

## **” Terapias moleculares para enfermedades retinianas hereditarias: situación actual, oportunidades y desafíos”.**

El pasado mes de agosto, se publicó el artículo” Terapias moleculares para enfermedades retinianas hereditarias: situación actual, oportunidades y desafíos”.

Dejamos el enlace para que podáis acceder a la versión original; <https://www.mdpi.com/2073-4425/10/9/654/htm>.

Dado el interés del artículo, se ha traducido y adaptado algunas terminologías, de igual manera y dado lo extenso del mismo, su contenido se ha dividido en varios apartados, al final de cada cual se ha añadido un pequeño glosario de términos más técnicos.

Las áreas en las que se ha dividido el artículo son:

- Resumen (sobre estas líneas)
- Imagen resumen de las distintas terapias
- Resumen de terapias moleculares y ensayos clínicos
- Terapias en las que se emplea el ADN
- Terapias en las que se emplea el ARN
- Terapias compuestas
- Introducción de moléculas terapéuticas
- Inserción ocular
- Vectores: Virales y no virales
- Otras terapias celulares
- Observaciones finales

### **Resumen:**

Las enfermedades hereditarias de la retina (DHR) son genética y clínicamente muy heterogéneas y se han considerado incurables durante mucho tiempo. Tras el desarrollo exitoso de una terapia génica asociada a mutaciones bialélicas (lo que indica que están mutadas la copia que del gen aporta el padre y la madre) en el gen RPE65, esta vista ha cambiado. Como resultado, actualmente se están desarrollando muchos enfoques terapéuticos diferentes, en particular una gran variedad de terapias moleculares. Estos dependen de la gravedad de la degeneración de la retina, el conocimiento del mecanismo fisiopatológico subyacente a cada subtipo de DHR y la molécula diana terapéutica. Las terapias de ADN incluyen diferentes

Enfoques. Para algunos subtipos genéticos de DHR, las terapias de ARN y las terapias combinadas también han demostrado un potencial terapéutico considerable. En esta revisión, resumimos el estado actual de la técnica de varios enfoques terapéuticos, incluidos los pros y los contras de cada estrategia, y describimos los desafíos futuros que se avecinan en el combate contra los DHR.

## Enfermedades de la retina hereditarias (DHR)

Las Distrofias Hereditarias de la Retina (DHR) son un grupo raro y heterogéneo de trastornos neurodegenerativos que colectivamente resultan en una discapacidad visual progresiva. Se estima que los DHR afectan a alrededor de 1 de cada 2000 personas en todo el mundo. Se han identificado más de 250 genes causales en los que las mutaciones pueden causar uno o más de los subtipos clínicos de DHR. Las DHR pueden ser familiares o esporádicas, aisladas (no sindrómicas) o sindrómicas y estacionarias o progresivas. En términos de distribución geográfica, podrían ser difundidas o localizadas. La mayoría de las formas de las DHR afectan principalmente a los fotorreceptores, pero otras formas también pueden afectar principalmente al epitelio pigmentario de la retina (RPE) o la retina interna. Las DHR pueden propagarse a través de todos los patrones de herencia: autosómico dominante (AD), autosómico recesivo (AR), ligado a X (XL) o mitocondrial, mientras que ocasionalmente también se han descrito casos digénicos (mutación en dos genes diferentes) o disomía uniparental (Habitualmente, decimos que la información que contienen nuestros genes, esta duplicada, de forma que una copia viene de nuestro padre y otra de nuestra madre, en los casos de disomía uniparental las dos copias de un gen vienen del mismo progenitor, bien de nuestro padre o de nuestra madre)

## Tratamiento actual de DHR

El ojo es un blanco ideal para terapias moleculares, por varias razones:

- Las uniones estrechas de la barrera retina sanguínea (BRB) definen la retina como un tejido relativamente inmune privilegiado. En otras palabras, la introducción de un antígeno extraño (como un vector viral) generalmente se tolera bien sin provocar respuestas inflamatorias graves.
- El riesgo de diseminación generalizada del vector administrado localmente es bajo, evitando efectos sistémicos no deseados. Además, se necesitan cantidades relativamente pequeñas del vector para lograr una respuesta terapéutica.
- El ojo es fácilmente accesible mediante cirugía, que permite la administración intravítrea y subretiniana de vectores al tejido afectado. Como las células de la retina se diferencian y no se dividen, no hay pérdida del transgén incluso con el uso de vectores no integradores.

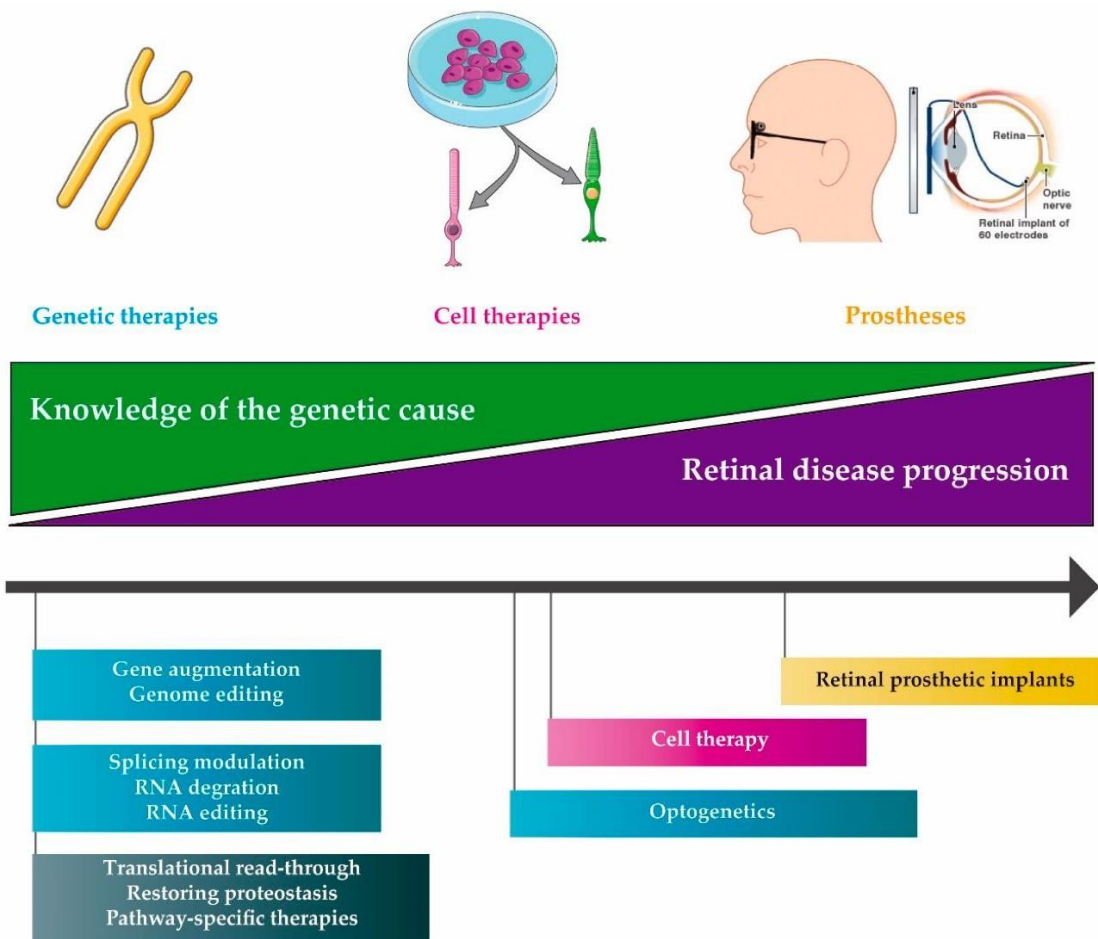
Hay muchos enfoques no invasivos diferentes que pueden monitorear la progresión de la enfermedad. Los ejemplos incluyen

- Autofluorescencia de fondo de ojo que proporciona un mapa topográfico de los cambios de lipofuscina en las células RPE.
- OCT de dominio espectral para evaluar el espesor de la retina y la arquitectura de la capa de fotorreceptores,
- Otras pruebas conocidas como la agudeza visual y la biomicroscopía.

Actualmente, hay varios enfoques (superpuestos) para tratar DHR, incluyendo terapias moleculares pero también terapias basadas en células madre y

prótesis de retina (Figura 1 ). A pesar de los resultados prometedores obtenidos con algunos de estos enfoques, todavía hay muchos desafíos que deben superarse para lograr una implementación amplia de las modalidades de tratamiento para los DHR. La gran heterogeneidad de estas enfermedades dificulta el desarrollo de un tratamiento común para un gran número de pacientes.

Además, una proporción significativa de genes involucrados en DHR tiene un tamaño de ADNc que excede la capacidad de carga de los vectores virales adenoasociados (AAV), generalmente considerado el vector viral preferido para la administración retiniana de moléculas terapéuticas. Finalmente, los costos de desarrollar genes o incluso enfoques específicos de mutaciones son sustanciales, mientras que a menudo solo tienen un número limitado de individuos que podrían beneficiarse potencialmente de una molécula terapéutica dada.



Representación esquemática de posibles enfoques terapéuticos según la progresión de la enfermedad retiniana y el conocimiento de la causa genética de la enfermedad retiniana. Se prefieren las terapias genéticas (recuadros azules) en los primeros pasos de la progresión de la enfermedad (las células de la retina aún están vivas) y cuando existe conocimiento de las causas genéticas de las enfermedades. A medida que la enfermedad progresa y el conocimiento de la patogénesis disminuye, se pueden utilizar otros enfoques, como las terapias celulares (cuadro rosa) o los implantes protésicos de retina

(cuadro amarillo). Las terapias compuestas (recuadro negro), basadas en tratamientos farmacológicos, podrían usarse como un enfoque alternativo cuando la causa genética de la enfermedad o la vía involucrada son conocidas o desconocidas. Para las enfermedades en etapa tardía, la optogenética o las prótesis retinianas pueden ser la única opción. Fuentes de imagen: smart.servier.

## **TERAPIAS MOLECULARES**

Debido a la gravedad y la heterogeneidad de los DHR, se están realizando gran cantidad de investigaciones para identificar estrategias terapéuticas que puedan mejorar los síntomas y/ o la progresión de la enfermedad, incluidas muchas que se centran en resolver las consecuencias de un defecto genético particular. Sin embargo, un buen candidato para terapias moleculares requiere:

- una carga sustancial de enfermedad y una relación riesgo / beneficio favorable en comparación con otra terapia, si la hay.
- El gen / locus relevante involucrado en la enfermedad ya ha sido identificado y existe un amplio conocimiento del mecanismo molecular de la enfermedad y su progresión.
- Se puede alcanzar la (s) célula (s) objetivos correctos, con o sin el uso de un vehículo terapéutico.
- La mejora fenotípica se puede lograr preferiblemente con niveles de expresión limitados del gen terapéutico, mientras que su sobreexpresión no ejerce ningún efecto tóxico.
- Podemos subdividir las estrategias moleculares en diferentes grupos: ADN, ARN y terapias compuestas.

