas. Las mujeres portadoras generalmente no presentan síntomas y son capaces de retener una buena agudeza visual durante toda la vida.¹⁵

En el examen del fondo de ojo durante las primeras etapas, se puede observar aglutinación pigmentaria periférica en EPR que evoluciona progresivamente hacia distintas áreas de atrofia coriorretiniana con exposición de la esclerótica y vasos coroideos visibles. También existen cambios atróficos similares en la región peripapilar con algunos pacientes albergando una isla central de tejido retiniano relativamente preservado incluso en etapas avanzadas (Figura 8). Además hay un agotamiento gradual de los coriocapilares que explica el flujo disminuido detectado en la OCTA mientras que los grandes vasos coroideos y retinianos no parecen afectados. Las pruebas de campo visual confirman la pérdida simétrica de visión correspondiente a las áreas de degeneración y la ERG muestra hallazgos anormales en pacientes masculinos durante la etapa temprana de la enfermedad. Otros hallazgos oftalmológicos en CHM incluyen

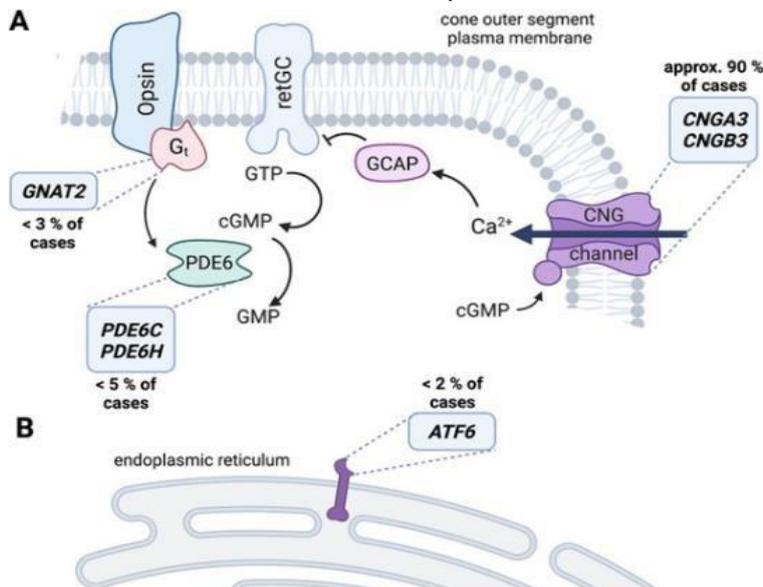
cataratas subcapsulares posteriores, edema macular y neovascularización coroidea.^{15,16}



Figura 8. Fondo de ojo y autofluorescencia en CHM. En la izquierda se observa el fondo de ojo con pigmentación ligera, áreas de degeneración coriorretiniana y preservación de vasos coroideos profundos y en la derecha una imagen de autofluorescencia con la mácula central preservada. Fuente adaptada: [16]

3.5. Acromatopsia (ACHM)

La ACHM es una enfermedad rara heredada de manera autosómica recesiva que afecta aproximadamente a una de cada 30.000 personas. La diferencia con el daltonismo sería que en este las mutaciones y reordenamientos en los genes no afectan a la función principal de los fotorreceptores. Actualmente se vinculan seis genes a ACHM, constituyendo el 90% de los casos mutaciones en CNGA3 y CNGB3, que se encargan de codificar las subunidades alfa y beta del canal heterotetramérico activado por nucleótidos cíclicos (CNG) que se localiza en la



membrana plasmática del segmento externo del cono. CNGA3, CNGB3, ATF6, GNAT2, PDE6C y PDE6H son los otros genes que se conocen. Con la excepción de ATF6, todos los demás genes ACHM codifican componentes fundamentales de la cascada de señales de la fototransducción (Figura 9).

Figura 9. Genes conocidos de ACHM y sus funciones. Vemos en A que la mayoría de genes codifican proteínas implicadas en la fototransducción y en B como ATF6 es el único que no lo hace. Fuente: [18]

ATF6 por otra parte codifica un factor de transcripción transmembrana localizado en el retículo endoplásmico.¹⁸

La pérdida de la función fotorreceptora del cono se manifiesta en el nacimiento o temprano en la infancia y resulta en una disminución de la agudeza visual, falta de discriminación del color, fotofobia, movimiento ocular involuntario rápido (nistagmo) y escotoma central pequeño, siendo común la hipermetropía. Resulta importante conocer la historia clínica y familiar para establecer el diagnóstico. El fondo de ojo suele ser normal y la ERG adaptada a la luz estará severamente reducida o ausente con una señal escotópica preservada en gran parte.^{17,18}

3.6. Enfermedad de Stargardt (STGD1)

STGD1 es la causa más frecuente de distrofia macular juvenil, es heredada con un patrón autosómico recesivo y su prevalencia es muy baja. Se debe a mutaciones en el gen ABCA 4 que codifica para la proteína RmP, una proteína de casete de unión al trifosfato de adenosina (ATP) de la retina, la cual está presente en el segmento externo de los fotorreceptores y participa en el metabolismo de la vitamina A que está relacionado con el ciclo visual. La ausencia de esta proteína conduce a una serie de reacciones que terminan con la acumulación del compuesto A2E y que conduce a la formación de lipofuscina, un producto de desecho metabólico que se acumula en las células del EPR y es responsable de formar manchas. Los altos niveles de A2E disminuyen la fagocitosis por parte de las células del EPR, produciendo la atrofia de este y la muerte celular de los fotorreceptores.

Los pacientes presentan discapacidad visual progresiva normalmente a partir de la primera o segunda década de vida siendo la presentación más frecuente una pérdida de visión central bilateral, progresiva e indolora. La agudeza visual es muy variable entre los pacientes. Los otros síntomas de presentación son escotoma central, retraso en la adaptación a la oscuridad, fotopsias, fotosensibilidad y visión anormal del color.¹⁹

Inicialmente se puede tener un fondo de ojo normal, pues hasta un tercio de los niños pueden no tener manchas retinianas, que se desarrollan con el tiempo asociadas al aumento de la atrofia macular. En la enfermedad de inicio muy temprano en la infancia con visión preservada, también se pueden observar

puntos finos blanco-amarillentos simétricos en la mácula central. Se observa una FAF central reducida rodeada por una señal aumentada o con una apariencia similar a la maculopatía en el ojo de buey (Figura 10).^{19,20}

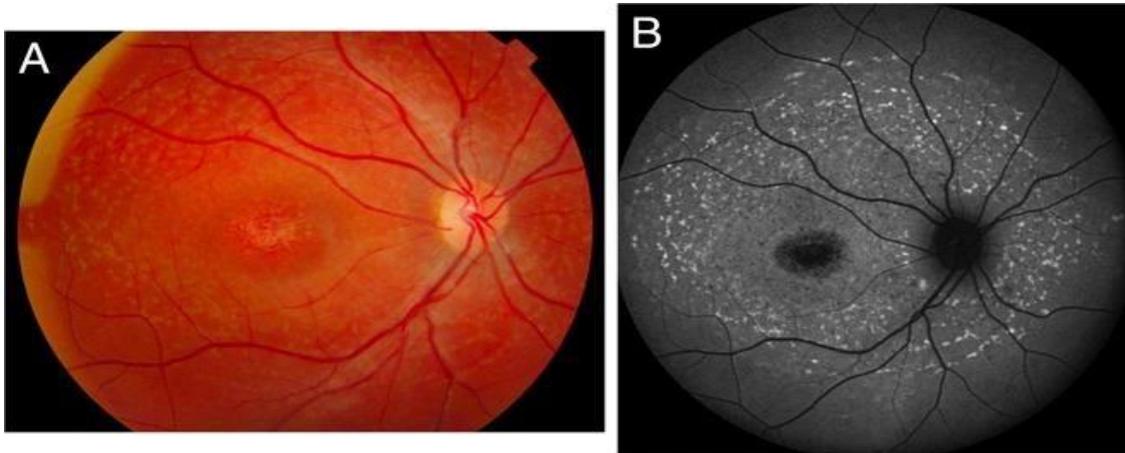


Figura 10. Se observa en A el fondo de ojo en color de SGTD1 con manchas retinianas típicas blanco-amarillentas y atrofia macular, y en B la autofluorescencia del fondo de ojo reducida en la mácula central estando rodeada por una señal aumentada. Fuente: [20]

En la angiografía con fluoresceína de fondo de ojo se encuentra un hallazgo distintivo, la "coroides oscura", que aparece como un vaso sanguíneo retiniano que resalta ante una coroides hipofluorescente. Se considera una característica diagnóstica y está presente en el 80% de los pacientes. SD-OCT revelará la pérdida de la arquitectura que comienza en la mácula central con preservación relativa de la mácula periférica al principio. Los hallazgos de la OCT incluyen adelgazamiento de la capa nuclear externa, alteración de la zona elipsoide y un engrosamiento de la membrana limitante externa. La sensibilidad macular en microperimetría se reduce en áreas con manchas y autofluorescencia anormal.¹⁹

3.7. Retinosquiasis ligada al cromosoma X (XLRS)

Es la enfermedad retiniana hereditaria más frecuente en pacientes varones jóvenes, representando aproximadamente el 5% de todas las ellas, de inicio en la infancia y con una prevalencia aproximada de 1 entre 15.000-30.000. Está causada por mutaciones en el gen de la retinosquiasina-1 (RS1) que se expresa en fotorreceptores y células bipolares cuya función es la adhesión de las células de la retina. Las variantes de retinosquiasina-1 interrumpen el ensamblaje de subunidades proteicas y conducen a la división de las capas de la retina.

Generalmente se presenta en la primera o segunda década con manifestaciones variables incluyendo agudeza visual deficiente, estrabismo, anisometropía y pérdida visual inexplicable. Durante el curso de la enfermedad, pueden ocurrir complicaciones secundarias tales como hemorragia vítrea, neovascularización retiniana o desprendimiento de retina.

El diagnóstico de XLRS se basa en los hallazgos clínicos y antecedentes familiares pudiéndose confirmar mediante la detección de la variante RS1 patológica con un análisis genético. El fondo de ojo puede revelar los pliegues típicos de ruedas de radios o esquisis macular, puntos blancos finos parecidos a depósitos de drusas, cambios en EPR inespecíficos y atrofia macular, esta última en individuos mayores. Mediante OCT se ha notificado foveosquisis entre el 78% y el 81% de los pacientes e identificado quistes intrarretinianos. Las cavidades de esquisis se encuentran en cualquier capa de la retina como la capa de fibras nerviosas, de células

ganglionares, nuclear interna, plexiforme externa y nuclear externa. También se observan cambios en la zona de interdigitación ubicada entre el EPR y los segmentos externos de fotorreceptores, la zona elipsoide y la membrana limitante externa. Gracias a SD-OCT se obtienen imágenes FAF de alta resolución identificando 4 patrones característicos de XLRS (Figura 11).²¹

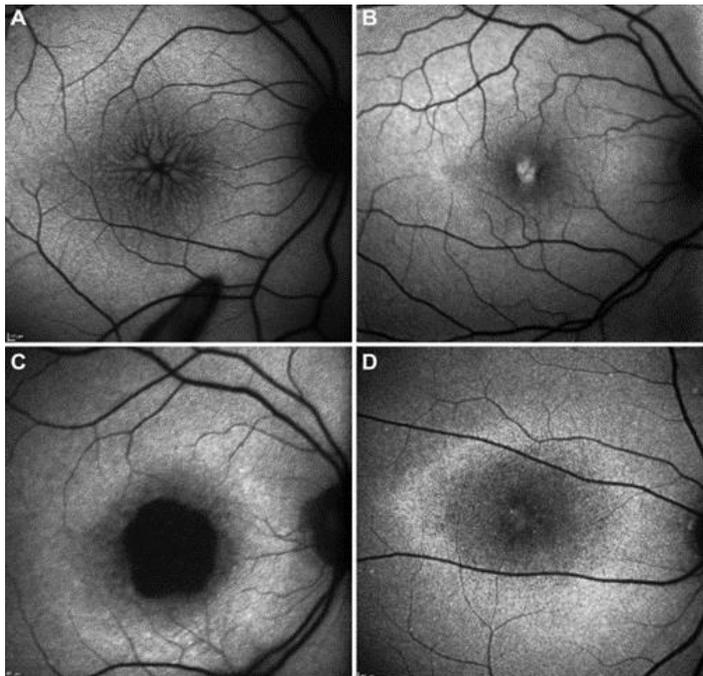


Figura 11. Autofluorescencia del fondo de ojo mostrando patrones de XLRS. A rueda de radios, B aumento de señal central, C reducción central de señal y D anillo de aumento de señal. Fuente: [21]

3.8. Neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON)

Es la enfermedad mitocondrial más frecuente con una prevalencia de 1 entre 45.000 con una fuerte preponderancia masculina (80% a 90%) y una edad de inicio entre 15 y 35 años, asociada con mutaciones puntuales en el ADN

mitocondrial (ADNmt) heredándose por tanto por vía materna. Estas mutaciones afectan a genes de la subunidad del complejo I de la cadena respiratoria llevando a la degeneración selectiva de las células ganglionares de la retina y atrofia óptica dentro de un año desde el inicio de la enfermedad, produciéndose la alteración más frecuente en la nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa subunidad 4 (ND4).^{22,28}

En la mayoría de pacientes con LHON la disfunción visual es la única manifestación significativa. Generalmente se presenta como pérdida visual central, indolora y subaguda de forma unilateral. Semanas o meses después el segundo ojo es involucrado y dentro de 1 año el 97% de los afectados tendrán compromiso de este. Aproximadamente el 25% presenta pérdida de visión simultánea bilateral progresando la mayoría de los individuos a una agudeza visual 10 veces menor de lo normal. Debido a la afectación predominante del haz papilomacular, la anomalía más temprana en el campo visual es un escotoma cecocentral que se puede agrandar para convertirse en un defecto central aún mayor. La discromatopsia es común y los reflejos lumínicos pupilares suelen permanecer intactos.

El fondo de ojo puede ser normal en el 30% de las personas en la etapa activa de pérdida de visión, pudiendo retrasar el diagnóstico. Antes o durante la etapa aguda de la pérdida de visión muestra unos hallazgos característicos tales como hiperemia del disco óptico, vasos sanguíneos telangiectásicos peripapilares, tortuosidad vascular e hinchazón de la capa retiniana de fibras nerviosas alrededor del disco óptico sin la correspondiente fuga en angiografía con fluoresceína (llamada a veces "pseudoedema"). Puntualmente, a medida que la enfermedad progresa, la hiperemia del disco, las telangiectasias peripapilares y el pseudoedema consiguen resolverse. Aproximadamente 6 semanas después de perder la visión, se desarrolla palidez discal, produciéndose la muerte de las células ganglionares retinianas en la fase atrófica crónica (Figura 12). En la OCT en fase aguda, la capa de fibras nerviosas de la retina está engrosada consistente con la participación predominante temprana del haz papilomacular de las células ganglionares, luego se adelgaza en la fase crónica en los meses posteriores al inicio de la pérdida visual y el grosor macular puede adelgazarse antes de la capa de fibras. Los potenciales evocados visuales y la ERG a

menudo son anormales reflejando la degeneración de la fibra del nervio óptico y la pérdida de células ganglionares de la retina, respectivamente.^{22,23}

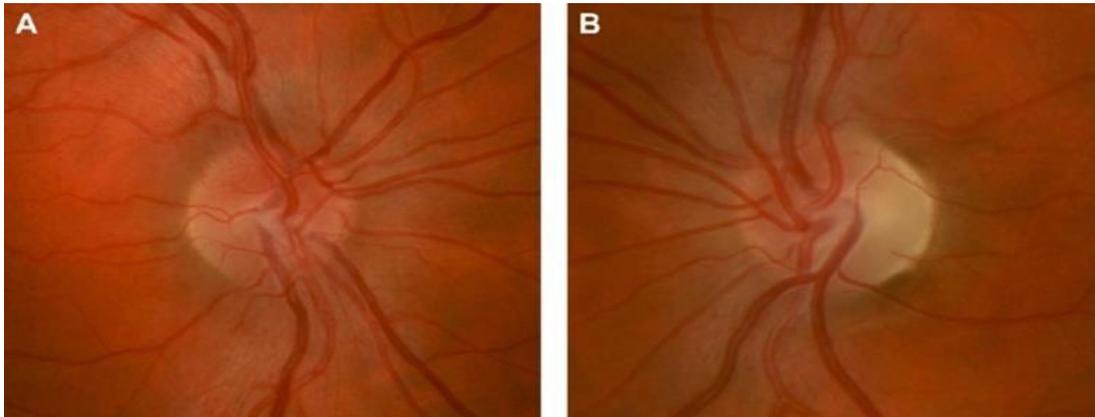


Figura 12. Fondo de ojo en LHON. Se visualiza en A el nervio óptico derecho con hiperemia leve, borrosidad del margen discal e hinchazón de la capa peripapilar de la fibra nerviosa de la retina y en B el nervio óptico izquierdo con una palidez prominente por atrofia de la capa de fibras nerviosas. Fuente: [23]

4. TERAPIA GÉNICA

4.1. Introducción (concepto, tipos, aplicaciones y vectores)

La terapia génica consiste en la transferencia o introducción de material genético (ácido nucleico) a una célula eucariótica con el objetivo de alterar el curso de una enfermedad o corregir una alteración metabólica o genética. Es una estrategia que se basa en modificar el repertorio genético de células mediante la administración de ADN o ARN dirigida a curar enfermedades de origen tanto hereditario como adquirido.

A partir de 1990, los protocolos experimentales y clínicos de este tratamiento registrados y aprobados por la Food and Drug Administration (FDA), de Estados Unidos, aumentaron crecientemente. En su mayoría, estos protocolos de terapia génica están dirigidos al tratamiento del cáncer (64.5%), enfermedades monogénicas (8.5%), infecciosas (8%) y vasculares (8.4%). Respecto al vector utilizado para el envío del gen terapéutico, los más utilizados son los adenovirus seguidos por los retrovirus, ADN desnudo/plasmídico, virus adenoasociados y el resto se constituye por otras estrategias como el ARN de interferencia (ARNi) (Figura 13).²⁴

PABLO DÍAZ FERNÁNDEZ
 TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE RETINOPATÍAS

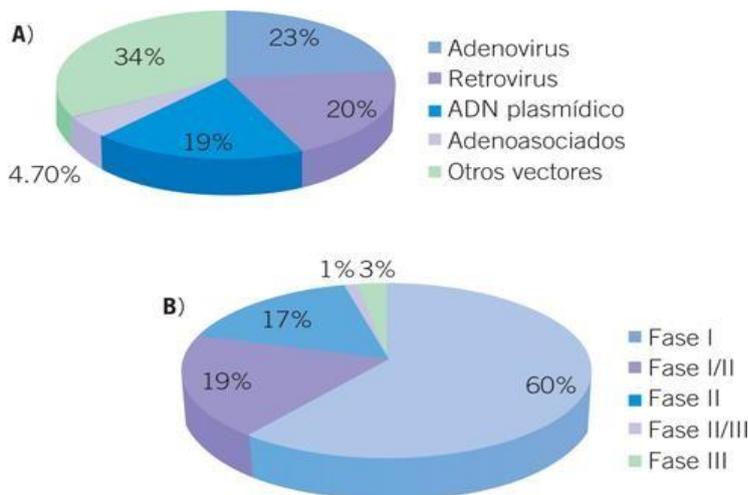


Figura 13. Registro de protocolos clínicos ante la FDA. En A se observa el porcentaje de cada vector utilizado para los protocolos de terapia génica y en B los porcentajes de protocolos según la fase de aplicación-comercialización en la que están. Fuente adaptada: [24]

La terapia génica se puede clasificar según las células a las que es aplicada en dos categorías. La terapia génica en células germinales, también llamada terapia eugénica, se dirige a células germinales (espermatozoides y óvulos). Al insertar genes en este tipo celular se provoca un cambio genético permanente en el organismo, adquiriendo las generaciones posteriores la modificación genética. Este tipo de terapia no está permitida en humanos, debido a las grandes implicaciones éticas que conlleva. La terapia génica en células somáticas es una estrategia en la que uno o más tejidos son sometidos a esta terapia mediante administración sistémica, tratamiento directo o extirpación previa del tejido, involucrando la transfección de material genético en prácticamente cualquier célula del organismo y es la que se aplica en los protocolos clínicos.

Según la metodología empleada para introducir el gen terapéutico esta terapia es dividida en tres categorías. La terapia génica ex vivo se basa en la obtención y aislamiento de un tipo celular específico del paciente a tratar, estas células son cultivadas en el laboratorio y allí se las introduce el gen terapéutico con ayuda de un vector. Una vez se tiene la certeza de que las células expresan el gen terapéutico se introducen nuevamente al paciente. La terapia génica in vivo consiste en la introducción directa del gen terapéutico al torrente sanguíneo del paciente que se va a tratar, que llegará al órgano blanco, o bien se administra directamente en el órgano o tejido blanco dentro del organismo. La terapia génica in situ lleva a cabo una microinyección que introduce el ácido nucleico directamente en la célula, para conseguir la obtención de organismos recombinantes (Figura 14).²⁴

PABLO DÍAZ FERNÁNDEZ
TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE RETINOPATÍAS

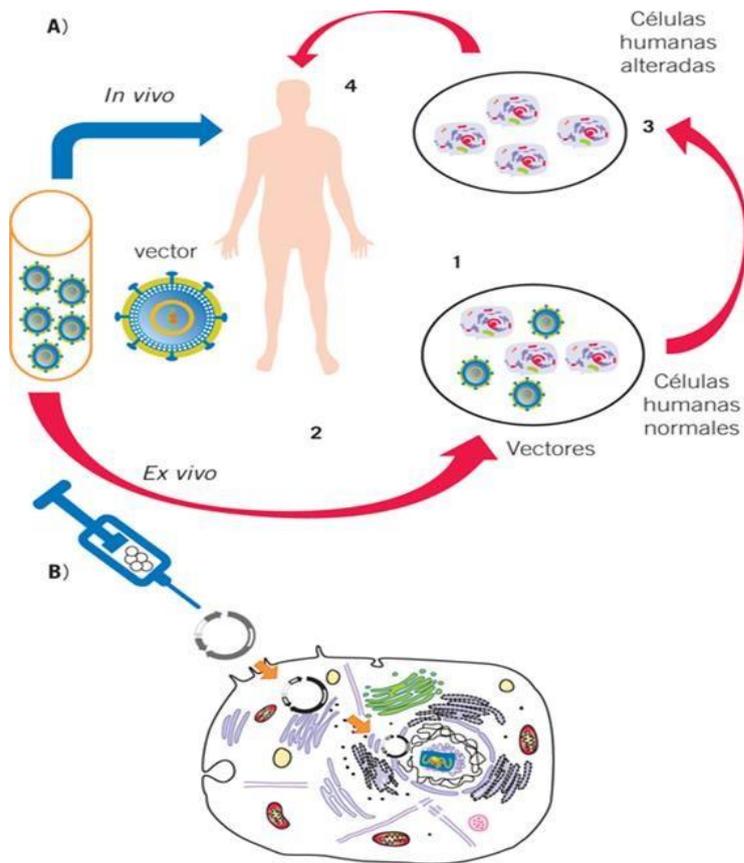


Figura 14. Modelos de terapia génica. En A la terapia génica in vivo aplica directamente vectores que contienen el transgén que se quiere administrar al paciente y el vector podrá transducir sus células diana. La terapia génica ex vivo administra los genes a las células extraídas del paciente 1, estas células son mezcladas con un virus modificado, de manera que no pueda reproducirse y transporte el gen de interés 2, lo que conlleva una alteración genética de las células del paciente 3, las cuales son trasplantadas nuevamente al paciente para producir la proteína buscada 4. En B la terapia génica in situ administra el transgén directamente en el interior celular, implicando generalmente el uso de vectores que se administran mediante microinyecciones al núcleo celular. Fuente adaptada: [24]