A continuación, se presentan tres tablas en las que se resumen los ensayos clínicos, que para DHR, se están realizando con diferentes enfoques terapéuticos.

- Tabla 1. Resumen de ensayos clínicos para Distrofias Hereditarias de la Retina (DHR) usando terapias de ADN.
- Tabla 2. Lista de ensayos clínicos para DHR que utilizan terapias de ARN.
- Tabla 3. Resumen de ensayos clínicos para DHR que utilizan terapias compuestas.

**Tabla 1.** Resumen de ensayos clínicos para enfermedades retinianas hereditarias (IRD) usando terapias de ADN.

Gen / condición	Molécula Terapéutica	Identificador de ensayo clínico	Estado
<i>Aumento de genes</i>			
<i>ABCA4</i>	SAR422459	NCT01367444	Reclutamiento
	SAR422459	NCT01736592	Inscripción por invitación
<i>CHM</i>	AAV2-hCHM	NCT02341807	Activo, no reclutando
	AAV2-REP1	NCT03496012	Reclutamiento
	AAV2-REP1	NCT03507686	Reclutamiento
	AAV2-REP1	NCT02407678	Activo, no reclutando
	rAAV2.REP1	NCT02671539	Activo, no reclutando
	rAAV2.REP1	NCT02077361	<b>Terminado</b>
	rAAV2.REP1	NCT01461213	<b>Terminado</b>
	AAV2-REP1	NCT03584165	Inscripción por invitación
<i>CNGA3</i>	AAV2-REP1	NCT02553135	<b>Terminado</b>
	AGTC-402	NCT02935517	Reclutamiento
	AAV2 / 8-hG1.7p.coCNGA3	NCT03758404	Reclutamiento
<i>CNGB3</i>	rAAVhCNGA3	NCT02610582	Activo, no reclutando
	rAAV2tYF-PR1.7-hCNGB3	NCT02599922	Reclutamiento
	AAV2 / 8-hCARp.hCNGB3	NCT03001310	Reclutamiento
<i>MERTK</i>	AAV-CNGB3	NCT03278873	Reclutamiento
	rAAV2-VMD2-hMERTK	NCT01482195	Reclutamiento
<i>MYO7A</i>	UshStat	NCT02065011	Inscripción por invitación
<i>PDE6B</i>	AAV2 / 5-hPDE6B	NCT03328130	Reclutamiento
<i>RPE65</i>	AAV OPTIREP	NCT02946879	Reclutamiento
	rAAV2-CBSB-hRPE65	NCT00481546	Activo, no reclutando
	AAV2-hRPE65v2-	NCT00516477	Activo, no reclutando
	AAV2-hRPE65v2	NCT00999609	Activo, no reclutando
	AAV2-hRPE65v2	NCT01208389	Activo, no reclutando

<b>Gen / condición</b>	<b>Molécula Terapéutica</b>	<b>Identificador de ensayo clínico</b>	<b>Estado</b>
	AAV2-hRPE65v2	NCT03602820	Activo, no reclutando
	tgAAG76 (rAAV 2 / 2.hRPE65p.hRPE65)	NCT00643747	<b>Terminado</b>
	rAAV2-CB-hRPE65	NCT00749957	<b>Terminado</b>
	rAAV2-hRPE65	NCT00821340	<b>Terminado</b>
	rAAV2 / 4.hRPE65	NCT01496040	<b>Terminado</b>
	AAV RPE65	NCT02781480	<b>Terminado</b>
<i>RLBP1</i>	CPK850	NCT03374657	Reclutamiento
	AAV8-RPGR	NCT03116113	Reclutamiento
<i>RPGR</i>	AAV2 / 5-hRKp.RPGR	NCT03252847	Reclutamiento
	rAAV2tYF-GRK1-RPGR	NCT03316560	Reclutamiento
	AAV8-scRS / IRBPhRS	NCT02317887	Reclutamiento
<i>RS1</i>	rAAV2tYF-CB-hRS1	NCT02416622	Activo, no reclutando
<b>Edición genómica</b>			
<i>CEP290</i>	EDITAR-101 (AGN-151587)	NCT03872479	Reclutamiento
<b>Optogenética</b>			
RP avanzado	RST-001	NCT02556736	Reclutamiento
RP retinitis pigmentaria no sindrómica	GS030-DP	NCT03326336	Reclutamiento

El negro y el gris solo se usan para indicar las diferentes secciones y se pueden considerar como encabezados. Se indica la condición del gen o la enfermedad (primera columna), la molécula terapéutica (segunda columna), el identificador del ensayo clínico (tercera columna) y el estado actual del ensayo (última columna). Las pruebas completadas se resaltan en negrita. Datos obtenidos de <https://clinicaltrials.gov/>. RP: retinitis pigmentosa.

**Tabla 2.** Lista de ensayos clínicos para IRD que utilizan terapias de ARN.

<b>Gene</b>	<b>Molécula Terapéutica</b>	<b>Identificador de ensayo clínico</b>	<b>Estado</b>
	QR-110	NCT03140969	Activo, no reclutando
<i>CEP290</i>	QR-110	NCT03913130	Reclutamiento
	QR-110	NCT03913143	Reclutamiento
<i>USH2A</i>	QR-421a	NCT03780257	Reclutamiento

El negro solo se usa para indicar las diferentes secciones y puede considerarse como encabezados. Se indican el gen (primera columna), la molécula terapéutica (segunda columna), el identificador del ensayo clínico (tercera columna) y el estado actual del ensayo (última columna). Datos obtenidos de <https://clinicaltrials.gov/>.

**Tabla 3.** Resumen de ensayos clínicos para IRD que utilizan terapias compuestas.

<b>Gene</b>	<b>Molécula Terapéutica</b>	<b>Identificador de ensayo clínico</b>	<b>Estado</b>
	ALK-001	NCT02402660	Reclutamiento
<i>ABCA4</i>	Zimura	NCT03364153	Activo, no reclutando
	Emuxostat	NCT03772665	Reclutamiento
	Emuxostat	NCT03033108	<b>Terminado</b>
	QLT091001	NCT01014052	<b>Terminado</b>
<i>RPE65</i>	QLT091001	NCT01521793	<b>Terminado</b>
	QLT091001	NCT01543906 *	<b>Terminado</b>
<i>RS1</i>	Dorzolamida 2% TID o brinzolamida 1% TID	NCT02331173	<b>Terminado</b>

El negro solo se usa para indicar las diferentes secciones y puede considerarse como encabezados. Se indican el gen (primera columna), la molécula terapéutica (segunda columna), el identificador del ensayo clínico (tercera columna) y el estado actual del ensayo (última columna). Las pruebas completadas se resaltan en negrita. Datos obtenidos de <https://clinicaltrials.gov/>. \* Cabe destacar que el ensayo NCT01543906 describe el uso de QLT091001 en pacientes con una mutación dominante de *RPE65* (a diferencia de la mayoría de las mutaciones de *RPE65* heredadas de manera autosómica recesiva).

Entre las terapias en las que se emplea ADN, para tratar las Distrofias Hereditarias de la Retina (DHR), nos encontramos:

Aumento de genes  
Edición del Genoma  
Ontogenética

A lo largo de las siguientes líneas, el artículo, desarrolla estas terapias

## **AUMENTO DE GENES**

En la terapia de aumento de genes (también conocida como terapia de reemplazo de genes), se inserta una copia normal del gen mutado en las células huésped usando vectores terapéuticos. Para permitir esto, el gen de interés podría administrarse como ADN, como ARN mensajero (ARNm) o como análogo de ARNm. La gran ventaja de la plataforma de ARNm es que no requiere entrega en el núcleo y se reduce el riesgo de integración en el genoma del huésped. Sin embargo, dos de los principales desafíos del suministro de ARNm son la inmunogenicidad y la estabilidad de la molécula de ARN. Por lo tanto, dado que se requiere una producción sostenida de la proteína de interés para la mejora continua de la función visual, la plataforma de ADN es la estrategia preferida para la terapia de aumento del gen ocular. Con esto, el gen de interés se introduce en el núcleo celular, donde a menudo permanece en un estado episomal, mientras que los promotores y potenciadores pueden facilitar su expresión.

El ADN puede administrarse usando uno de varios vectores diferentes, pero en particular para Las DHR, los virus adenoasociados (AAV) se han usado más comúnmente debido a su alta afinidad por ciertas células de la retina y su baja inmunogenicidad. Otros vectores en estudio son los lentivirus y las nanopartículas, que tienen mayores capacidades de carga.

Las etapas avanzadas de la degeneración de la retina no son compatibles con el uso de la terapia de aumento de genes, ya que este enfoque requiere que las células objetivo estén vivas. Además, alcanzar niveles sustanciales de expresión génica es crucial para un rescate significativo y fuerte del fenotipo. Este requisito puede mejorarse, por ejemplo, variando los serotipos de AAV que se utilizan para administrar el transgén, variando la secuencia promotora o produciendo versiones de ADNc optimizadas por codón de un gen dado.

Para las DHR, el aumento de genes es actualmente la estrategia terapéutica más avanzada, con la aprobación en, el mercado, de una terapia génica para afectados de mutaciones en el gen ( RPE65 , Luxturna TM ), actualmente hay varios estudios clínicos en curso para mutaciones en otros genes y el desarrollo preclínico para una gran cantidad de genes mutados en estas enfermedades. A pesar de estos resultados prometedores, las estrategias de aumento de genes pueden no ser el mejor enfoque cuando se tratan afecciones dominantes, ya que el alelo mutado subyacente a la enfermedad con mayor frecuencia primero debe desactivarse de manera que no interfiera con el alelo normal. Tal inhibición de expresión específica de alelo se puede lograr a nivel de ADN o al nivel de ARN y, si es necesario, se pueden combinar con el aumento de genes. Además, la capacidad de carga del AAV sigue siendo un desafío, ya que varios de los genes mutados recurrentemente (p. Ej., USH2A, EYS, etc.) lo superan con creces. Varios estudios que usan AAV dobles o incluso triples o microgenes (versiones más pequeñas del gen) están en curso.

## **EDICION DEL GENOMA**

Además del aumento de genes, la edición precisa del ADN genómico ha ganado una enorme atención en los últimos cinco años. Actualmente, hay dos enfoques principales en la edición del genoma: un enfoque in vivo, en el que las mutaciones que causan la enfermedad se corrigen dentro de la retina y un enfoque ex vivo para corregir primero la mutación en las células derivadas del



paciente, que puede ser seguida por el posterior trasplante de estas células. La edición en sí se puede lograr mediante diferentes clases de moléculas, como se describe a continuación.

ZFN y TALEN: las nucleasas con dedos de zinc (ZFN, del inglés zinc-finger nucleases) y los activadores de la transcripción como las nucleasas efectoras (TALEN) son moléculas que fueron pioneras en la edición del genoma. Ambos pueden inducir una amplia gama de modificaciones genéticas mediante la generación de rupturas de doble cadena (DSB) en el ADN, y posteriormente se estimula una de las vías de reparación del ADN de la célula:

- la unión final no homóloga (NHEJ).
- la reparación dirigida por homología (HDR).
- la unión final mediada por microhomología.