Los métodos utilizados para la transferencia de genes a células somáticas se dividen en dos categorías: vectores no virales y virales. Respecto a la transferencia de genes por un vector no viral o transfección, los métodos no virales basan su acción en entregar directamente la información genética dentro de la célula blanco, y si bien muestran una baja toxicidad y, en general, tienen un coste bajo, la transferencia de genes suele ser ineficiente y transitoria. Los vectores no virales transfieren plásmidos de ADN o pequeñas moléculas de ADN y ARN mediante métodos físicos o químicos. Los métodos físicos que se utilizan incluyen electroporación, hidroboración, sonoporación, agujas y balística de ADN, y los químicos incluyen el uso de vectores tales como partículas inorgánicas, partículas peptídicas, lípidos o polímeros. En lo referente a la transferencia génica por vectores virales o transducción, estos son virus que se manipulan genéticamente para eliminar su capacidad autorreplicativa y para que en su genoma puedan incorporar genes terapéuticos. Dentro de la célula pueden quedarse en el episoma extragenómico o integrarse al genoma de esta, para luego emplear la maquinaria enzimática celular y producir la proteína transgénica deseada. Estos vectores emplean mecanismos naturales de infección viral para

introducirse en la célula (generalmente a través de receptores celulares) e introducir el gen terapéutico que contienen. Ofrecen grandes ventajas respecto a los no virales y suelen presentar una habilidad elevada para transducir células, por lo que son de elección para protocolos clínicos de terapia génica in vivo.^{24,25}

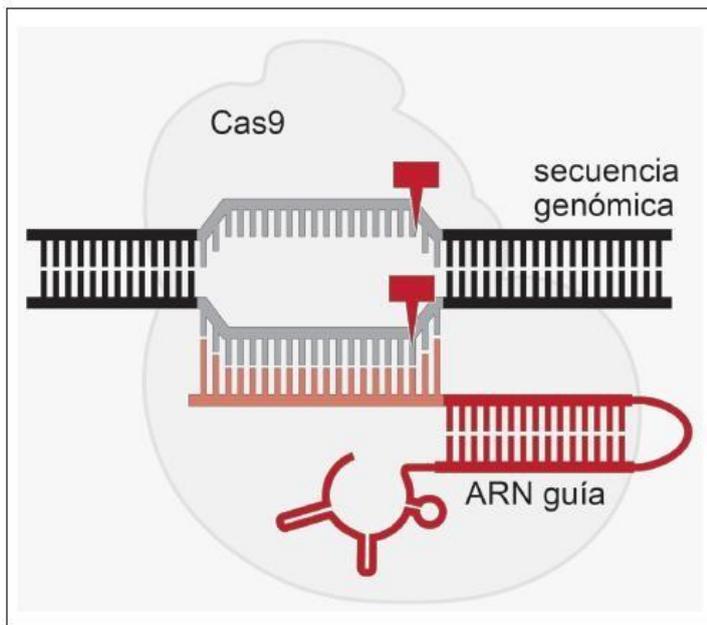
4.2. Mecanismos de terapia génica ocular

El ojo se considera un órgano ideal para la terapia génica, atribuyéndose al hecho de su pequeño tamaño, está aislado y es de fácil acceso, tiene una barrera hemato-retiniana o barrera de transporte especializada que lo convierte en inmunoprivilegiado, y el otro ojo sirve de control, requiere una dosis baja de vectores y hay escasa o ninguna posibilidad de infección sistémica utilizando los virales.^{25,28}

La terapia de reemplazo génico actualmente es la base de la mayoría de ensayos clínicos activos para retinopatías hereditarias. Este enfoque de aumento de genes se usa más comúnmente para trastornos autosómicos recesivos. En estos un defecto o ausencia de una sola copia del gen lleva a una mutación de pérdida de función y, por tanto, a una cantidad inadecuada de síntesis de proteínas. La copia anormal del gen se reemplaza por la copia normal a través de vectores terapéuticos y este gen terapéutico se puede transferir como ARNm o como copia de ADN. El ADN debe ser inyectado directamente en el núcleo celular. También consigue aumentar la producción sostenida de la proteína, por lo que es de elección. La desventaja del aumento de genes es que no puede usarse en una retina que ya está degenerada.^{25,28}

El mecanismo de silenciamiento génico o edición génica es utilizado para enfermedades hereditarias autosómicas dominantes donde la mutación es de ganancia de función. En estas patologías se produce la expresión de proteínas no deseadas o productos del gen mutado. El objetivo consiste en evitar que el gen mutado exprese y codifique la proteína no deseada, pudiendo ser alelo específico dirigiéndose solo al alelo mutado del gen, o no específico, donde tanto el alelo mutado como el alelo funcional son silenciados y mediante aumento de genes se reemplazan por el gen normal. Se puede realizar en tres niveles de maquinaria genética: ADN, ARN y transcripción.²⁵

Las técnicas de edición del genoma basadas en ADN utilizan el sistema CRISPR/Cas9. CRISPR son repeticiones palindrómicas cortas agrupadas de manera regular e interespaciadas de ADN procariota. El genoma del virus sigue cada secuencia repetitiva de una infección anterior que se conoce como ADN espaciador. Cas9 es una proteína 9 que se asocia a CRISPR y que corta de manera específica el ADN en estos sitios de reconocimiento, llevando al



silenciamiento génico. En su uso para la edición del genoma, la endonucleasa Cas9, junto con el ARN guía, es inyectada en el núcleo de las células diana. En la Figura 15 la endonucleasa Cas9 guiada por ARN corta el ADN bicatenario en los sitios específicos y activa el sistema de reparación del ADN.^{25,26}

Figura 15. Componentes de CRISPR/Cas9. Este sistema tiene la nucleasa Cas9 y un ARN guía que, por su secuencia, la dirige hacia la región genómica a editar. Fuente: [26]

Las técnicas de edición del genoma basadas en ARN funcionan eliminando moléculas de ARNm o impidiendo su traducción.

La interferencia de ARN (ARNi) es una técnica de silenciamiento génico post-transcripcional que emplea ARN interferente pequeño (ARNip) específico de secuencia para escindir ARN objetivo y evitar la expresión génica. El oligonucleótido antisentido lo componen hebras complementarias de la molécula de ARNm objetivo y causa la regulación negativa de expresión génica mediante dos mecanismos. Un oligonucleótido antisentido se une al ARNm objetivo formando un complejo, y este se escinde por la actividad RNaseH1. El otro mecanismo actúa inhibiendo la traducción, evitando por ejemplo el empalme de exones o la desestabilización del ARN.²⁵

4.3. Vectores más utilizados en retinopatías y vías de administración

Para la terapia génica ocular se utilizan los vectores virales que cuentan con unas características distintivas. Los adenovirus (AV) son un tipo de virus con doble cadena de ADN, con una capacidad para embalar material genético de 8 kb, es altamente inmunogénico, es posible la mutagénesis en la inserción, presenta una serie de ventajas como la transducción de la mayoría de tejidos, especialmente de la retina y el segmento anterior del ojo, y es de fácil manipulación genética y tiene de desventajas las respuestas inflamatorias fuertes, su patogenicidad y la infección sistémica. Los virus adenoasociados (AAV) presentan ADN de cadena simple con una capacidad para cargar material genético de menos de 5 kb, es ligeramente inmunogénico, la mutagénesis insercional es menos probable al entregar materiales en el episoma circular extragenómico, como ventajas no es inmunogénico ni patogénico con una expresión génica estable a largo plazo y de desventajas encontramos la incapacidad para transportar material genético de gran tamaño. Los lentivirus (LV) son virus con ARN de cadena sencilla, embalan material genético de 8 kb, es moderadamente inmunogénico, hay alta probabilidad de que integre el ADNc (ADN complementario) en el cromosoma de la célula diana, cuenta con la ventaja de empaquetar genes terapéuticos de gran tamaño con la expresión génica sostenida y la desventaja de inducir oncogénesis (Tabla 1).²⁵

Los vectores virales adenoasociados recombinantes (rAAV) son los que se utilizan principalmente para administrar ADN complementario de tipo salvaje (ADNc) en ensayos de aumento de genes para retinopatías hereditarias. El serotipo AAV2 es el más estudiado y utilizado en los ensayos clínicos. Con menos anticuerpos neutralizantes contra AAV8 comparado con AAV2 en la población general, AAV8 es un serotipo alternativo que se adopta más en la investigación preclínica y clínica para disminuir las posibilidades de respuesta inmune. Los vectores AAV duales de gran capacidad pueden ampliar las aplicaciones del método de inyección que permite la transducción de células externas de la retina y almacenar transgenes de mayor tamaño. También están desarrollándose sistemas de administración no virales, como vectores basados en nanopartículas para conseguir la reducción potencial de riesgos inflamatorios mientras se portan transgenes más grandes.²⁸

PABLO DÍAZ FERNÁNDEZ
TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE RETINOPATÍAS

Vectores virales	AV	AAV	LV
Tipo de virus	Virus con cadena doble de ADN	Virus con cadena simple de ADN	Virus con cadena simple de ARN
Embalaje de material genético	8 kb	Menos de 5 kb	8 kb
Inmunogenicidad	Alta	Ligera	Moderada
Mutagénesis insercional	Posible	Menos probable al entregar materiales en episoma circular extragenómico	Alta probabilidad de que integre el ADNc en el cromosoma de la célula diana
Ventajas	Transducción de la mayoría de tejidos, especialmente de la retina y el segmento anterior, fácil manipulación genética	No inmunogénico ni patogénico, expresión génica estable a largo plazo	Empaqueta genes terapéuticos de gran tamaño con expresión génica sostenida
Desventajas	Respuestas inflamatorias fuertes, patogenicidad e infección sistémica	Incapacidad para transportar material genético de gran tamaño	Inducción de oncogénesis

Tabla 1. Características de los vectores virales. Se observan las diferencias entre los tres tipos principales. Fuente adaptada: [25]

Desde la perspectiva de un cirujano, el ojo tiene fácil accesibilidad usando técnicas mínimamente invasivas con sus medios transparentes que posibilitan una visión directa del campo quirúrgico. El cirujano cuenta con dos opciones principales para administrar una solución vectorial a la retina, bien inyectándola en el cuerpo vítreo que llena el núcleo del ojo, empleando el enfoque intravítreo (IVT), o bien inyectando la solución debajo de la retina sensorial, en un espacio potencial entre los fotorreceptores y el EPR, con la inyección subretiniana (RS).

La inyección IVT es uno de los procedimientos de cirugía ocular más realizados en el mundo desarrollado, superado solo por la cirugía de cataratas. En esta modalidad se inserta una aguja de calibre 30 a través de la esclerótica en la pars plana del ojo (Figura 16). La inyección RS suele hacerse con una vitrectomía de pars plana de tres puertos, utilizando principalmente sistemas de trócar estándar. Después del desprendimiento exitoso de la membrana hialoidea posterior ocular y extracción del vítreo, es insertada una aguja 23G de doble cañón con punta a través del trócar. La punta se guía al área subretiniana y se hace una pequeña

PABLO DÍAZ FERNÁNDEZ
TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE RETINOPATÍAS

infusión de solución salina equilibrada en el espacio subretiniano para formar una ampolla. Una vez formado este espacio y la localización de la ampolla se encuentra dentro de la región objetivo (Figura 16), la misma retinotomía (canal de inyección a través de la neurorretina) es utilizada para guiar un segundo instrumento con igual punta incorporada en el espacio subretiniano para inyectar el agente terapéutico utilizando un caudal controlado.