Para inducir DSB, cualquiera de las nucleasas necesita ser guiada a su secuencia diana por un dominio de proteína de unión a ADN. Por lo tanto, estos enfoques dependen de la ingeniería de nuevas proteínas para cada diana, lo que los hace laboriosos y desafiantes. Sin embargo, las ZFN se han utilizado como tratamiento de prueba de concepto en DHR. Células embrionarias humanas que llevan el c.68C> A; La mutación p.P23H en RHO se apuntó usando ZFN, lo que condujo a un aumento en los eventos de recombinación homóloga cuando los ZFN se transfectaron con una plantilla de donante homólogo, en comparación con la entrega en ausencia de esta plantilla.

Los TALEN se han usado en la corrección del alelo *Crbrd8* en ratones C57BL / 6N. La HDR provocada por una combinación de TALEN y una plantilla de reparación de oligonucleótidos de donante monocatenario se observó en el 27% de los embriones de ratón tratados y resultó en una mejora de la función retiniana.

Sistema CRISPR / Cas: El sistema CRISPR / Cas se considera una herramienta de edición del genoma más avanzada en comparación con ZFN y TALEN, ya que presenta muchas ventajas, incluido el diseño simple del objetivo, su mayor eficacia y su capacidad para introducir mutaciones en múltiples genes al mismo tiempo mediante el uso de una combinación de ARN guía (ARNg). El sistema CRISPR / Cas se ha mejorado a una versión más simple, CRISPR / Cas9, que actualmente se usa para la edición del genoma de mamíferos. La endonucleasa Cas9 se introduce en una célula junto con un ARNg, después de lo cual puede cortar el genoma específicamente en cualquier ubicación deseada.

En cuanto a otras herramientas de edición del genoma, su principal limitación es la posibilidad de efectos fuera del objetivo. Para superar este aspecto, los investigadores han desarrollado diferentes estrategias:

- usar ribonucleoproteínas (RNP) como forma de entrega.
- valorar la concentración de gRNA y Cas9 o usar dos gRNA que flanquean la región objetivo.
- añadir dos bases de guanina adicionales en el extremo 5 'de la secuencia de ARNg para Cas9 derivado de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9); Curiosamente, esta modificación en el diseño no redujo la relación objetivo tanto in vivo como in vitro.

- seleccionar sitios objetivo de ADN únicos sin homología con ninguna otra secuencia génica.
- el uso de nucleasas Cas9 modificadas que cortan solo una hebra de ADN y, por lo tanto, pueden producir DSB con dos veces más especificidad.
- empleando una versión de alta fidelidad de Cas9 (SpCas9- HF1).
- utilizando el SpCas9 de 'especificidad mejorada', que según se informa no solo disminuye los eventos fuera del objetivo sino también para obtener una mayor eficacia en el objetivo.

Todas estas estrategias han permitido a los investigadores obtener tasas de edición in vitro relativamente altas, pero estas tasas son generalmente más bajas in vivo, por ejemplo, en las retinas tratadas. El primer desafío es la entrega del sistema CRISPR directamente en las células o tejidos de interés. Como se mencionó anteriormente, los vectores de AAV se consideran actualmente el vector terapéutico más potente para el suministro retiniano. Sin embargo, su capacidad de carga limitada dificulta una entrega eficiente del sistema CRISPR / Cas9 completo. Una solución para este problema es la administración de SpCas9 y gRNA separados en dos vectores, con los cuales Hung y sus colegas obtuvieron una eficacia de edición del 84% en la retina del ratón. Otros estudios que utilizan dos vectores AAV también han obtenido buenos resultados en los últimos años, aunque debe mencionarse que estos estudios in vivo solo utilizaron la tecnología CRISPR / Cas9 para activar NHEJ, lo que no resultó adecuado con la posterior inactivación de genes. Una preocupación importante que queda por resolver es cómo aumentar la eficacia de la corrección del genoma en la retina, ya que los fotorreceptores son células post-mitóticas que en gran medida carecen de mecanismos HDR. Suzuki y sus colegas desarrollaron una estrategia de integración dirigida independiente de la homología, que permite la inserción selectiva en células que no se dividen como los fotorreceptores. Esto aparece como un enfoque prometedor, ya que se basa en el mecanismo NHEJ, a diferencia de HDR, para la integración específica de una secuencia de ADN deseada.

Además de la edición precisa, el sistema CRISPR / Cas9 también se puede usar de otras maneras, como la invalidación de alelos mutantes que subyacen a la DHR autosómica dominante (revisado por Diakatou et al.), o la eliminación de secuencias intrónicas que albergan agentes patógenos pseudoexones. Para este último, Maeder y sus colegas desarrollaron recientemente un enfoque basado en CRISPR / Cas9 (EDIT-101) para la mutación de empalme c.2991 + 1655A> G en CEP290. EDIT-101 promueve la eliminación de parte del intrón 26 donde se encuentra la variante profunda-intrónica. Se probó en un modelo de ratón Cep290 humanizado que portaba la variante c.2991 + 1655A> G y un vector sustituto comparable de primates no humanos (NHP) también mostró una edición eficiente en fotorreceptores y células de primates somáticas.

Aunque todavía deben superarse varios obstáculos, el desarrollo del sistema CRISPR / Cas9 ha abierto nuevas vías para el tratamiento futuro de varios subtipos genéticos de DHR.

## **OPTOGENETICA**

Aunque la terapia de aumento de genes específicos es un enfoque muy atractivo en pacientes con un genotipo conocido y en una etapa temprana relativa de la enfermedad, no es adecuada para pacientes que presentan una

etapa más avanzada de la enfermedad en la que muchos de los fotorreceptores han sido perdidos.

La optogenética es una técnica utilizada para controlar la actividad neuronal con luz, LO que se puede lograr mediante la introducción genética de proteínas sensibles a la luz en las células de la retina. Esta estrategia se usa a menudo para convertir neuronas secundarias o terciarias en "fotorreceptores" o, con menos frecuencia, para restaurar la sensibilidad de las células de fotorreceptores degeneradas. Una ventaja de la optogenética es que puede excitar con mayor precisión la vía neural en comparación con, por ejemplo, los implantes electrónicos de retina. Además, la optogenética se puede utilizar independientemente del defecto genético primario.

Las opsinas representan la principal herramienta optogenética. Funcionan como receptores sensoriales o canales iónicos sensibles a la luz. Se han descrito dos tipos de opsina: opsinas microbianas (tipo I) y opsinas animales (tipo II).

- Las opsinas de tipo I (canalrodopsinas, halorodopsinas y arqueodopsinas), después de la captura de luz, dan como resultado un flujo pasivo de iones a través de la membrana celular. Cuando se introducen en células no sensibles a la luz, las opsinas microbianas pueden inducir un control óptico rápido de procesos celulares específicos. Las opsinas tipo I permiten la activación y el silenciamiento neural a alta velocidad, sin requerir ningún químico adicional.

- Las opsinas de tipo II (rodopsina y melanopsina) son parte de la gran familia de receptores acoplados a proteínas G sensibles a la luz (GPCR) naturales. A diferencia de las opsinas microbianas, las opsinas animales presentan una sensibilidad a la luz mucho mayor, ya que la señal de luz se amplifica mediante cascadas de señalización acopladas a la proteína G. Ambos tipos de opsinas son lo suficientemente pequeños como para ser encapsados en AAV.

Los experimentos en modelos animales (ratón, rata y perro) revelaron que la expresión de opsinas de tipo II dio como resultado una mayor sensibilidad a la luz, dentro de 1 a 2 unidades logarítmicas del umbral para la visión normal del cono, aunque esta sensibilidad puede tener el costo de una cinética más lenta. En contraste, el uso de opsinas de tipo I es superior en términos de cinética, pero su sensibilidad es menor. Sin embargo, ambos tipos están limitados en su rango operativo de niveles de luz y probablemente requerirán la modificación de la señal de luz entrante. Además, muchas preguntas aún deben abordarse, como la identificación del mejor vector y el enfoque quirúrgico. Aunque se ha utilizado una amplia gama de promotores ubicuos, fotorreceptores, bipolares o de células ganglionares específicas, la condición ideal hasta ahora no está clara.

Actualmente, hay dos ensayos clínicos en curso que utilizan optogenética para la restauración de la visión. Uno comprende un ensayo clínico de fase I / II (NCT02556736;) y un segundo ensayo todavía está en un estado de reclutamiento (NCT03326336), sin ningún resultado informado aún para ambos ensayos.

## **Terapias de ARN**

Las terapias de ARN incluyen:

- Modulación del punto de Splicing
- Silenciamiento génico postranscripcional
- Edición de ARN (dCas13 y ADAR)

### **MODULACION DEL PUNTO DE SPLICING**

Oligonucleótidos antisentido (AON): alrededor del 15% de todas las mutaciones que causan DHR afectan el proceso de Splicing. Actualmente, la terapia genética más utilizada para corregir el Splicing aberrante emplea oligonucleótidos antisentido (AON), pequeñas moléculas de ADN o ARN que se unen a su pre-ARNm objetivo de forma complementaria. De hecho, su capacidad para modular el Splicing ofrece varias ventajas sobre los enfoques de reemplazo de genes, especialmente para las DHR. Inicialmente, los AON eran moléculas de ARN antisentido simples, pero se descubrió que se degradan rápidamente por las nucleasas. Por lo tanto, se agregaron múltiples modificaciones químicas para la columna vertebral o los grupos de azúcar para mejorar su afinidad objetivo y resistencia a la actividad nucleasa. Estos nuevos AON se clasificaron como AON de primera o segunda generación, dependiendo de sus modificaciones químicas. Una clase de tercera generación de AON consiste en análogos de ácidos nucleicos. Debido a su tamaño relativamente pequeño, se ha demostrado que los AON pueden administrarse al ojo como moléculas desnudas o en un AAV utilizando un sistema U7-snrRNA modificado.

El primer fármaco aprobado basado en AON fue Formivirsén, también conocido como Vitravene. Vitravene se usó para tratar la retinitis por citomegalovirus en pacientes cuyo sistema inmunitario estaba comprometido. En los últimos años, el número de mutaciones que causan DHR que afectan al Splicing previo al ARNm ha aumentado rápidamente. Un ejemplo es una mutación intrónica profunda recurrente en CEP290 (c.2991 + 1665A> G) ceguera congénita subyacente. Para esta mutación, el potencial de la terapia basada en AON se demostró primero en modelos in vitro e in vivo y más adelante, en un ensayo clínico de fase I / II. También se han desarrollado estudios de prueba de concepto prometedores que emplean AON para otras mutaciones en CEP290, y para otros genes mutados en DHR como OPA1, CHM, USH2A y ABCA4.

Además del ensayo clínico para CEP290 (NCT03140969) también hay un ensayo clínico en curso para USH2A. Los resultados obtenidos hasta ahora indican que la terapia basada en AON es una estrategia terapéutica prometedora, aunque solo para un grupo seleccionado de mutaciones que causan DHR. Sin embargo, el uso de la secuenciación del genoma completo o la secuenciación dirigida de genes completos probablemente identificará más mutaciones susceptibles de este tipo de terapia en el futuro cercano.