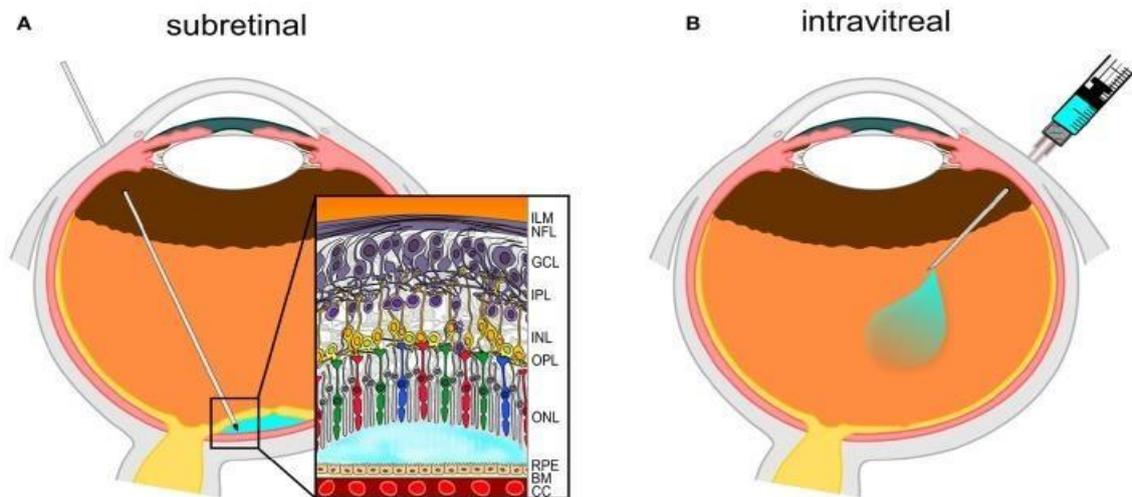


Figura 16. Vías de administración de terapia génica intraocular quirúrgica. En A se visualiza la inyección RS realizada a través de la pars plana, administrando la solución vectorial (azul claro) mediante una aguja en el espacio potencial entre el EPR y los fotorreceptores en la capa nuclear externa, y en B la inyección IVT que también emplea el acceso a la pars plana para administrar la solución en la cavidad vítrea. Fuente: [27]

Los enfoques IVT se asocian con más éxito en la transducción de células ganglionares y / o bipolares de la retina interna, mientras que las enfermedades que afectan principalmente al EPR y/o fotorreceptores se atacan de un modo más eficiente por inyecciones RS.²⁷

5. REALIZACIÓN DE TERAPIA GÉNICA EN RETINOPATÍAS HEREDITARIAS

5.1. Retinosis pigmentaria (RP) y síndrome de Usher (USH)

Se han intentado corregir diferentes formas de RP con terapia de aumento de genes mediada por AAV por parte de varios patrocinadores e investigadores.

PABLO DÍAZ FERNÁNDEZ
TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE RETINOPATÍAS

XLRP-RPGR, la cual representa un porcentaje considerable de casos RP y es fácilmente evaluable en un período de tiempo corto, ha sido objeto de búsqueda para intervenciones genéticas.

Cehajic-Kapetanovic et al. publicaron los resultados iniciales de 6 meses del primer ensayo clínico de fase I/II que consiste en evaluar la seguridad y eficacia de una inyección RS de un vector AAV8 que codifica RPGR (AAV8-coRPGR) en 18 pacientes masculinos con esta patología. Todas las dosis del vector presentaron buena tolerancia sin eventos adversos graves. Los 6 meses posteriores al tratamiento, los sujetos que recibieron dosis medias del vector obtuvieron ganancias sostenidas en las pruebas de campo visual (FV) y sensibilidad de la retina en microperimetría. Se observó un aumento del grosor de la capa nuclear externa en la OCT de los ojos tratados. Los resultados de 2 años de seguimiento ayudarán a establecer la eficacia y seguridad a largo plazo de la terapia génica AAV8-coRPGR.²⁸

Respecto a la RP asociada a MERTK, en un ensayo de fase I de escalada de dosis se evaluó la inyección RS de rAAV2-VMD2-hMERTK en 6 participantes con esta enfermedad. El tratamiento se toleró bien durante 2 años sin signos de eventos adversos oculares o sistémicos graves en la mayoría de los pacientes (Tabla 2).^{28,29}

Título de grupo	rAAV inyectado en los ojos	Ojos control
Descripción del grupo	Ojos con RP que recibieron una dosis única de inyección RS de rAAV	Ojos con RP que no recibieron inyección RS de rAAV
Nº total de participantes analizados	6	6
Medida	Participantes (porcentaje)	Participantes (porcentaje)
Anomalías corneales	1 16.7%	0 0.0%
Catarata	1 16.7%	0 0.0%
Cambios retinianos en fondo de ojo	2 33.3%	2 33.3%
Adelgazamiento macular en OCT	0 0.0%	1 16.7%

Tabla 2. Evaluación de la seguridad sistémica y ocular. Se observan los únicos eventos adversos que sufrieron los participantes del ensayo destacando su bajo porcentaje. Fuente adaptada: [29]

Tres pacientes mostraron mejorías en la agudeza visual mejor corregida (BCVA), aunque solo un paciente mantuvo la ganancia visual en 2 años de seguimiento.

Los dos pacientes con ganancias transitorias en BCVA desarrollaron cataratas bilaterales, lo que puede hacer dudar del beneficio terapéutico. Los autores plantearon que la selección de pacientes podría ser crítica en el éxito de la intervención, debido a que los sujetos con mejor función al inicio del estudio demostraron mejorías mayores. Los investigadores plantean un seguimiento a los pacientes durante 13 años adicionales.²⁸

Para la ADRP hay un ensayo clínico en curso dirigido a la mutación más común del gen RHO que es la P23H, utilizando el producto genético QR-1123, un oligonucleótido antisentido. Este consiste en una molécula de cadena simple de ADN complementaria al ARNm P23H objetivo, que actúa aumentando la expresión del tipo salvaje de la proteína RHO en los fotorreceptores retinianos. CRISPR/Cas9 también se ha utilizado terapéuticamente para este tipo de RP.²⁵

Tras alentadores estudios preclínicos, se han iniciado ensayos de terapia génica mediados por AAV en humanos para la RP asociada a mutaciones en los genes RLBP1 y PDE6B utilizando rAAV8 y rAAV2/5, respectivamente. La ARNi también se encuentra actualmente en ensayo para controlar la RP.^{25,28}

En el USH, la terapia de reemplazo génico se puede iniciar en pacientes con USH tipo 1B en el curso temprano de la enfermedad, ya que a menudo las mutaciones en el gen MYO7A se diagnostican antes de la degeneración retiniana estructural. MYO7A es un gen grande que supera la capacidad de carga de los vectores AAV, requiriendo el uso de LV y AAV duales. Los AAV tradicionales solo cuentan con capacidad de carga para 5 de los genes causantes de USH. Por otro lado, las mutaciones en el gen USH2A se benefician del uso del sistema CRISPR/Cas9 y del oligonucleótido antisentido QR-421a cuyo diseño se dirige a excluir el exón 13 (ubicación de dos de sus mutaciones comunes), en la transcripción de ARNm maduro de US2HA.^{12,28}

El primer ensayo de reemplazo de terapia génica humana en USH tipo 1B asociado a MYO7A investigó la seguridad de un vector LV administrado vía RS. Sanofi, el patrocinador, terminó cesando el estudio exploratorio y actualmente está llevando a cabo dos ensayos que investigan la tolerabilidad de la administración RS de un vector LV basado en el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) portador de MYO7A (SAR421869) para pacientes con USH tipo

1B (Tabla 3). Los hallazgos preliminares en 2015 demostraron que no hubo eventos adversos graves.^{28,30}

Título de grupo	Cohorte 1	Cohorte 2	Cohorte 3
Descripción del grupo	Los participantes recibieron una sola inyección RS de SAR421869 a la dosis objetivo de $1.4 * 10^5$ TU por ojo.	Los participantes recibieron una sola inyección RS de SAR421869 a la dosis objetivo de $4.7 * 10^5$ TU por ojo.	Los participantes recibieron una sola inyección RS de SAR421869 a la dosis objetivo de $1.4 * 10^6$ TU por ojo.
Nº total de participantes analizados	3	3	3
Medida	% de participantes	% de participantes	% de participantes
Leve	100	100	100
Moderado	0	33	67
Muy fuerte	0	0	67

Tabla 3. Porcentaje de participantes con eventos adversos emergentes del tratamiento por gravedad. La mayoría experimentaron eventos adversos leves excepto en la cohorte 3 por un gran aumento de dosis. Fuente adaptada: [30]

5.2. Amaurosis congénita de Leber (LCA)

La LCA asociada a RPE65 fue la primera enfermedad hereditaria de la retina que se exploró para intervenciones de terapia génica. Se han realizado cinco ensayos clínicos de fase I/II y un ensayo de fase III de control aleatorizado (ECA) que investigan la efectividad y seguridad de una única inyección RS de un vector AAV2 que contiene el ADNc de RPE65 (AAV2-hRPE65v2) destinada a pacientes con mutaciones bialélicas

confirmadas en el gen RPE65. Los ensayos clínicos iniciales en humanos en los pacientes con enfermedad grave mostraron un perfil favorable de eventos adversos sumado a complicaciones consistentes con la inyección RS como el desprendimiento de retina (Figura 17).^{28,31}

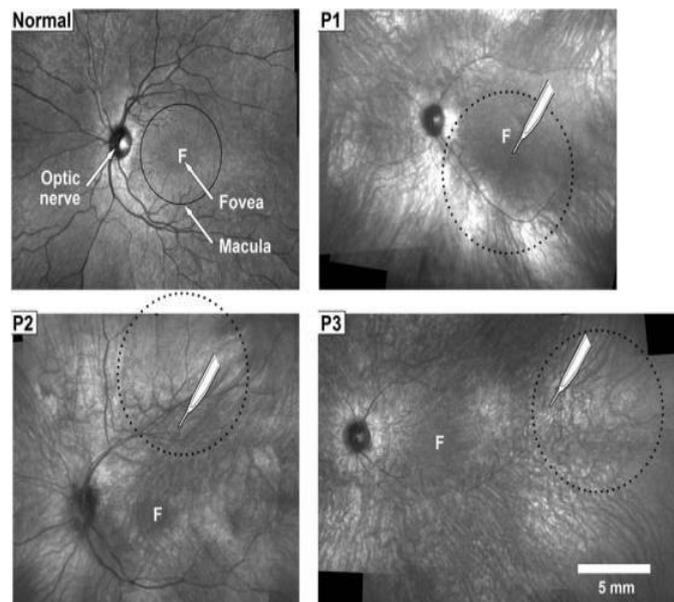


Figura 17. Fondo de ojo con iluminación infrarroja de un sujeto normal y tres pacientes con LCA tipo 2. Los círculos punteados son áreas estimadas de desprendimiento de retina y la "jeringa" blanca señala el sitio de retinotomía que lo produjo. Fuente: [31]

PABLO DÍAZ FERNÁNDEZ
TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE RETINOPATÍAS

Se confirmó la seguridad de la administración contralateral al segundo ojo que no fue tratado en pacientes previamente expuestos a AAV2-hRPE65v2. Los resultados de eficacia presentan una gran variabilidad, con algunos ojos tratados que presentan una mejoría visual sostenida al cabo de 1-3 años, mientras que otros volvieron a resultados previos a la inyección. Esto se puede explicar por las diferencias en la gravedad de la enfermedad y entre los estudios con respecto al diseño, la dosis, el procedimiento quirúrgico y la ingeniería de vectores.