ARN spliceosomal U1: se han identificado muchas mutaciones del sitio donante de Splicing exónico (SD) en el último nucleótido de un exón y se predice que más del 95% de estas darán como resultado un Splicing aberrante. El proceso de Splicing necesita el reconocimiento de los sitios de Splicing y el posterior ensamblaje del Splicing. Este último se inicia mediante la formación de complejos estables que consisten en un pequeño ARN nuclear y la proteína U1 (U1 snRNA), proteínas pre-mRNA y factor de Splicing. Los sitios donantes de Splicing son reconocidos directamente por el complejo U1 y son cruciales para un Splicing adecuado de exones. En caso de que los nucleótidos dentro

del sitio donante de Splicing de un exón estén mutados, un enfoque terapéutico atractivo es usar un snRNA U1 modificado. Tanner y sus colegas demostraron que una mutación que induce la omisión de exón en RHO (c.936G> A; p.Q311Q) puede rescatarse adaptando el snRNA U1 a la mutación. En los últimos años, este enfoque también se ha empleado con éxito in vitro, para rescatar una mutación en el exón 5 del gen BBS1 que subyace al síndrome de Bardet-Biedl, o una mutación en el intrón 10 que causa RP ligado al X asociado a RPGR. Por lo tanto, el sistema U1 snRNA definitivamente tiene cierto potencial terapéutico para las mutaciones que afectan el sitio donante de Splicing. Sin embargo, los posibles efectos fuera del objetivo causados por la entrega de un snRNA U1 modificado exógeno aún están poco estudiados.

**Trans-splicing:** Trans-splicing es un proceso natural que resulta en un procesamiento alternativo del pre-mRNA y se informó por primera vez en plantas y bacterias. El trans-splicing terapéutico ofrece una interesante estrategia para eliminar mutaciones del ARNm. Solo la introducción de una molécula de ARN exógeno puede ser suficiente para activar el proceso de Splicing trans. Este ARN exógeno, también llamado PTM (molécula de trans-Splicing pre-ARNm), está constituido por un dominio de unión que se dirige específicamente a la molécula hacia una región específica dentro del pre-ARNm endógeno, una secuencia de intrón artificial que alberga todos los elementos necesarios para empalmar y la secuencia que necesita ser reemplazada. Para un PTM 5', la secuencia de codificación parcial tiene que terminar en el extremo 3' de un exón para permitir un sitio de Splicing de 5' y viceversa para un sitio de Splicing de 3'. En los últimos años, el Splicing trans ha revelado resultados prometedores para la corrección de mutaciones en RHO y CEP290. En el primer ejemplo, Berger y sus colaboradores pudieron corregir las mutaciones de RHO ubicadas en los exones 2 a 5 al entregar la secuencia correcta de esos exones en un AAV. Esto condujo a eventos exitosos de trans-splicing, tanto in vivo como in vitro. Dooley y sus colegas entregaron una parte del gen CEP290 en un AAV y, por lo tanto, pudieron reemplazar con éxito la mutación c.2991 + 1655A> G mencionada anteriormente utilizando el enfoque de Splicing trans. Estos datos respaldan la utilidad del trans-splicing como herramienta terapéutica en IRD.

## **SILENCIAMIENTO GENICO POSTTRANSCRIPCIONAL**

iRNA y ribozimas: tanto las ribozimas de Hammerhead (hhRz) como los ARN (s) de interferencia (iRNA) catalizan la escisión específica de secuencia de los ARNm diana. Las moléculas de ARNi son ARN bicatenarios que pueden inhibir la expresión génica uniéndose a ARNm específicos (celulares o virales). A pesar de su asequibilidad y velocidad, el efecto de iRNA a menudo es incompleto y temporal, con posibles efectos fuera del objetivo. Además, a menudo ocurren variaciones entre experimentos y laboratorios. Estas variaciones limitan la amplia aplicación de la tecnología iRNA en muchas enfermedades, incluidos las DHR, aunque se han obtenido resultados prometedores en la degeneración macular relacionada con la edad, un subtipo multifactorial de la enfermedad de la retina. Específicamente, Ryoo y sus colegas utilizaron una novedosa nanoball anti-VEGF (anti-factor de crecimiento endotelial vascular) basada en siRNA que, tras la administración intravítrea en ratones, mostró efectos terapéuticos durante al menos dos semanas.

Los HhRz son pequeñas moléculas de ARN que causan la escisión enzimática de los polirribonucleótidos. El hhRz consta de tres hélices que rodean un núcleo catalítico conservador evolutivo. Esto da lugar a una región complementaria antisentido que proporciona al ARN unimolecular la capacidad de reconocer y posteriormente escindir enzimáticamente su ARNm objetivo.

Ambos tipos de moléculas (iRNA y hhRz) se han utilizado con éxito para degradar una transcripción de RHO incorrecta responsable de la retinitis pigmentosa dominante, un subtipo común de DHR. Otra alternativa es emplear microARN (miARN), que actúan a nivel postranscripcional para regular la expresión génica en la retina. Los miARN generalmente se unen al ARNm y causan una reducción de los productos traducidos. Algunos miRNAs se expresan comúnmente en todos los tipos de células de la retina, mientras que otros se expresan específicamente en uno u otro, lo que sugiere que hay posibilidades de emplear estas moléculas terapéuticamente. Sin embargo, se necesitan más estudios antes de que realmente se puedan usar miRNAs. En general, se cree que el silenciamiento génico post-transcripcional mediado por iRNA y ribozimas es una estrategia prometedora para tratar las mutaciones dominantes negativas.

AON dependientes de RNasa H: además de redireccionar el Splicing, los AON también se pueden usar para degradar específicamente las transcripciones, incluso de una manera específica de alelo. Algunas modificaciones de oligonucleótidos combinan segmentos AON con residuos conformacionalmente restringidos que afectan la escisión de sus objetivos previstos. Con esto, se puede inducir la activación catalítica de RNasa H, una enzima ubicua que escinde la parte de ARN de los dúplex híbridos de ADN / ARN. La gran ventaja de estos dúplex híbridos es que solo una pequeña cantidad de AON es suficiente para inducir el recambio catalítico. Además, este recambio catalítico proporciona tiempo suficiente para que los AON actúen como un fármaco potencial debido a su estabilidad en el suero sanguíneo, es decir, unos pocos días. Murray y sus colegas utilizaron modelos de roedores genéticamente modificados para RHO (p.P23H) para analizar los AON que activan la RNasa H in vivo. Observaron que la eliminación de la expresión de rodopsina p.P23H mediada por AON redujo la degradación de los fotorreceptores, preservando así la función de los fotorreceptores en las ratas transgénicas. Recientemente, la regulación por disminución de la transcripción mediada por AON también se ha evaluado in vitro para una variante NR2E3 subyacente RP autosómica dominante, lo que subraya la utilidad de este enfoque para algunas mutaciones (dominantes).

Cas13: El sistema de edición basado en Cas13 puede reducir las tasas de efecto fuera del objetivo mostradas por otros sistemas como se explicó anteriormente. El efector CRISPR-Cas dirigido a ARN dirigido a ARN Cas13 (anteriormente denominado C2c2) puede ser diseñado para unirse y posteriormente derribar el ARN de mamífero. Abudayyeh y sus colegas verificaron que, para los genes endógenos, la eficiencia de eliminación depende de la transcripción. A pesar de que la eficacia fue comparable a la mostrada por iRNA, por lo tanto, la relación fuera del objetivo sustancialmente más baja hace que este enfoque sea muy adecuado para aplicaciones terapéuticas.

## **EDICION DE ARN (dCas13 y ADAR)**

La familia de proteínas ADAR (adenosina desaminasa que actúa sobre el ARN) puede mediar la edición endógena de las transcripciones mediante la desaminación de adenosina a inosina, una nucleobase que es funcionalmente equivalente a la guanosina tanto en Splicing como en traducción. Cox y sus colegas diseñaron un Cas13 inactivado catalíticamente (dCas13) que es capaz de retener su capacidad de unión a ARN, dirigir un ADAR hacia la transcripción de ARN de interés y realizar su función de adenosina a inosina desaminasa. Esto demostró la flexibilidad de Cas13 para adaptarse como una herramienta para la modificación de ácido nucleico. El sistema que se creó se llama REPAIRv2 y genera una mayor especificidad en comparación con otras plataformas de edición de ARN informadas hasta ahora, con altos niveles de actividad en el objetivo. Otras ventajas incluyen:

- (i) Cas13 no tiene restricciones de secuencia de direccionamiento y no presenta ningún motivo preferencial que rodea la adenosina objetivo, lo que permite que cualquier adenosina en el transcriptoma sea potencialmente objetivo.
- (ii) el sistema REPAIRv2 desamina directamente las adenosinas objetivo a inosinas y no depende de las vías de reparación endógenas, lo que permite la edición de ARN en células post mitóticas como neuronas y fotorreceptores.
- (iii) la edición de ARN, a diferencia de la edición de ADN, es transitoria y, por lo tanto, se puede revertir más fácilmente, lo que permite un control temporal sobre la edición de eventos.

Estas características hacen que la edición de ARN sea una estrategia interesante para ser utilizada en futuros estudios terapéuticos en DHR.

## **TERAPIAS COMPUESTAS**

Como sucede en otros tipos de enfermedades, el desarrollo farmacológico puede ofrecer un enfoque completamente diferente para el tratamiento de DHR. Sin embargo, la gran heterogeneidad observada en las DHR presenta desafíos importantes hacia una terapia compuesta efectiva. En esta sección, enfocamos nuestra atención en algunos medicamentos prometedores para el tratamiento de DHR.

### **Traducción traslacional**

La terapia de traducción traslacional (TR) se basa en moléculas pequeñas, también conocidas como fármacos inductores de TR (TRID), que permiten que la maquinaria de traducción evite un codón de terminación prematura (PTC) durante la traducción. Además, los PTC pueden inducir la degradación del ARNm debido a una mutación nonsense (sin sentido) y, por lo tanto, también inhiben la expresión de proteínas normales (completa en su longitud). La incorporación de un aminoácido en el sitio del codón de parada prematuro puede aumentar la expresión de la proteína de longitud completa, así como la reducción de la desintegración mediada sin sentido. Hasta ahora, los mecanismos detallados por los cuales los TRID inducen su efecto terapéutico no se comprenden completamente. Sin embargo, se sabe que la eficiencia de TR depende de la competencia entre la decodificación del codón de parada por un tRNA cercano y el reconocimiento del codón de parada por eRF1. Hay dos clases principales de TRID: TRID aminoglucósidos y no aminoglucósidos. Desde el primer grupo, la gentamicina se ha utilizado más ampliamente para analizar la TR en diferentes modelos de enfermedad, incluidos los afectados con DHR. La eficacia de la gentamicina se estudió en diferentes modelos de ratas y ratones:

- (i) el modelo de rata S334ter que lleva una mutación sin sentido (c.1002T>A; p.S334 \*) en el gen que codifica el pigmento visual rodopsina (Rho).
- (ii) el rd12ratón, un modelo para la degeneración de la retina causada por

una mutación sin sentido en Rpe65.

El tratamiento sistemático con gentamicina mostró resultados diferentes entre los dos modelos. En ratas S334ter, se observó un rescate parcial de la supervivencia de fotorreceptores, sin embargo, no se observó rescate en ratones rd12. Los estudios sobre genes mutados en el síndrome de Usher (una forma sindrómica de DHR acompañada de (discapacidad auditiva) demostraron que los aminoglucósidos y sus derivados pueden mediar el TR de diferentes PTC causantes de enfermedades en los genes PCDH15 y USH1C, en ensayos de traducción in vitro y en células experimentos de cultivo.

El TRID PTC124 no aminoglucósido (también conocido como Ataluren) se usa en una amplia gama de enfermedades, incluida la distrofia muscular de Duchenne y la fibrosis quística, y se han realizado o están en curso varios estudios clínicos. Para los DHR, se han informado resultados prometedores usando PTC124 mediante la restauración de la proteína RP2 de longitud completa, cuyo gen codificador está mutado en RP ligado a X, así como para la proteína REP1, codificada por el gen CHM que está mutado en coroideremia. En el RP ligado a X, los bastones sufren principalmente la pérdida de RP2, aunque el efecto sobre los conos y las células RPE no debe descuidarse. Schwarz y sus colegas utilizaron TRID (tanto el aminoglucósido G418 como el PTC124) para aumentar con éxito los niveles de proteína RP2 de longitud completa en presencia de la mutación p. R120ter (c.358C> T; p.R120 \*). En la coroideremia, se han descrito muchas mutaciones sin sentido en CHM. Varios estudios intentaron usar TRID, incluido PTC124 o su análogo PTC-414, para aumentar los niveles de proteína REP1, ya sea en modelos celulares (fibroblastos humanos, RPE derivado de iPSC) o animales (pez cebra). Se encontró que la eficacia de la lectura es considerablemente variable, no solo dependiendo del tipo de codón sin sentido y su secuencia circundante, sino también de los niveles de transcripción restantes que pueden diferir significativamente entre los pacientes. Otro estudio, basado en la administración tópica de PTC124 al ojo, demostró la restauración funcional de la proteína harmonin (proteína involucrada en la percepción del sonido en el oído interno) en un modelo de ratón para el síndrome de Usher tipo 1c (USH1C).

Una de las desventajas del uso sistémico de los TRID es que, para muchas enfermedades, los medicamentos deben atravesar barreras físicas (como la barrera hematoencefálica o BRB). Estas barreras pueden reducir la disponibilidad de compuestos en el órgano objetivo después del tratamiento, lo que ilustra la necesidad de aumentar la dosis administrada a los pacientes o cambiar el método de administración de TRID (comúnmente intraperitoneal) hacia la administración local. Una estrategia para superar esto es la encapsulación de fármacos en liposomas específicos de tejido. En particular para los DHR, se deben considerar aplicaciones tópicas o inyecciones intraoculares en el futuro.

Restaurando la Proteostasis (Terapias de Proteínas)

Las células fotorreceptoras requieren una regulación rigurosa de la proteostasis (mantener un equilibrio saludable de proteínas) para garantizar su correcta función y viabilidad. Como resultado, ciertos cambios genéticos en genes específicos con una función esencial en la célula fotorreceptora pueden tener efectos dramáticos. Un ejemplo es el efecto negativo dominante de las mutaciones en RHO, que conduce a la interrupción de los segmentos externos en la célula fotorreceptora. La manipulación de mecanismos de proteostasis como la respuesta de choque térmico (HSR) o la respuesta de proteína desplegada podría ser un buen objetivo terapéutico para aliviar las enfermedades de plegamiento incorrecto (por ejemplo, regulación dirigida de estas vías para reducir la agregación de proteínas como la rodopsina). Esto



podría lograrse ya sea mediante la administración de fármacos que restablecen la proteostasis o dirigiéndose a moléculas clave en la red de proteostasis de fotorreceptores.

Hasta ahora, las terapias de "proteostasis" se centran en la rodopsina, ya que RHO es uno de los genes mutados con mayor frecuencia en la RP autosómica dominante. Una de las mutaciones más comunes en este gen es la mutación p.P23H, que actúa de forma dominante negativa en la rodopsina de tipo salvaje al inducir un plegamiento incorrecto. Curiosamente, se informó que las proteínas mal plegadas podrían ser rescatadas por un ligando que funciona como chaperona.

Las chaperonas farmacológicas son moléculas pequeñas específicas de sustrato que pueden dirigirse directamente a la estructura de la proteína y desplazar el equilibrio de plegamiento de la proteína hacia su estado nativo. Los estudios que utilizan este tipo de chaperonas sugirieron que la corrección del plegamiento de rodopsina mutante, sin mejorar su estabilidad, podría comprometer aún más los segmentos externos y aumentar la muerte de las células de los bastones. Por lo tanto, estos datos subrayan la necesidad de garantizar la estabilidad de la opsina utilizando estrategias de tratamiento paralelas.

Los kosmotropes (codisolventes) son compuestos pequeños de bajo peso molecular que pueden mejorar la estabilidad de las proteínas en su conformación nativa y disminuir la agregación. Los kosmotropes se unen a proteínas de forma inespecífica y, por lo tanto, tienen el potencial de ser utilizados en una amplia gama de enfermedades que pliegan mal las proteínas. Finalmente, otra alternativa para restaurar la proteostasis es a través del control de la maquinaria adaptativa que es responsable de su mantenimiento.

Terapias específicas ruta

El monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) es una molécula crucial para la transducción de la señal del fotorreceptor y tiene dos efectores celulares principales: canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos (CNGC) y proteína quinasa G dependiente de cGMP (PKG). Se ha informado que la sobreactivación de PKG puede ser suficiente para causar la muerte celular de los fotorreceptores y que sus niveles de activación son más altos en los fotorreceptores mutantes. Sabiendo que los CNGC juegan un papel importante en la conducción de la fototransducción, se han hecho algunas observaciones interesantes. La eliminación de las subunidades beta de CNGC protege los fotorreceptores en ratones rd1 que albergan un defecto en el Pde6bgen, que codifica la proteína fosfodiesterasa involucrada en la cascada de fototransducción. Por lo tanto, PKG o CNGC se pueden considerar como impulsores críticos de la enfermedad; en consecuencia, ambos son objetivos terapéuticos para la prevención de (más) degeneración retiniana. Como se mencionó anteriormente, el BRB puede evitar el acceso de agentes terapéuticos a la retina. Vighi y sus colegas superaron este problema utilizando un método de administración de fármacos liposomales, la formulación análoga liposomal cGMP LP-CN03, y demostraron una función visual mejorada, así como una degeneración reducida de fotorreceptores en modelos de ratones que albergan mutaciones en genes ortólogos de DHR. Juntos, estos datos sugieren que la señalización de cGMP podría ser una vía común para el objetivo del tratamiento de tipos de degeneración retiniana genética y fenotípicamente divergentes.

Otro medicamento previamente probado en ensayos clínicos es un cis-retinoide sintético administrado por vía oral, también conocido como QLT091001. Este fármaco desencadenó la restauración visual en modelos de ratones y perros mutantes y transgénicos mutantes para Rpe65. Los resultados del ensayo clínico NCT01014052 mostraron que QLT091001 mejoró la función visual en

sujetos con DHR debido a mutaciones LRAT o RPE65. Las mutaciones en estos genes pueden causar diferentes subtipos de DHR, generalmente clasificados como LCA o RP. A pesar de esto, el defecto genético exacto aparentemente no afectó la respuesta al fármaco tanto en pacientes con ACV como con RP. Tras la administración oral de QLT091001, los pacientes mostraron efectos beneficiosos en los fotorreceptores restantes de la retina en ambos ojos, aunque no detuvo por completo la progresión de la degradación de los fotorreceptores. El perfil de seguridad de este medicamento mostró efectos adversos transitorios, como dolores de cabeza o náuseas. En teoría, QLT091001 podría combinarse con la terapia de aumento de genes, aunque la combinación de tratamientos, en particular para las enfermedades huérfanas, plantea desafíos adicionales en el desarrollo de fármacos.

### **Utilización de moléculas terapéuticas**

#### **Métodos de administración ocular**

A pesar de su pequeño tamaño, el ojo contiene varios tipos de células y tejidos que pueden ser atacados por agentes terapéuticos. La tolerabilidad local de la administración de vectores en DHR se ha evaluado en varios estudios y hasta ahora no se han indicado problemas sistémicos graves. Comúnmente, podemos identificar dos métodos principales de administración potencial: inyecciones subretinianas e intravítreas.

Las inyecciones subretinianas se consideran más propensas a complicaciones (p. Ej., Desprendimiento de retina), especialmente en pacientes con integridad retiniana afectada, en comparación con la inyección intravítrea. Sin embargo, el vector se deposita mucho más cerca de sus células / región objetivo, lo que permite una transducción eficiente del vector en células RPE y / o fotorreceptores.

Las inyecciones intravítreas permiten una orientación más fácil del nervio óptico, el cristalino o la retina interna y, con menos frecuencia, la retina externa o la cámara anterior. También muestra menos complicaciones relacionadas con el procedimiento, pero la transducción del vector viral en fotorreceptores y células RPE es menos eficiente en comparación con las inyecciones subretinianas.

Además de estos dos métodos, existe un sistema alternativo: el suministro supracoroideo. Con esto, los agentes terapéuticos se depositan directamente al espacio supracoroideo ubicado entre la esclerótica y la coroides. Los estudios preclínicos en animales mostraron que la administración de fármacos supracoroideos tiene el mismo perfil de seguridad que las inyecciones intravítreas. Los resultados de ensayos clínicos completados (p. Ej., CT01789320) también han mostrado perfiles de seguridad alentadores, aunque es necesario considerar la posible propagación de vectores terapéuticos en la circulación sistémica.

Finalmente, existe la posibilidad de entrega tópica mediante el uso de gotas para los ojos. Sin embargo, este enfoque puede dar como resultado una menor biodisponibilidad y un mayor aclaramiento en comparación con los diferentes tipos de inyecciones. Además, las barreras oculares disminuyen la biodisponibilidad de los agentes terapéuticos aplicados tópicamente a menos del 5%. Por lo tanto, la efectividad de este método es menor que la reportada con los sistemas descritos anteriormente.

### **Vectores**

Además de las vías de administración, se ha desarrollado una amplia gama de enfoques de administración de genes virales y no virales en los últimos veinte años, para permitir una transferencia eficiente de moléculas terapéuticas a la célula objetivo-correcta. La elección de uno sobre otro depende del tipo de

célula o tejido que se desea identificar, la capacidad de clonación de cada uno de los vectores y las preocupaciones de seguridad.