Los criterios para valorar la eficacia en estos estudios están centrados en la visión funcional en lugar de cambios estructurales. Las medidas primarias de los resultados de eficacia incluyen el rendimiento en una nueva prueba de movilidad de luminancia múltiple (MLMT). Los criterios de valoración secundarios fueron la BCVA, el umbral de sensibilidad a luz de campo completo (FST) a los destellos azules, las pruebas de FV, la sensibilidad al contraste, el reflejo lumínico pupilar y las pruebas de movilidad.²⁸

En el ECA de fase III, mediante la técnica de aumento de genes, AAV2-hRPE65v2 se administró secuencialmente en 29 participantes (20 intervención y 9 controles) con LCA asociada a RPE65 confirmada (rango de edad: 4-44 años). El segundo procedimiento en el ojo contralateral se realizó de 6 a 18 días después del primero y hubo un alto grado de seguridad con solo eventos adversos leves en relación con el procedimiento. Las mejoras significativas en MLMT fueron evidentes en el grupo de intervención en comparación con los controles durante el seguimiento de 1 año (Tabla 4), así como en FST y FV, lo que significa un rescate parcial de la función fotorreceptora.^{28,32}

Título de grupo	Intervención	Control
Descripción del grupo	Inyección RS bilateral de voretigene neparvovec-rzyl (AAV2-hRPE65v2)	Sin intervención, sin inyectar
Nº total de participantes analizados	21	10
Media (desviación estándar) medida en cambio de puntuación en los niveles de luz	1.8 (1.1)	0.2 (1.0)

Tabla 4. Pruebas de MLMT bilaterales. MLMT mide cambios en la visión funcional, evaluada por la capacidad de navegar un recorrido con precisión y con un ritmo razonable en distintos niveles de iluminación ambiental. Se evaluó usando los dos ojos entre 1 o más de 7 niveles de iluminación. Una puntuación más alta significa que el sujeto fue capaz de pasar el MLMT a un nivel luminoso más bajo. Fuente adaptada: [32]

Desde el estudio abierto de fase I de seguimiento y el ensayo abierto ECA de fase III que hicieron Maguire y asociados, se observó un gran beneficio a los 30 días y mantenido a los 4 años observando la remodelación de las conexiones de la corteza visual ipsilateral al ojo tratado con técnicas de neuroimagen.

En diciembre de 2017, tras el exitoso ensayo de fase III, Luxturna (voretigene neparvovec-rzyl, Spark Therapeutics, Philadelphia) se convirtió en la primera terapia génica ocular aprobada por la FDA para LCA tipo 2. Voretigene neparvovec fue aprobado más tarde por todos los miembros de la Unión Europea en 2018.

Una revisión sistémica reciente de los cinco ensayos y un ECA RPE65-LCA demostró que las mejoras en resultados de la función visual duran solo hasta dos años después de tratarse, aunque BCVA y FST fueron los únicos resultados de función visual analizadas entre los estudios, puesto que otras medidas como MLMT y las pruebas de FV pueden mostrar una mejoría mantenida más allá de 2 años. Aunque los análisis de seguridad anteriores encontraron un perfil de eventos adversos favorable, se halló un adelgazamiento del grosor central retiniano en los ojos tratados en comparación con los ojos sin intervención 2-3 años después.²⁸

LCA tipo 1 es un candidato ideal para terapia génica debido a la larga ventana terapéutica. Se ha utilizado el vector AAV5 con el ADNc humano GUCY2D bajo control transcripcional del promotor de la rodopsina quinasa humana que es específica del fotorreceptor (hGRK1). AAV5-hGRK1-GUCY2D se administra mediante inyección RS única en un ensayo de fase I/II en curso que revela signos tempranos de eficacia y seguridad. Si es aprobado este enfoque de reemplazo génico constituiría el primer tratamiento de este tipo para GUCY2D-LCA.

El propósito de este estudio fue realizar los experimentos preclínicos necesarios que apoyasen la aplicación clínica de AAV5-hGRK1-GUCY2D en pacientes que tienen mutaciones bialélicas recesivas en GUCY2D. Se realizaron experimentos en ratones GCDKO con el objetivo de evaluar la respuesta terapéutica y se realizaron estudios de rango de dosis en monos cynomolgus con el fin de establecer la dosis mínima requerida para una eficiente transducción de los fotorreceptores con la utilización de AAV5-hGRK1-GFP. En cuanto a resultados,

PABLO DÍAZ FERNÁNDEZ
TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE RETINOPATÍAS

el vector AAV5-hGRK1-GUCY2D obtuvo mejoras significativas de la función retiniana visible en la ERG y produjo el restablecimiento del comportamiento guiado visualmente del ratón GCDKO con un gran perfil de seguridad, y el vector AAV5-hGRK1-GFP transdujo eficazmente los fotorreceptores (Figura 18).³³

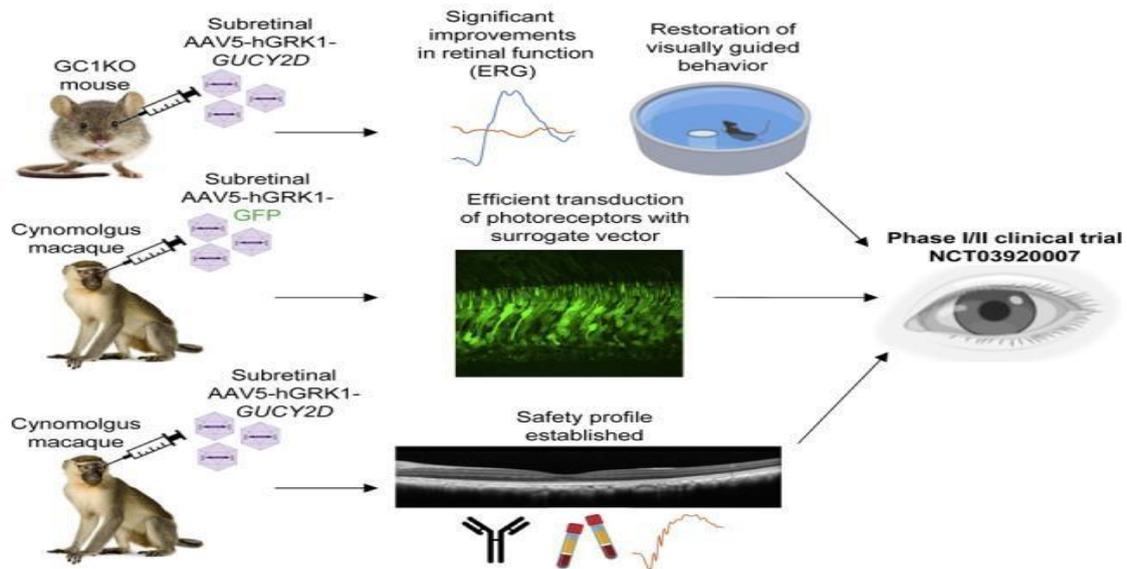


Figura 18. Estudios preclínicos de LCA tipo 1. Se muestran los resultados favorables de la inyección vectorial en ratones GCDKO y monos cynomolgus en el ensayo clínico de fase I/II. Fuente: [33]

La LCA tipo 10 cuenta con una mutación de mayor frecuencia que se produce en la secuencia intermedia en el intrón 26 (IVS26) del gen CEP290. El ARNm resultante codifica un codón de parada prematura que produce una proteína defectuosa (Figura 19), conservando sólo una actividad parcial.

El gran tamaño de este gen con una secuencia codificante de 8 kb impide el aumento de genes mediado por AAV. Un estudio previo demostró que la sobreexpresión de CEP290 mediada por LV resulta en una citotoxicidad en los fotorreceptores, contribuyendo a que la suplementación génica no sea de elección. Lo preferible sería restaurar la configuración normal de CEP290 mediante la corrección de su empalme aberrante.

Maeder et al. evaluaron especificidad y tolerabilidad del constructo denominado EDIT-101, que contaba con dos RNAs de guía única de alta especificidad para crear dos DSB (rotura de doble hebra) a cada lado de la mutación IV26 en

PABLO DÍAZ FERNÁNDEZ
TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE RETINOPATÍAS

CEP290, junto con SaCas9 (Staphylococcus aureus Cas9) bajo control de un promotor GRK1 específico de fotorreceptor, que se empaqueta en un vector AAV5, con el objetivo de eliminar el sitio de empalme críptico restaurando el empalme normal. Las ediciones productivas de CEP290 constituyen alrededor del 17% y ocurrieron con grandes deleciones o inversiones de la secuencia intermedia, que corrigieron el defecto de empalme de CEP290 y restauró su ARNm normal y expresión de proteínas.

A principios del año 2020, un estudio abierto de dosis única ascendente empezó a inscribir pacientes con diagnóstico de LCA10 para probar la edición de genes CRISPR-Cas9 con el propósito de corregir la enfermedad entregando EDIT-101 (Figura 19), mediante inyección RS. Se espera la finalización de este estudio de fase I en 2024. Los resultados obtenidos serán indicativos de cuán aplicable puede ser este tratamiento para otras retinopatías hereditarias.³⁴

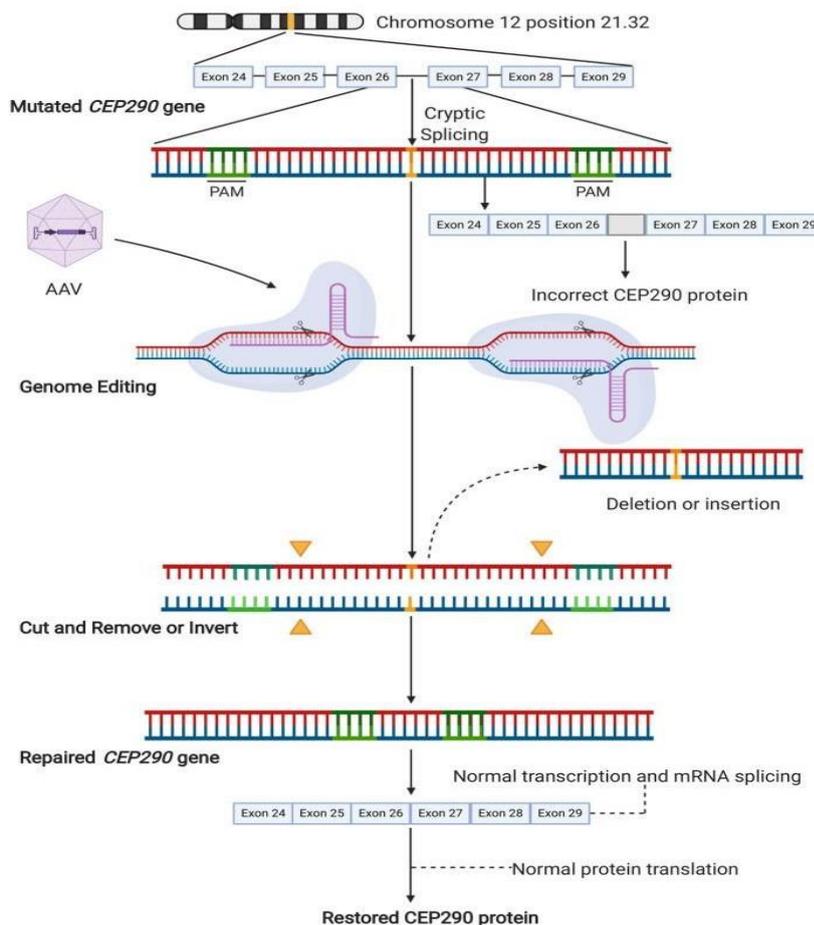


Figura 19. Edición de genes dirigida al sitio de empalme críptico en el gen CEP290. La variante patogénica IVS26 conduce a la generación de un sitio de empalme críptico en el intrón entre los exones 26 y 27, que produce la traducción de una proteína mutante no funcional. Este tratamiento dirigido en cada lado del sitio de empalme tiene como propósito la eliminación de esta mutación. La edición exitosa elimina el segmento de ADN con la mutación o inversión, lo que resulta en la pérdida del sitio de empalme críptico, permitiendo la traducción normal de CEP290 funcional a partir de ARNm de longitud completa de tipo salvaje. Fuente: [34]

Actualmente, el oligonucleótido antisentido también se encuentra en ensayo para la terapia génica ocular de la LCA tipo 10.²⁵

En otros genes implicados en LCA con cierta frecuencia como CRB1, el desarrollo de la terapia génica mediada por AAV constituye un desafío, confiando en la investigación preclínica adicional y los ensayos clínicos para descubrir nuevos enfoques, y el gen RDH12 arroja resultados prometedores en los datos preclínicos sobre suplementación génica que sumado al creciente conocimiento sobre su base molecular y el estudio de su historia natural en curso, generan optimismo para los pacientes y las familias.^{35,36}

El momento del inicio de la terapia génica es una consideración importante para futuros ensayos. Pese al tratamiento, los pacientes con LCA en etapas avanzadas continúan presentando degeneración retiniana, lo que recalca la importancia de iniciar la terapia en etapas más tempranas antes de alcanzar la irreversibilidad. A medida que la degeneración de la retina avanza de un modo lento después de la terapia génica, pueden necesitarse terapias complementarias.²⁸

5.3. Coroideremia (CHM)

Los fotorreceptores centrales no sufren degeneración hasta que la CHM avanzada se prolonga, ampliando la ventana terapéutica.