## **Vectores virales**

**Virus adenoasociados (AAV):** más comúnmente, pero no exclusivamente, los genes terapéuticos son llevados a sus células diana por vectores virales. Los AAV son los vectores virales más comunes utilizados para la terapia génica en DHR, principalmente debido a su baja inmunogenicidad y toxicidad, y permiten la expresión transgénica a largo plazo.

El AAV recombinante (rAAV) es el vector viral más popular para la administración EN DHR. Su tropismo para diferentes tipos de células de la retina permite una transducción eficiente de estas células y una expresión transgénica relativamente rápida y estable. rAAV está disponible en dos formas, AAV monocatenario (ssAAV) y AAV autocomplementario (scAAV). Una vez que una célula se transduce con ssAAV, el ADN monocatenario del virus debe convertirse en la forma bicatenaria; Este es un paso de limitación de velocidad que se puede eludir con scAAV [1]. Los scAAV están diseñados de tal manera que, tras la infección, dos mitades complementarias generarán un ADN bicatenario, promoviendo una expresión transgénica más rápida y aumentada. Sin embargo, la principal desventaja de los scAAV es su capacidad de carga reducida (2,4 kb), en comparación con ssAAV (4,8 kb) que limita su selección de transgenes. Se ha demostrado que los vectores scAAV transducen células ganglionares de la retina, fotorreceptores y células RPE, y pueden conducir a la expresión transgénica dentro de los dos días posteriores a la inyección en ratones, mientras que ssAAV requiere varias semanas; Esta expresión transgénica rápida y aumentada fue independiente del serotipo AAV probado.

A pesar de sus numerosas ventajas, AAV presenta una capacidad de envasado limitada (4,8 kb). Para superar esto, se han desarrollado varias estrategias. Por ejemplo, con el uso de vectores duales de AAV, un ADNc se puede dividir en dos fragmentos separados, después de lo cual las dos partes se recombinan dentro de las células usando HDR, trans-splicing o ambas. Con esto, la capacidad se puede aumentar hasta 9 kb. El sistema dual AAV se ha utilizado en estudios preclínicos para administrar algunos genes mutados en DHR como ABCA4 y MYO7A, con resultados prometedores. Sin embargo, los AAV duales aún pueden no ser suficientes para varios otros genes mutados en DHR. El uso de enfoques triples de AAV permite aumentar la capacidad de carga a 14 kb, lo que permite el desarrollo de terapias génicas para DHRs causadas por mutaciones en genes aún más grandes. Maddalena y sus colegas demostraron el potencial de este sistema para restaurar la expresión del gen CDH23 (tamaño de ADNc 11.1 kB, mutado en el síndrome de Usher tipo 1D) y ALMS1 (tamaño de ADNc 12.9 kb, mutado en el síndrome de Almstrom). Ciertamente, el espacio subretiniano pequeño y cerrado puede facilitar la coinfección de la misma célula por tres vectores AAV independientes.

Hasta la fecha, se han identificado hasta 12 serotipos de AAV y más de 100 variantes en humanos y NHP. De estos, AAV2, AAV5 y AAV8 se han estudiado más extensamente, utilizándose como vector de entrega en varios estudios clínicos y preclínicos para diferentes genes como RPE65, CNGB3, RS1 o PDE6B. Los serotipos 2, 5, 7, 8 y 9 de AAV pueden transducir fotorreceptores, mientras que prácticamente todos los serotipos de AAV pueden infectar eficazmente las células RPE. Hasta ahora, AAV2 es el único vector descrito para transducir células ganglionares de la retina en el espacio intravítreo. Sin embargo, también se han desarrollado serotipos alternativos de AAV. Algunos ejemplos son los serotipos AAV7m8 [y AAV8BP2. Ambos fueron diseñados para alterar las cápsides de AAV con el objetivo de mejorar la absorción en la

retina y ser capaces de apuntar a los fotorreceptores después de la inyección intravítrea. El serotipo AAV7m8 fue generado por la evolución dirigida in vivo en la retina del ratón por Dalkara y colaboradores, Informaron que el suministro intravítreo de AAV7m8 resultó en un fotorreceptor panretiniano efectivo y una transducción de células RPE en ratones. Este serotipo también se probó en retinas de NHP mediante administración intravítrea. Los resultados indicaron una mayor tasa de transducción de fotorreceptores foveales y extrafoveales en comparación con el serotipo parental AAV2. Sin embargo, los autores también notaron toxicidad en un NHP inyectado con un alto título de AAV7m8. Por lo tanto, se requiere un estudio de seguridad y eficiencia de la transducción usando dosis más bajas de este serotipo si se planea usar esta cápside en primates, incluidos los humanos. El serotipo AAV8BP2 fue generado in vivo por Cronin y sus colegas, apunta a las células ON-bipolares y fotorreceptores de cono de manera eficiente después de las inyecciones intravítreas y subretinianas en el ratón. Este grupo de investigación realizó un estudio comparativo entre estos dos serotipos novedosos. Ambos vectores mostraron resultados prometedores en ratones, pero en los NHP, ya sea el suministro subretiniano o intravítreo no permitieron transducir todas las células diana dentro de la retina. Específicamente, AAV7m8 mostró algunos efectos de toxicidad (como se informó anteriormente), así como inflamación severa cuando se usa un título alto. Para AAV8BP2, se observó una menor transducción de células bipolares, incluso a dosis altas. Tomados en conjunto, los resultados de ambos serotipos indican que los estudios en roedores podrían no proporcionar información suficiente para comprender la transducción celular y las propiedades farmacológicas de estos AAV de ingeniería y se necesitan más estudios, por ejemplo, NHP antes de usarlos en humanos. Carvalho y sus colaboradores caracterizaron un serotipo diseñado en silico llamado Anc80 para la transferencia de genes en la retina. Se evaluaron tres variantes de Anc80, Anc80L27, Anc80L65 y Anc80L12, en ratones y NHP. Todos ellos fueron capaces de atacar eficazmente las células de la retina tras alcanzar el espacio subretiniano, aunque Anc80L65 mostró una mayor eficiencia para atacar las células de la retina, así como niveles de expresión más altos en comparación con AAV8. Estos datos respaldan el uso de Anc80L65 para el suministro de genes a la retina. Tomados en conjunto, todos estos estudios que caracterizan nuevos serotipos han ilustrado el impacto de cambios mínimos en la composición de la cápside en aspectos relevantes para aplicaciones experimentales y clínicas de transferencia de genes. Esto resultará útil para mejorar el suministro a la retina y, por lo tanto, para su uso en el desarrollo de nuevos tratamientos para DHR.

**Vectores lentivirales:** los lentivirus (LV) son virus de ARN de la familia de los retrovirus. En DHR, se ha probado la variante retroviral del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) o el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV). Los LV tienen la capacidad de pasar a través de la membrana nuclear intacta de las células e infectar tanto a las células en división como a las que no se dividen. Además, los LV integran eficientemente su genoma en el de la célula huésped, lo que lleva a una expresión estable. Los LV se modifican para detener la replicación, por lo que estos vectores no son patógenos después del suministro inicial de genes. Los LV presentan una carga de capacidad transgénica de 8-10 kb y, en términos de DHR, son capaces de infectar células RPE y, en menor medida, de fotorreceptores diferenciados. Los EIAV se han utilizado para ABCA4, ya que su tamaño de ADNc (6,8 kb) superó la capacidad de carga de AAV, pero no la de los lentivirus. Para evaluar esta estrategia en seres humanos, se ha llevado a cabo un ensayo clínico (NCT01367444) durante varios años, aunque no se han informado datos claros

de eficacia.

**Adenovirus y adenovirus dependientes de ayuda:** en comparación con los vectores virales mencionados anteriormente, los adenovirus (AdV) tienen una capacidad de carga de aproximadamente 8 kb, mientras que su adenovirus dependiente de ayuda 'destripado' (HDA<sub>d</sub>) tiene una capacidad extremadamente grande de hasta 36 kb. Está demostrado que los vectores adenovirales infectan las células RPE de manera eficiente, pero debido a que se presume que el receptor coxsackie-AdV está ausente en la membrana celular de los fotorreceptores, estos vectores no transducen eficientemente las células fotorreceptoras. En general, los AdV se han utilizado poco en el tratamiento de los DHR.

### **Vectores no virales**

Aunque varios vectores virales han demostrado su potencial en el tratamiento de DHR, existe una necesidad continua de vectores específicos para el ojo. Por lo tanto, los esfuerzos de investigación también se han dirigido al desarrollo de sistemas de administración no virales, como las nanopartículas (NP), el ADN desnudo o los liposomas.

El ADN desnudo es la forma más elemental de terapia génica no viral. Como el ADN desnudo generalmente no entra en las células, no se considera una terapia adecuada para el ojo. Diferentes estudios han utilizado la electroporación o la iontoforesis para obtener una absorción y expresión significativas en las células diana, sin embargo, ambas formas de administración presentaron desafíos significativos. Los efectos secundarios de la electroporación hacen que sea un método poco probable que sea clínicamente factible, mientras que la iontoforesis hasta ahora presenta información contradictoria sobre la efectividad real de este método.

Por el contrario, las NP son capaces de administrar en la retina, ADN plasmídico que contiene una copia funcional de un gen. Los tres determinantes de la efectividad del suministro de genes utilizando este tipo de vectores son la captación celular, el escape endosómico y la transferencia del ADN plasmídico al núcleo. Todas las formas de NPs (metal, lípidos o polímeros) tienen cierta capacidad para pasar a través de la membrana celular, evitar el atrapamiento endosómico y depositar el ADN plasmídico en el núcleo. Las NP basadas en lípidos son partículas biocompatibles y estables; Además, no hay respuesta inflamatoria a estas NP cuando se inyecta en el ojo. Sin embargo, también hay algunas desventajas, como una menor expresión génica en comparación con los mismos transgenes entregados por vectores virales. Trigueros y sus colegas desarrollaron recientemente un nuevo tipo de sistema de suministro utilizando nanopartículas de oro (ADN-NP de oro), ya que son relativamente fáciles de generar y se pueden adaptar a diferentes formas y tamaños. El oro es bien tolerado dentro de un organismo y presenta bajas tasas de toxicidad. Sin embargo, presentan una tasa de depuración baja, lo que dificulta su absorción en células o tejidos específicos. Antes de usar estas partículas como método de administración en la retina, es necesario comprender la complejidad de la interacción célula-NP, mejorar la administración de carga evitando vías degradantes (como la vía lisosómica) y asegurar una expresión constante de la terapia. gen.

Finalmente, los lípidos catiónicos (liposomas) ofrecen una forma alternativa de administrar ADN al ojo. Además de las dos formas más comunes de administración de la retina (ver arriba), otros métodos de administración como la administración tópica o intravenosa ya han reportado resultados positivos en enfermedades oculares. Sin embargo, los liposomas también presentan algunas limitaciones, como la toxicidad retiniana y la agregación después de la administración. En consecuencia, los investigadores desarrollaron un nuevo

tipo de liposoma -PEGilado con gas perfluoropropano- que parece ser más seguro y más eficiente para la transfección, pero, como sucedió con otros vectores basados en lípidos, presentó una caída en la expresión génica cuatro días después de la administración.