Los resultados iniciales del ensayo clínico de fase I/II a los 6 meses de los efectos de terapia génica con inyección RS de AAV2-REP1 resultaron prometedores mostrando eventos adversos leves y mejorías en la BCVA de algunos ojos tratados en comparación con los ojos contralaterales no intervenidos. Es una mejoría que se mantuvo 3 años y medio después del tratamiento en los dos ojos con la enfermedad más avanzada. Los otros 4 pacientes contaban con un margen de mejora limitado pues tenían buena agudeza visual al inicio del estudio y 3 de ellos mantuvieron su agudeza visual basal a los 3 años y medio de seguimiento. La sensibilidad retiniana experimentó una gran mejora en pacientes que tuvieron pocos cambios en su agudeza visual.

Los resultados completos de este ensayo en el criterio de valoración a 2 años fueron informados recientemente. 14 pacientes con CHM en etapas terminales recibieron una dosis baja o alta del vector AAV2-REP1 mediante inyección RS. La agudeza visual mejoró de manera similar tanto en grupos de dosis bajas como en los de dosis altas, aunque la cohorte de pacientes en el estudio tenía CHM

PABLO DÍAZ FERNÁNDEZ
TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE RETINOPATÍAS

avanzada que hacía limitar toda determinación concreta sobre la dosis adecuada para pacientes con mejor función macular de base. A pesar de mejorar inicialmente, la sensibilidad retiniana media no se mantuvo durante los 2 años de seguimiento.

El área de autofluorescencia residual en imágenes FAF es conocido que disminuye con la gravedad de la CHM y se redujo a la misma velocidad entre ojos intervenidos y control en un ensayo adicional de fase I con seguimiento más allá de los 2 años y una dosis más alta.²⁸

Existen 4 estudios de fase II activos o completados que evalúan eficacia y seguridad de AAV2-REP1 en pacientes con esta enfermedad. Se han publicado recientemente resultados a dos años de un ensayo de fase II con dosis altas de 6 pacientes con CHM tratados con inyección RS de AAV2-REP1 (Tabla 5).^{28,37}

Título de grupo	Inyección de AAV2-REP1
Descripción del grupo	Inyección RS de volumen total de 100 µL, 10e11 vg. Único grupo: estudio con un solo brazo
Nº total de participantes analizados	6
Media (desviación estándar) medida en letras	3.0 (4.0)

Tabla 5. Cambio en BCVA desde el comienzo. Se les evaluó la agudeza visual utilizando tablas de visión del Estudio de Tratamiento Temprano de Retinopatía Diabética (ETDRS). Se midió la BCVA de baja luminancia sobre la mejor corrección para ese ojo y el participante leyó la tabla optométrica ETDRS de iluminación normal informándose el número de letras leídas de manera correcta (de 0 a 100 letras) en el ojo del estudio. A menor número, peor será la agudeza visual. El ojo del estudio se definió como el de peor BCVA estándar. Un cambio positivo desde la línea de base significa una mejoría y un cambio negativo un empeoramiento. Fuente adaptada: [37]

En los resultados de fase I, existió un buen perfil de seguridad y una mejoría sostenida de la BCVA en ojos intervenidos. Los ojos no tratados no mostraron mejoría significativa de BCVA, sin observarse diferencias significativas entre ojos intervenidos y no intervenidos en microperimetría, SD-OCT o FAF. Los pacientes que se inscribieron en este ensayo padecían CHM avanzada con mayores adherencias coroideas, limitando el área de distribución vectorial. En la CHM de etapa media-avanzada, la terapia es dirigida hacia islas frágiles residuales de EPR preservado que mantienen agudeza visual mediante inyección RS. Debido a una progresión lenta de la enfermedad en la primera década de vida, los autores propusieron que el inicio del tratamiento en etapas más tempranas de la CHM aumentaría la exposición a AAV2-REP1 y la eficacia final. En las CHM de

etapa temprana, con mayor parte de la retina intacta, se ha propuesto el uso de inyección IVT para minimizar riesgos de pérdida de agudeza visual debido al trauma producido por la inyección RS con desprendimiento foveal iatrogénico.²⁸

Datos adicionales de 2 años de un ensayo aleatorizado abierto de fase II con 6 sujetos mostró igualmente mantenimiento o ganancias en la agudeza visual durante el período de 24 meses (Figura 20).^{28,38}

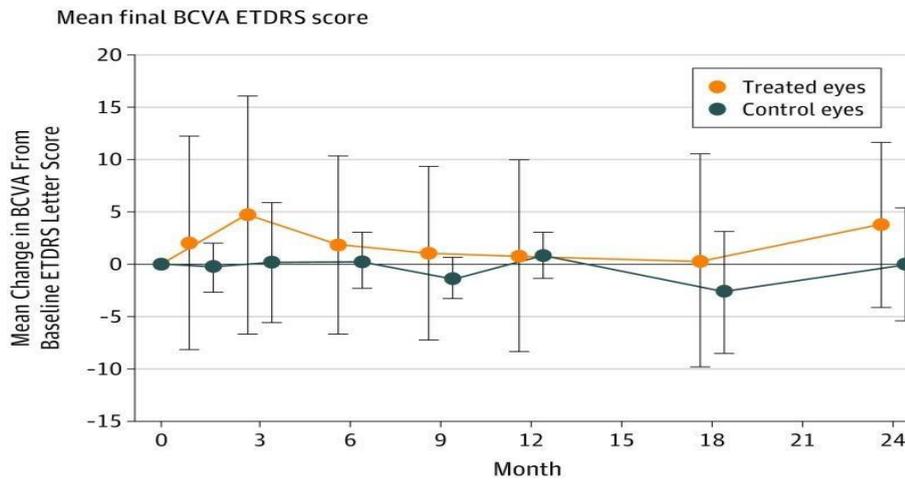


Figura 20. Cambios de puntuación medios en resultados de BCVA del ETDRS desde el inicio hasta el mes 24 en ojos intervenidos y control de todos los pacientes. El IC del 95% es representado por las barras de error. Fuente adaptada: [38]

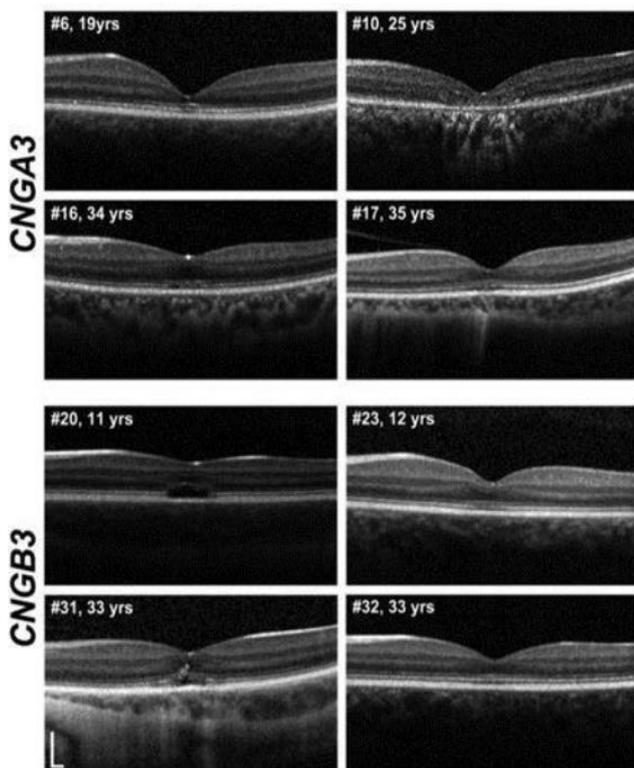
Al existir cierta asimetría en la afectación ocular respecto a la tasa de progresión, sobre todo en etapas posteriores, los futuros ensayos de eficacia deben ser estudios aleatorizados, enmascarados y con simulacro. Se está realizando un ensayo aleatorizado de fase III con 169 pacientes cuyo objetivo es evaluar la efectividad terapéutica, presentando 3 grupos de tratamiento (sin tratamiento, dosis baja y dosis alta). La BCVA a los 12 meses constituye la medida de resultado primaria, mientras que las secundarias incluyen cambios en autofluorescencia, en la zona elipsoide en OCT, sensibilidad en microperimetría y al contraste, visión del color y rendimiento en la lectura.²⁸

5.4. Acromatopsia (ACHM)

Un ensayo clínico reciente no aleatorizado investigó la seguridad y eficacia de la inyección RS de un vector AAV8 que codifica CNGA3 (AAV8-CNGA3) en el peor ojo de pacientes adultos con ACHM que presentaban mutaciones bialélicas patogénicas en CNGA3. Durante 1 año, el tratamiento se toleró bien en los 9 pacientes tratados sin observar eventos adversos graves, siendo todos complicaciones leves de la inyección. Se observó la recuperación de la función

cónica en los ojos intervenidos con mejoras en la visión del color, la agudeza visual y la sensibilidad al contraste.²⁸

Hubo informes contradictorios respecto a la duración de la ventana terapéutica disponible para el inicio del tratamiento, pues algunos estudios han demostrado mayor preservación del cono a edad temprana, pero otros estudios no presentan asociación entre los cambios estructurales y funcionales con la edad. Uno de los estudios cuyo propósito era caracterizar la estructura y función de la retina en ACHM incluyó 40 participantes con esta enfermedad y no encontró una



correlación significativa entre la edad y BCVA, sensibilidad al contraste, agudeza lectora o sensibilidad retiniana. En la morfología foveal no hubo diferencias significativas en esos parámetros entre los sujetos, salvo algún paciente con una menor agudeza lectora. Se pueden ver imágenes representativas en SD-OCT de sujetos con distintas edades y genotipos poniendo de manifiesto una falta de dependencia de la edad en la integridad de la arquitectura retiniana externa (Figura 21).^{28,39}

Figura 21. SD-OCT con apariencia variable de sujetos con diversas edades y genotipos CNGA3 y CNGB3. Se observa la falta de dependencia de edad en la arquitectura retiniana externa. Fuente adaptada: [39]

Con los datos preclínicos, Fischer et al. plantearon que la intervención de terapia génica para esta enfermedad puede tener más efectividad a edad más temprana cuando hay mayor plasticidad cortical visual aunque el reciente ensayo clínico mostró que la mejora visual podría ocurrir hasta en pacientes adultos en etapa avanzada de ACHM. Aunque existen otros 4 genes involucrados en esta patología (ver 3.5.) destacamos 4 ensayos clínicos abiertos de terapia génica retiniana mediante AAV en fase I/II que reclutan de forma activa adultos y niños

PABLO DÍAZ FERNÁNDEZ
TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE RETINOPATÍAS

con ACHM asociada a los genes CNGA3 y CNGB3. Se cuenta con el resultado primario de uno de ellos que confirma la buena tolerabilidad de dosis de AAV-CNGA3 (Tabla 6).^{28,40}

Título de grupo	Dosis baja de AAV-CNGA3	Dosis intermedia de AAV-CNGA3	Dosis alta de AAV-CNGA3
Descripción del grupo Terapia génica con AAV para defectos en el gen CNGA3	Administración RS de una sola dosis baja de AAV-CNGA3	Administración RS de una dosis única intermedia AAV-CNGA3	Administración RS de una sola dosis alta de AAV-CNGA3
Nº total de participantes analizados	3	3	5
Recuento de participantes con eventos adversos	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%

Tabla 6. Número de participantes cumplidores del resultado primario definido como cualquier evento adverso establecido en el ensayo que ocurra durante las 6 semanas posteriores a la inyección, posiblemente relacionados con los medicamentos en investigación de terapia avanzada, no solo con la cirugía. En ninguno de ellos se observó la presencia de esos eventos. Fuente adaptada: [40]

Como algunos pacientes del estudio presentan fijación deficiente y fotofobia, puede resultar complicado en ellos obtener un rendimiento fiable de la prueba funcional y estructural. Para la evaluación precisa de la eficacia terapéutica y guiar los futuros ensayos, la selección con cautela y caracterización de los candidatos de manera previa al tratamiento pueden ser vitales para la garantía de un análisis preciso en las pruebas de función visual.²⁸

5.5. Enfermedad de Stargardt (STGD1)

El tamaño del gen ABCA4 supera la capacidad de carga de AAV, requiriendo vectores LV, AAV duales o no virales alternativos. Sanofi finalizó el primer estudio de fase I/II de inyección IVT de un vector LV basado en el EIAV portador del gen ABCA4 (SAR422459) en pacientes con la enfermedad y está realizando actualmente un segundo ensayo parecido que investiga la eficacia y seguridad a largo plazo de SAR422459 en 27 participantes. Los resultados preliminares de 2017 informaron una tolerabilidad favorable. Los ensayos clínicos en humanos que usan nanopartículas no virales y vector dual AAV se encuentran en el horizonte, puesto que prometedores estudios preclínicos han conseguido

entregar transgenes ABCA4 de manera efectiva y segura mediante otras plataformas nuevas.²⁸

De las alternativas de vector dual, el sistema híbrido resultó la de mayor eficiencia y se utilizó para expresar el ABCA4 de longitud completa. El tratamiento con este sistema híbrido de doble vector ABCA4 produjo una acumulación reducida en la autofluorescencia de A2E, hallazgo apoyado por la cuantificación retiniana, con unos resultados que muestran seguridad y un transgén ABCA4 administrado que es funcional en el modelo ratón ABCA4 $-/-$ de STGD1. En la Figura 22 la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) determina la cantidad de A2E presente en retinas intervenidas con vectores y no intervenidas varios momentos posteriores al tratamiento, confirmando que la A2E se reduce drásticamente en los ojos tratados con sistema híbrido de doble vector ABCA4.⁴¹

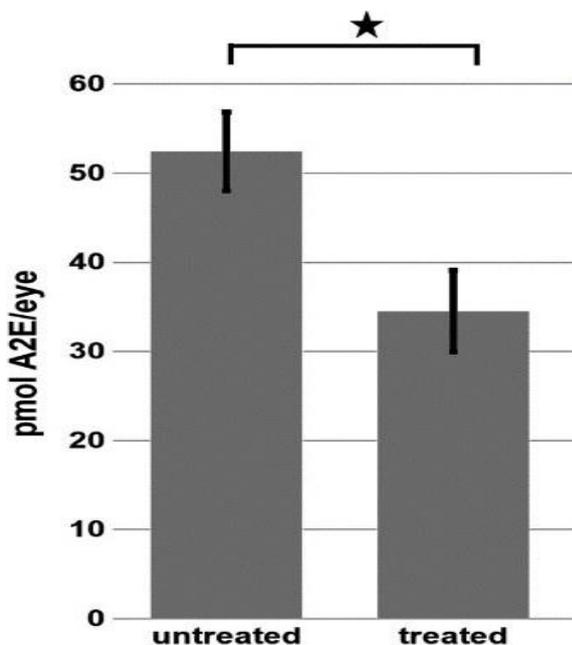


Figura 22. Niveles de A2E en retinas no tratadas y tratadas con sistema híbrido de doble vector en ABCA4 $-/-$ ratones, medidos por HPLC y examinadas después de 5 meses. Las barras de error representan la media \pm Error Estándar de la Media. $p < 0,05$. ★ HPLC. Fuente adaptada: [41]

5.6. Retinosquiasis ligada al cromosoma X (XLR5)

A día de hoy existen dos ensayos de reemplazo de genes en curso para esta enfermedad. Las inyecciones IVT prevalecen sobre la RS en XLR5. Los estudios preclínicos en animales demostraron que la membrana limitante interna, que constituye una importante barrera de transducción para la expresión génica efectiva vítrea, es debilitada en esta patología, permitiendo el uso de inyecciones IVT. Cukras et al. detallaron los hallazgos iniciales de un ensayo de escalada de dosis de fase I/IIa patrocinado por el Instituto Nacional del Ojo que evalúa la

PABLO DÍAZ FERNÁNDEZ
TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE RETINOPATÍAS

inyección IVT de la terapia génica AAV8-RS1 en 9 pacientes varones con XLRS. Existió buena tolerancia del procedimiento con el vector en el mes 18 de seguimiento. Respecto a las medidas de resultado funcionales que se utilizaron para evaluar la eficacia (BCVA, sensibilidad retiniana en microperimetría y ERG), no se observaron beneficios visuales claros en comparación al valor inicial. Se observó estructuralmente en la OCT un cierre temporal del espacio quístico en un ojo intervenido, pero no en el control contralateral (Figura 23).^{28,42}

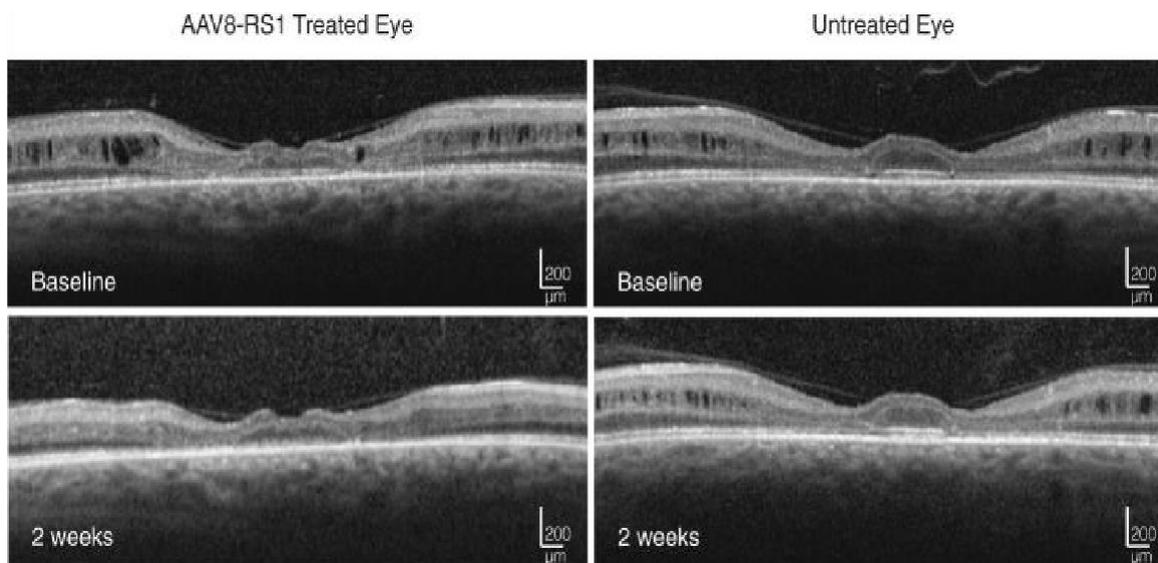


Figura 23. OCT de cavidades de esquisis macular en un participante al inicio y 2 semanas después de la administración de AAV8-RS1. Desde la imagen de línea de base prevectorial hasta 2 semanas después de la administración de AAV8-RS1, el ojo inyectado tuvo un cierre completo de las cavidades de esquisis, pero estas persistieron en el ojo compañero no intervenido. Fuente: [42]

Si bien no existió mejoría funcional durante este período de cierre, el limitado efecto puede aprovecharse para un potencial beneficio terapéutico.

Mediante el uso de un subtipo de vector diferente, Applied Genetic Technologies Corporation está realizando un ensayo de fase I/II de escalada de dosis de rAAV2tYF-CB-hRS1 con inyección IVT. Los resultados de un estudio preclínico demostraron que AAV2 transduce células ganglionares después de inyecciones IVT de una forma más eficiente comparándolo con AAV8. Los resultados de 6 meses mostraron un perfil de seguridad favorable pero con ninguna mejoría funcional. Debido a que XLRS es una enfermedad con una progresión lenta, resulta necesario realizar seguimientos más prolongados de estos 2 ensayos para observar una mejora a nivel de funcionalidad.²⁸

5.7. Neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON)

La existencia de múltiples ensayos clínicos activos y futuros se encuentran investigando la seguridad y eficacia del reemplazo génico mediado por AAV dirigido a pacientes diagnosticados de LHON que son portadores de mutaciones en ND4. Puesto que las células ganglionares de la retina son el principal objetivo terapéutico, los vectores AAV son administrados mediante inyecciones IVT. El primer ensayo de terapia génica LHON realizó la evaluación de seguridad, eficacia y sostenibilidad de inyecciones IVT de rAAV2-ND4 en 9 pacientes con mutaciones en ND4. 8 pacientes recibieron una inyección unilateral única, mientras que a un paciente se le administró una inyección en el ojo contralateral 1 año después del tratamiento inicial. El seguimiento de 7 años mostró la seguridad de la terapia génica sin presencia de eventos adversos sistémicos u oculares. En el seguimiento de 36 meses, los ojos intervenidos experimentaron mejorías tanto funcionales en BCVA y FV como estructurales, y los ojos no inyectados experimentaron también mejoras en esos mismos parámetros de funcionalidad. Mientras que el espesor de la capa de fibras nerviosas retiniana continuó disminuyendo en el ojo control, mantuvo valores basales en los ojos con inyección vectorial. Las mejoras funcionales se dieron con mayor fuerza en pacientes más jóvenes con diagnóstico reciente, sugiriendo el inicio temprano del tratamiento en el curso de LHON. El patrocinador del ensayo clínico, la Universidad de Ciencia y Tecnología de Huazhong, está desarrollando un estudio de fase II / III de mayor volumen con 142 sujetos con el propósito de confirmar la seguridad, eficacia y durabilidad de la terapia génica rAAV2-ND4 y unos resultados iniciales de 3 meses que encuentran grandes mejorías en BCVA y FV.²⁸

Durante un ensayo de escalada de dosis de fase I/II con una duración de 2 años, GenSight Biologics mostró un perfil de seguridad favorable para administraciones IVT únicas unilaterales de rAAV2/2-ND4 (GS010) en participantes portadores de la mutación ND4. GenSight Biologics publicó resultados de 96 semanas de dos ensayos clínicos aleatorizados y controlados de fase III mediados por AAV que se encargan de evaluar la eficacia de GS010 (rAAV2/2-ND4). El ensayo RESCUE incluyó pacientes que llevaban menos de 6 meses con pérdida de visión y el ensayo REVERSE trataron sujetos con clínica

PABLO DÍAZ FERNÁNDEZ
TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE RETINOPATÍAS

visual durante un período 6 a 12 meses. En los dos ensayos hubo una mejoría funcional bilateral sostenida en la BCVA (Tabla 7) y la sensibilidad al contraste.^{28,43}