### **OTROS TRATAMIENTOS EN DHR**

Si bien las terapias basadas en genes pueden detener o al menos retrasar, la progresión de la enfermedad, otros enfoques prometedores que dependen menos de la causa genética de la enfermedad también están ganando impulso. Este es, por ejemplo, el caso del trasplante de células retinianas derivadas de células madre (terapia celular) o el uso de implantes protésicos.

### **Terapia celular**

Las células retinianas, como otras células dentro del sistema nervioso central, presentan un bajo potencial de regeneración. Por lo tanto, las terapias celulares podrían aplicarse en aquellos DHR que presentan una etapa de degeneración avanzada. El uso de este tipo de terapia tiene como objetivo la administración de células exógenas proporcionando la reactivación posterior de la función visual. Las células somáticas derivadas del paciente podrían usarse para reprogramar las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) que posteriormente podrían diferenciarse a las células precursoras de la retina e introducirse en el ojo para reemplazar los fotorreceptores o las células de soporte (por ejemplo, RPE) que proporcionan mantenimiento metabólico para prevenir una mayor degeneración de los fotorreceptores restantes. Herramientas de edición del genoma se pueden utilizar para reparar mutaciones específicas del paciente, para eventualmente trasplantar las células corregidas de vuelta al paciente. El uso de células madre embrionarias (ESC) no requeriría esta modificación genética y se ha demostrado que estas células también tienen una alta capacidad para diferenciarse en precursores de la retina. Sin embargo, el uso de ESC está asociado con consideraciones éticas que no están presentes con el uso de iPSCs generadas por los pacientes. Además, el trasplante de células retinianas derivadas de iPSC evitaría el riesgo de rechazo inmune después de la cirugía.

Siguiendo los avances prometedores que demostraron que el trasplante de fotorreceptores derivados de células madre puede restaurar la visión mediada por bastones y conos, estudios recientes mostraron que estas células trasplantadas no pueden integrarse bien en Retinas degenerativas del huésped. En cambio, parece que los fotorreceptores post-mitóticos del donante y del huésped pueden intercambiar ARN y proteínas, incluida la rodopsina. Las mejoras visuales medidas después del trasplante de fotorreceptores derivados de células madre también podrían ser el resultado de fotorreceptores endógenos que han absorbido proteínas derivadas de células donantes. Recientemente, se demostró que la integración celular y la transferencia citoplasmática pueden ocurrir, pero las contribuciones relativas de cada una dependen del entorno dentro de la retina del huésped.

Algunas terapias celulares que ya se han probado en la clínica usan hESC o RPE derivado de hiPSC, para tratar enfermedades como la AMD o la enfermedad de Stargardt. Para el estudio que empleó trasplante de RPE derivado de iPSC, un análisis de seguimiento de un año indicó que el trasplante no generó ningún efecto adverso y que no se indujo una respuesta inmune, incluso en ausencia de inmunosupresión. Uno de los estudios que usaban RPE derivado de hESC también informó una mejora de la visión en pacientes con degeneración macular relacionada con la edad, así como en aquellos con enfermedad de Stargardt. Sin embargo, se necesitan más estudios para

proporcionar protocolos reproducibles para generar células precursoras de fotorreceptores derivadas de iPSC. Además, si tales células se trasplantan después de la reparación de la mutación genética, los controles de calidad estrictos de los iPSC antes y después de la edición del genoma son extremadamente importantes.

## **Implantes de prótesis retinianas**

Las neuronas retinianas internas retienen en gran medida su capacidad de transmisión de señales y todavía están presentes en etapas avanzadas de degradación retiniana. Este hecho alentó el uso de un mecanismo de estimulación (implantes protésicos) que puede restaurar la visión hasta cierto punto. Dicho dispositivo evitaría la capa de fotorreceptores degradados e interactuaría directamente con las neuronas retinianas internas que aún funcionan. Las prótesis retinianas funcionan como un sistema integral que contiene un dispositivo de adquisición de imágenes (que está integrado por miles de microfotografías sensibles a la luz), un procesador de imágenes, un chip estimulador y un conjunto de electrodos. En este sistema, la luz que emana de los objetos visibles es convertida por las microfotografías en pequeñas corrientes de cientos de microelectrodos, que se dirigen a las neuronas restantes dentro de la red neuronal, la retina media e interna. Estos sistemas han demostrado una restauración visual parcial, presentando la primera evidencia de esta estrategia en el campo de visión. Hasta la fecha, se han construido varias modalidades de estimulación y cuatro de ellas han obtenido la aprobación del mercado para su uso en Europa y / o Estados Unidos (Argus II, IRIS, IMS y AMS). Estos dispositivos se clasifican según su ubicación anatómica.

Las prótesis epiretinianas (Argus II, IRIS y EPI-IRET3) se implantan en la superficie de la retina neurosensorial, adyacente a las capas de fibras nerviosas y células ganglionares. Su ubicación garantiza ciertas ventajas, como una fácil administración quirúrgica y una dispersión segura del calor. Funcionalmente, la estimulación se aplica directamente a las células ganglionares de la retina, evitando el sistema de procesamiento intrarretiniano residual, inhibiendo así la capacidad de imitar la organización topográfica fisiológica. Además de esto, como las prótesis epiretinianas están cerca de pasar las fibras nerviosas axonales, pueden producirse percepciones visuales ectópicas de la estimulación axonal, lo que disminuye la resolución espacial y confunde el patrón de estimulación previsto. Como nota, las prótesis epiretinianas tienen una cámara externa colocada fuera del ojo que proporciona inducción de potencia y una señal de datos que se transmite al simulador intraocular de estas prótesis, Argus II es el más utilizado y se ha implantado en más de 250 pacientes hasta la fecha, reportando resultados alentadores.

Las prótesis subretinianas (ASR, IMS / AMS, PRIMA y BSI) se colocan entre la capa fotorreceptora degenerada y el RPE, de modo que la capacidad de procesamiento de la señal intrínseca de las interneuronas retinianas se puede utilizar de manera óptima, generando una visión similar a la que se genera fisiológicamente en el ojo. Además, el dispositivo se coloca más cerca de la retina y, por lo tanto, se favorece sobre la amplificación de la señal retiniana natural, lo que requiere intensidades de estimulación más bajas. A menos que el sistema tenga fotosensibilidad intrínseca y capacidad de amplificación, al igual que los dispositivos epiretinianos, requiere una fuente de alimentación y una conexión que sirva para la entrega de datos. Quirúrgicamente, algunos estudios han indicado que posicionar estos dispositivos podría ser técnicamente complicado debido a la adhesión de RPE causada por la degeneración de la retina. Además, este enfoque quirúrgico es menos conocido

y practicado fuera de la cirugía de retina de rutina. Hasta la fecha, existen dos métodos para la estimulación subretiniana: uno que emplea una matriz de electrodos estándar y otro que utiliza una matriz de microfotodiodos (MPDA) que está presente en todos los dispositivos, con excepción de BSI (implante retiniano de Boston). Este último en sí mismo es capaz de capturar la luz, lo que permite evitar el uso de cámaras, mientras que la lente visual del conjunto percibe la escena visual.

Las prótesis supracoroidales (STS y BVA) se encuentran en el espacio supracoroideo. Este espacio es altamente vascular y, por lo tanto, existe un alto riesgo de hemorragia y fibrosis después de la implantación. En comparación con las otras dos contrapartes mencionadas anteriormente, los dispositivos supracoroidales están relativamente lejos de la retina. Esto implica que el diseño requiere un mayor poder de estimulación para provocar la percepción visual. Se necesitan números mayores para establecer conclusiones sólidas sobre la eficacia de los implantes supracoroidales y transeclerales en sus formatos actuales; sin embargo, los resultados hasta la fecha sugieren mayores limitaciones a estos enfoques en comparación con los implantes epirretinianos o subretinianos.

### **Observaciones finales**

La aprobación de Luxturna TMC como la primera terapia genética aprobada para una enfermedad ocular ha proporcionado un impulso enorme al desarrollo de la terapéutica de la retina, tanto en los centros académicos como en la industria. Como se resume en esta revisión, los desarrollos actuales van desde la incorporación de genes, la modulación de empalme, la edición del genoma, la optogenética y las terapias compuestas hasta las estrategias de reemplazo celular y las prótesis retinianas. Los pacientes con pérdida progresiva de la visión necesitan tratamiento, para mejorar su calidad de vida restaurando (parcialmente) la visión o al menos ralentizar o detener la progresión de sus enfermedades. La estrategia que tenga la mayor probabilidad de ser segura y eficaz depende de muchos factores, incluidos los defectos genéticos de la persona y la etapa de la enfermedad acompañada de la aparición de la retina. Sin embargo, el desarrollo terapéutico también requiere modelos celulares y / o animales apropiados para evaluar la eficacia de un enfoque dado, así como criterios de valoración clínicos para determinar si se puede medir una mejora de la intervención terapéutica. Solo cuando los científicos fundamentales y traslacionales, los médicos, las agencias de financiación, las organizaciones de pacientes, la industria y los organismos reguladores unen fuerzas, podemos luchar contra estas condiciones devastadoras y proporcionar esperanza y visión a miles de personas con discapacidad visual en todo el mundo.

## **PEQUEÑO GLOSARIO**

**ADNc:** estas siglas definen el ADN complementario, ¿qué es ADNc?, todos conocemos la existencia de dos Ácidos nucleicos: el ADN y el ARN. Cuando hablamos de células eucariotas (las células humanas) el ADN se encuentra en el núcleo de la célula y es la molécula que forma nuestros genes y que por tanto lleva nuestra información genética. Con la información que aporta el ADN, se produce la síntesis de las diferentes proteínas. La síntesis de proteínas tiene lugar fuera del núcleo, en el citoplasma de la célula, pero el ADN no sale del núcleo, ¿cómo entonces la información del ADN pasa al citoplasma para que



allí se formen las proteínas?, para ello a partir de la molécula de ADN que se encuentra en el núcleo, se forma una molécula de ARN mensajero que sale del núcleo y que tras diversos procesos da lugar a la síntesis de proteínas. El ADNc, es una molécula de ADN de doble cadena, de manera que una de esas cadenas es complementaria de una molécula de RNA mensajero, el ADNc no existe en las células humanas y salvo algunos virus que pueden copiar ARN mensajero en ADNc, el ADNc podríamos decir que es un producto de laboratorio, que se usa cuando se quieren expresar genes de células eucariotas (como las células humanas) en células procariotas (bacterias y virus)

**Vector viral:** A medida que vamos conociendo nuevas terapias, también van apareciendo nuevas nomenclaturas. Cuando hablamos de terapia génica, es muy común hablar de vectores, vectores virales...

Una forma sencilla de expresar que persigue la terapia génica, es decir que el objetivo sería introducir en la célula enferma un gen no mutado, con sus funciones intactas, de forma que sea capaz de realizar aquellas funciones que el gen mutado no es capaz de realizar, consiguiendo que la célula funcione correctamente.