Título de grupo	Ojos tratados con rAAV	Ojos con procedimiento simulado
Descripción del grupo	Todos los ojos que recibieron GS010. El ojo asignado recibió una dosis única (9E10 vg/ojo) a través de una IVT. El volumen fue de 90 µL y la inyección se realizó bajo anestesia local. Los mismos participantes también recibieron el procedimiento simulado en el ojo que no fue asignado para recibir GS010	Todos los que recibieron el Sham. El ojo no asignado con GS010 recibió el procedimiento simulado. El ojo simulado recibió una sola IVT aplicando presión al ojo, utilizando el extremo romo de una jeringa sin aguja. Los mismos participantes también recibieron GS010 en el ojo que no recibió el Sham
Nº total de participantes analizados	37	37
Nº total de ojos analizados	37	37
Media de mínimos cuadrados (error estándar) medida en LogMAR	-0.219 (0.055)	-0.211 (0.055)

Tabla 7. Resultado primario del ensayo REVERSE mostrando cambios cuantitativos en agudeza visual derivada de ETDRS desde el inicio en la semana 48. El LogMAR se derivó del número de letras que los pacientes conseguían leer en el gráfico ETDRS. Una puntuación menor de LogMAR significa mejor agudeza visual, al igual que un cambio negativo desde el inicio, siendo el cambio la resta entre la puntuación de la semana 48 y la puntuación inicial. Fuente adaptada: [43]

Debido a los alentadores resultados, Gensight Biologics está preparándose para el proceso de aprobación regulatoria de esta terapia. Un metaanálisis planificado de datos ayudará a informar la mejor ventana terapéutica para la recuperación de la visión y ayudará a dirigir futuros tratamientos. También está realizando un ensayo que evalúa seguridad y eficacia de las inyecciones bilaterales de GS010 en pacientes que presentan LHON.²⁸

6. CONCLUSIONES

Después de la aprobación por parte de la FDA del medicamento voretigene neparvovec-rzyl (Luxturna) para la LCA tipo 2 y el desarrollo de prometedores ensayos clínicos para otras retinopatías hereditarias, un gran número de médicos y pacientes tienen sus esperanzas depositadas en el desarrollo de métodos de terapia génica dirigidos a muchas de estas enfermedades visualmente debilitantes sin cura definitiva, lo cual está resultando posible gracias a los descubrimientos anuales de nuevas mutaciones que se convierten en dianas potenciales de terapia génica en modelos clínicos y preclínicos.

Constituye un reto importante ajustar las expectativas que presentan los pacientes sometidos a este tratamiento para seguir avanzando, si bien está demostrado que el éxito en esta terapia consigue detener la progresión de la enfermedad y preservar la función y estructura iniciales. Un análisis más a fondo de las características basales previo a la terapia génica seguramente contribuya a mejorar el balance riesgo-beneficio esperable de la intervención, calculando de un modo más preciso las ganancias funcionales y estructurales.

El papel específico que tienen los genes en la historia natural de la retinopatía y los estudios empleados en la medición de resultados requieren un abordaje exhaustivo para poder guiar estas terapias en el futuro. Se confía en que la evolución constante de los vectores empleados, los métodos de inyección y los parámetros utilizados para la evaluación visual consigan superar el resto de desafíos que quedan por cumplir para conseguir que la terapia génica sea efectiva y duradera en el campo de las retinopatías hereditarias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fischer MD. Sobre la terapia génica para enfermedades de la retina. *Ophthalmologica*. 2017;238(Suppl. 1):48-55.
2. Bofill A, Oporto JI, Verdaguer JI, López JP, Acuña O, Iturriaga H, et al. Possibility of genetic therapy for inherited retinal conditions. *Arch Soc Esp Oftalmol Engl Ed*. 1 de marzo de 2023;98(3):150-4.
3. Partes de la retina: capas y células que la componen [Internet]. 2019. Disponible en: <https://psicologiymente.com/salud/partes-de-retina>
4. Bender P. ▷ Las 12 PARTES del OJO HUMANO: Conoce su Anatomía [Internet]. 2018. Disponible en: <https://www.brillpharma.com/anatomia/partes-del-ojo/>
5. Varón CL, Jaramillo S, Tello A. La retina para el médico no oftalmólogo. *MedUNAB*. 2010;13(1):31-7.
6. inof2017. Diagnóstico y tratamiento de enfermedades de la mácula [Internet]. Inof | Centro de investigación y cirugía ocular. 2018. Disponible en: <https://inof.es/diagnostico-y-tratamiento-de-enfermedades-de-la-macula/>
7. Stone WL, Patel BC, Basit H, Salini B. Retinopathy. En: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541131/>
8. Retinopatía: qué es, síntomas y tratamiento [Internet]. Top Doctors.. Disponible en: <https://www.topdoctors.es/diccionario-medico/retinopatia>
9. O'Neal TB, Luther EE. Retinitis Pigmentosa. En: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519518/>
10. Patnaik SR, Raghupathy RK, Zhang X, Mansfield D, Shu X. The Role of RPGR and Its Interacting Proteins in Ciliopathies. *J Ophthalmol*. 2015;2015:414781.

11. RETINOSIS PIGMENTARIA (RP) [Internet]. Disponible en: <https://www.centrooftalmologicocarballino.com/noticias/36/retinosis-pigmentaria-rp>
12. Toms M, Pagarkar W, Moosajee M. Usher syndrome: clinical features, molecular genetics and advancing therapeutics. *Ther Adv Ophthalmol*. 17 de septiembre de 2020;12:2515841420952194.
13. Huang CH, Yang CM, Yang CH, Hou YC, Chen TC. Leber's Congenital Amaurosis: Current Concepts of Genotype-Phenotype Correlations. *Genes*. 19 de agosto de 2021;12(8):1261.
14. Leber Congenital Amaurosis [Internet]. American Academy of Ophthalmology. 2017. Disponible en: <https://www.aao.org/education/disease-review/leber-congenital-amaurosis-4>
15. Mitsios A, Dubis AM, Moosajee M. Choroideremia: from genetic and clinical phenotyping to gene therapy and future treatments. *Ther Adv Ophthalmol*. 27 de diciembre de 2018;10:2515841418817490.
16. MacDonald IM, Hume S, Zhai Y, Xu M. Choroideremia. En: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, et al., editores. *GeneReviews®*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1337/>
17. Kohl S, Jäggle H, Wissinger B, Zobor D. Achromatopsia. En: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, et al., editores. *GeneReviews®*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1418/>
18. Michalakis S, Gerhardt M, Rudolph G, Priglinger S, Priglinger C. Achromatopsia: Genetics and Gene Therapy. *Mol Diagn Ther*. 2022;26(1):51-9.
19. Kohli P, Kaur K. Stargardt Disease. En: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK587351/>
20. Tanna P, Strauss RW, Fujinami K, Michaelides M. Stargardt disease: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. *Br J Ophthalmol*. enero de 2017;101(1):25-30.

PABLO DÍAZ FERNÁNDEZ
TERAPIA GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE RETINOPATÍAS

21. Georgiou M, Finocchio L, Fujinami K, Fujinami-Yokokawa Y, Virgili G, Mahroo OA, et al. X-Linked Retinoschisis. *Ophthalmology*. mayo de 2022;129(5):542-51.
22. Shemesh A, Sood G, Margolin E. Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON). En: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482499/>
23. Meyerson C, Van Stavern G, McClelland C. Leber hereditary optic neuropathy: current perspectives. *Clin Ophthalmol Auckl NZ*. 26 de junio de 2015;9:1165-76.
24. Terapia génica | Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud | AccessMedicina | McGraw Hill Medical [Internet].
Disponible en:
<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473§ionid=102745523#1118681386>
25. Wasnik VB, Thool AR. Ocular Gene Therapy: A Literature Review With Focus on Current Clinical Trials. *Cureus*. 14(9):e29533.
26. Giono LE. CRISPR/Cas9 y la terapia génica. *Med B Aires*. octubre de 2017;77(5):405-9.
27. Ochakovski GA, Bartz-Schmidt KU, Fischer MD. Retinal Gene Therapy: Surgical Vector Delivery in the Translation to Clinical Trials. *Front Neurosci*. 3 de abril de 2017;11:174.
28. Nuzbrokh Y, Ragi SD, Tsang SH. Gene therapy for inherited retinal diseases. *Ann Transl Med*. agosto de 2021;9(15):1278.
29. King Khaled Eye Specialist Hospital. Phase I Trial of Ocular Subretinal Injection of a Recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV2-VMD2-hMERTK) Gene Vector to Patients With Retinal Disease Due to MERTK Mutations [Internet]. clinicaltrials.gov; 2022 ene. Report No.: results/NCT01482195. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01482195>
30. Sanofi. A Phase I/IIA Dose Escalation Safety Study of Subretinally Injected SAR421869, Administered to Patients With Retinitis Pigmentosa Associated With

Usher Syndrome Type 1B [Internet]. clinicaltrials.gov; 2022 mar. Report No.: NCT01505062. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01505062>

31. Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L, et al. 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.* octubre de 2008;19(10):979-90.

32. Safety and Efficacy Study in Subjects With Leber Congenital Amaurosis - Study Results - ClinicalTrials.gov [Internet]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT00999609>

33. Boye SL, O’Riordan C, Morris J, Lukason M, Compton D, Baek R, et al. Preclinical studies in support of phase I/II clinical trials to treat GUCY2D-associated Leber congenital amaurosis. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 14 de diciembre de 2022;28:129-45.

34. Hernández-Juárez J, Rodríguez-Uribe G, Borooh S. Toward the Treatment of Inherited Diseases of the Retina Using CRISPR-Based Gene Editing. *Front Med.* 1 de octubre de 2021;8:698521.

35. Boon N, Wijnholds J, Pellissier LP. Research Models and Gene Augmentation Therapy for CRB1 Retinal Dystrophies. *Front Neurosci.* 14 de agosto de 2020;14:860.

36. Daich Varela M, Michaelides M. RDH12 retinopathy: clinical features, biology, genetics and future directions. *Ophthalmic Genet.* 4 de mayo de 2022;43(3):301-6.

37. Lam B. An Open Label Phase 2 Clinical Trial of Retinal Gene Therapy for Choroideremia Using an Adeno-associated Viral Vector (AAV2) Encoding Rab-escort Protein 1 (REP1) [Internet]. clinicaltrials.gov; 2019 jul. Report No.: NCT02553135. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02553135>

38. Fischer MD, Ochakovski GA, Beier B, Seitz IP, Vaheb Y, Kortuem C, et al. Efficacy and Safety of Retinal Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus

Vector for Patients With Choroideremia. *JAMA Ophthalmol.* noviembre de 2019;137(11):1247-54.

39. Sundaram V, Wilde C, Aboshiha J, Cowing J, Han C, Langlo CS, et al. Retinal Structure and Function in Achromatopsia: Implications for Gene Therapy. *Ophthalmology.* enero de 2014;121(1):234-45.

40. MeiraGTx UK II Ltd. An Open Label, Multi-centre, Phase I/II Dose Escalation Trial of a Recombinant Adeno-associated Virus Vector (AAV2/8-hG1.7p.coCNGA3) for Gene Therapy of Children and Adults With Achromatopsia Owing to Defects in CNGA3 [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2022 nov. Report No.: results/NCT03758404. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT03758404>

41. Dyka FM, Molday LL, Chiodo VA, Molday RS, Hauswirth WW. Dual ABCA4-AAV Vector Treatment Reduces Pathogenic Retinal A2E Accumulation in a Mouse Model of Autosomal Recessive Stargardt Disease. *Hum Gene Ther.* 1 de noviembre de 2019;30(11):1361-70.

42. Cukras C, Wiley HE, Jeffrey BG, Sen HN, Turriff A, Zeng Y, et al. Retinal AAV8-RS1 Gene Therapy for X-Linked Retinoschisis: Initial Findings from a Phase I/IIa Trial by Intravitreal Delivery. *Mol Ther.* 5 de septiembre de 2018;26(9):2282-94.

43. GenSight Biologics. Randomized, Double-Masked, Sham-Controlled Clinical Trial to Evaluate the Efficacy of a Single Intravitreal Injection of GS010 in Subjects Affected for More Than 6 Months and To 12 Months by LHON Due to the G11778A Mutation in the ND4 Gene [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2020 ene. Report No.: NCT02652780. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02652780>