El vehículo que se ha definido como más eficaz para llevar las copias correctas de un gen hasta el interior de la célula, son los virus. Estos virus que se usan como vehículos para transportar genes, son los vectores virales.

Cuando hablamos de usar virus, nos podemos alarmar, ya que no es precisamente buena la imagen e idea que de ellos tenemos, pero estos virus que usamos están modificados para que pierdan su capacidad de producir enfermedad, mientras mantienen ciertas características de su ciclo vital que les permite transportar genes hasta el interior de la célula y que allí se expresen.

**Virus adenoasociados:** Son aquellos virus, que se usan como vectores y que como material genético tienen ADN

**Optogenética:** Es una técnica que mezcla la óptica y la genética, que intenta transferir a un grupo de neuronas, recordemos que la retina es tejido neuronal, ADNc que codifica para proteínas que son sensibles a la luz.

**Estado episomal:** cuando un gen es introducido en la célula, puede integrarse en el cromosoma de la célula receptora o no, funcionando de manera autónoma. El estado en el que el gen queda como una unidad extracromosómica, se define como estado episomal.

**Promotores:** Para que la información que se encuentra en nuestro ADN se termine transformando en proteínas, es necesario que ésta pase de ADN a ARN, en un proceso que se denomina transcripción, los promotores son las secuencias que indican el inicio del proceso de transcripción.

**Lentivirus:** En biología molecular hay una máxima, según la cual, el sentido normal de funcionamiento es: ADN pasa a ARN y luego Síntesis de Proteínas, pero existen unos virus cuyo material genético es ARN, que por medio de un proceso de retro transcripción origina un ADN. Este tipo de virus se conocen como lentivirus.

**Fenotipo:** Es ese conjunto de características que tenemos y que son visibles, por ejemplo, no podemos ver la información genética que hay en nuestras células relativa al color del pelo, ojos...pero si vemos el color de nuestro pelo, ojos...El color de nuestro pelo sería el fenotipo y la información que hay en nuestras células referente al color del pelo se define como genotipo.

**Transgén:** Término utilizado para definir al gen que es incorporado a la célula.

**Afecciones Dominantes:** Nuestras células disponen de 23 pares de cromosomas, un progenitor aporta 23 cromosomas y el otro los otros 23, por lo tanto 23 pares. Nuestra información genética la tenemos por duplicado, por lo que la expresión de un carácter depende de la información que para él aporta cada uno de nuestros progenitores. La expresión de una mutación puede ocurrir por;

o Las dos copias del gen tienen la mutación

o Una sola copia del gen tiene la mutación

Cuando la presencia de una sola copia del gen mutado supone su expresión, se dice que esa mutación es dominante.

**Nucleasas:** Son enzimas, (proteínas con características especiales que regulan las reacciones químicas que ocurren en nuestras células), las nucleasas son un tipo de enzimas que favorecen la ruptura de las cadenas de los ácidos nucleicos.

**Transcripción:** Las proteínas de nuestras células, se sintetizan a partir de la información que para ello tenemos en nuestro ADN, pero esto no ocurre de forma directa, previamente la información del ADN a de pasar a una molécula intermedia denominada ARN, este proceso se conoce como transcripción. El proceso por el que la información del ARN se transforma en proteínas se define como traducción.

**Ruptura de doble cadena:** Una de las características importantes de ADN, es que es una doble cadena, es algo parecido a una escalera, los laterales se unen por sus peldaños.

c.68C> A: establece una nomenclatura para indicar en que punto de un determinado gen hay una mutación y que mutación es, indicando la base del ADN que esta cambiada y por cual lo está.

**Transfectar:** Hace referencia a la introducción, en una célula, de material genético externo a ella

ARN gua (ARNg): El sistema CRIPER/Cas, lo podemos definir como si fuera unas tijeras que nos permiten cortar el ADN, el ARNg es una secuencia de ARN, que nos indican por donde esas tijeras cortaran el ADN.

**Endonucleasa:** Son unas enzimas que tienen la capacidad de reconocer determinadas secuencias de ADN, cortándolo por ellas.

**Ribonucleoproteína:** Es una molécula que esta formada tanto por una proteína, como por el ácido nucleico ARN.

**Post-mitótico:** el ciclo celular se compone de varias fases, al final de las cuales cada célula se ha dividido en dos células hijas, algunas células pasan por un estado conocido como post-mitótico, en el que la célula entra en un periodo vegetativo, en el que no habría división.

**Secuencia intrónicas:** en nuestro material genético, encontramos dos tipos de secuencias:

I. Exones: que son las que llevan la información para la síntesis de proteínas.

II. Intrones: Son secuencias que no codifican para proteínas y que separan unos exones de otros, inicialmente se les consideraba ADN basura, pero cada vez se las está dando más valor, ya que no parecen que sean tan poco importantes como se creía.

**Opsinas:** Proteínas fotosensibles de las membranas de células fotorreceptoras como los conos y los bastones. Las opsinas tienen variadas propiedades de absorción de luz

**Splicing:** se puede definir como un proceso de corte y empalme que ocurre en el RNA mensajero. Como ya sabemos en el núcleo de nuestras células tenemos el ADN. La molécula de ADN es muy grande y no sale del núcleo de la célula, por medio de un proceso conocido como transcripción, la información del ADN se traslada a una molécula de RNAm que sale del núcleo, este RNAm lleva secuencias codificantes (exones) y no codificantes (intrones), el proceso por el que los intrones son eliminados del RNAm dando lugar a la unión de los exones, se conoce como splicing.

**Nucleótidos antisentido:** pequeños fragmentos de ácido nucleico (13-25 nucleótidos), complementarios para una secuencia específica de un gen, con objeto de unirse al mRNA del mismo y evitar así la producción de una proteína mutada.

**Pre RNAm:** El primer RNAm que se produce en la transcripción y que incluye intrones y exones, se conoce como pre RNA mensajero.

**U7-snRNA:** Es un complejo formado por un pequeño RNA nuclear y una proteína.

**Citomegalovirus:** Se trata de un virus de distribución mundial.

**Ribozimas:** Son RNA con actividad catalítica (enzimática), ribozima es una expresión que contrae los términos ácido ribonucleico y enzima. Actividad catalítica se refiere a la capacidad que determinadas sustancias tienen para acelerar las reacciones químicas.

**iRNA:** también RNA de interferencia cortos o pequeños (siRNA) tienen la capacidad de degradar determinados RNAm, silenciando la expresión de determinados genes, es decir, evitan la síntesis de las proteínas codificadas por los genes silenciados.

**traducción:** Como hemos comentado, en varias ocasiones, el proceso por el que la información que se encuentra en nuestro material genético termina produciendo proteínas, consta de dos fases; transcripción y traducción, la traducción es la etapa en la que la información que ha salido del núcleo de la célula se transforma en proteínas en la célula.

**Codón:** La información genética, en el RNAm, se escribe a través de un alfabeto que contiene cuatro letras y que corresponden a cuatro bases nitrogenadas Adenina, Guanina, Citosina y Uracilo (A; G; C; U). Un codón es una secuencia de tres de estas moléculas, cuya información corresponde a un aminoácido. Los aminoácidos son las unidades que construyen las proteínas, al igual que los eslabones de una cadena conforman la cadena.

**Mutación Nonsense:** Hace referencia a una mutación en una base del ADN, de manera que el codón que se forma lleva información para terminar la síntesis de la proteína, por lo que la proteína mutada que se forma puede ser de un tamaño más o menos similar a la proteína normal o muchísimo más

corto, con lo que la proteína será totalmente afuncional.

**Gentamicina:** Es un tipo de antibiótico

**Aminoglucósidos;** Constituyen un grupo de Antibióticos.

**Bastones:** Junto con los conos, constituyen los fotorreceptores de la retina y son responsable de la visión en condiciones de baja luminosidad.

**Mutación sin sentido:** mutación nonsense

**Liposomas:** Son pequeñas estructuras esféricas, con una membrana, que es una doble capa, al igual que las de nuestras células, está formada por lípidos que tienen una zona hidrófila (soluble en agua) y otra hidrófoba (no soluble en agua). Esta estructura permite englobar en su interior principios activos de diferente origen y ser trasladados al interior de las células.

**Mutación dominante negativa:** Ocurre cuando un gen produce una proteína anormal pero que en su función domina sobre la normal.

**Opsina:** Proteínas fotosensibles que se encuentran en las membranas de conos y bastones, con la propiedad de absorber la luz

**Ortólogo:** Genes ortólogos son aquellos que son copias divergentes de un mismo gen.

**Transducción:** Es el proceso por el cual, en una célula, se introduce material genético exógeno haciendo uso de un virus como vector.

**RPE:** Acrónimo, en inglés, del Epitelio Pigmentario de la Retina.

**Autocomplementario:** Una de las características del ADN, en nuestras células, es que es una doble cadena, unida entre sí de la misma forma que los peldaños de una escalera unen sus dos brazos. En la composición del ADN nos encontramos con cuatro bases nitrogenadas: Adenina, guanina, citosina y timina, representadas por las letras A,G,C,T. La unión entre las dos cadenas de ADN, siempre se establece por enlaces entre A-T y C-G, es decir, si en una cadena hay una A, frente a ella en la otra cadena hay una T, lo mismo ocurre con C y G. Esta forma de mantener unidas las dos cadenas de ADN se define como complementariedad de bases.

**ADNc:** Acrónimo de ADN complementario, ya descrito en apartados anteriores.  
**HDR:** Sistemas de reparación por homología. Ya descrito en apartados anteriores

**trans-splicing:** Splicing, como hemos descrito en apartados anteriores es un fenómeno de corte y empuje, por el que en el RNAm solo se encuentran los exones, que es la fracción que codifica para proteínas, trans-splicing es el fenómeno por el que exones de pre-RNAm diferentes, se unen en la misma molécula de RNAm.

**HHP:** Acrónimo del inglés Primates no Humanos.

**Endosomas:** son pequeñas bolsas rodeadas de membrana y que pueden contener y transportar diversas sustancias.

**RPE:** Epitelio pigmentario de la Retina

**Célula Somática:** Son cualquier célula del cuerpo, excepto espermatozoides y óvulos, que se conocen como células germinales.

**Células Madre Pluripotentes Inducidas:** Hay diferentes tipos de células madre, en este caso podríamos hablar de células madres adultas, estas provienen de cualquier órgano de un feto o un adulto, en lo descrito en este artículo, el origen es un adulto. Principalmente el individuo afectado. La pluripotencia hace referencia a la capacidad que estas células tienen para generar cualquiera de los cientos de tipos celulares diferentes que conforman nuestro cuerpo. Cuando hablamos de células madres pluripotentes inducidas, hace referencia a células adultas ya diferenciadas, que se reprograman genéticamente para volver al estado anterior al de su diferenciación, con lo que pueden volver a diferenciarse en otro tipo de célula.

**Célula Madre Embrionaria:** Estas células solo existen en las fases mas tempranas del desarrollo embrionario, y su vida es mu corta, siendo capaces de generara todos los tipos de células del organismo, para que se mantengan de manera indefinida hay que extraerlas del embrión y cultivarlas en un laboratorio.