

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"DIAGNOSTICO MOLECULAR EN DOS FAMILIAS AFECTADAS
CON RETINOSIS PIGMENTARIA AUTOSOMICA RECESIVA"

Tesis sometida a consideración de la Comisión del Programa
de Estudios de Posgrado en Biología para optar al grado de
Magister Scientiae

ALEJANDRO LEAL ESQUIVEL

Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio", Costa Rica

1996

DEDICATORIA

A las personas afectadas con Retinosis Pigmentaria, que han aprendido a ver todo con alegría y optimismo, y con más profundidad que muchos de nosotros.

A la memoria de Eduardo Artavia Caballero, amigo de siempre.

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mi padres Fernando Leal y Ligia Esquivel, y a mi hermano Dionisio Leal.

A Larissa y a mis amigos.

A los profesores Ramiro Barrantes, Gustavo Gutiérrez, Pedro León, Jorge Azofeifa, Alvaro Morales y Julieta Carranza.

A Sandra Silva, Patricia González, Gerardo Jiménez, Sergio Bermudez y al oftalmólogo David Flikier.

Al Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), al Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) y a la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica.

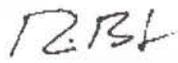
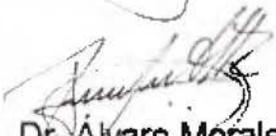
A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, que aportó la mayor parte de los fondos para la investigación en el proyecto 742-93-324.

A don Alvaro Mendieta y a la Fundación Costarricense de Retinosis Pigmentaria, que aportó parte importante de los fondos requeridos para el estudio de la RP.

A don Carlos Gamboa y familia, que aportó fondos para nuestra capacitación en el exterior.

HOJA DE APROBACION

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Magister Scientiae.

 Dr. Ramiro Barrantes Mesén	Director de Tesis
 Dr. Pedro León Azofeifa	Miembro Comité de Tesis
 Dr. Jorge Azofeifa Navas	Miembro Comité de Tesis
 Dr. Alvaro Morales Ramírez	Director Programa de Posgrado en Biología
 Dra. Julieta Carranza Velázquez	Representante Decana del Sistemá de Estudios de Posgrado
 Alejandro Leal Esquivel	Candidato

INDICE

	Página
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Hoja de aprobación.....	iv
Resumen.....	vii
Lista de Cuadros.....	x
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Abreviaturas	xiii
INTRODUCCION.....	1
1. Clasificación de la Retinosis Pigmentaria.....	3
2. Transducción de la señal visual.....	5
A) Estructura del sistema visual.....	5
B) La retina: estructura y función.....	6
C) Bioquímica de la transducción de la señal.....	11
3. Genética de los pigmentos visuales.....	19
4. Genética y fisiopatología de la Retinosis Pigmentaria.....	23
5. Tratamientos para la Retinosis Pigmentaria.....	35
6. Problema y situación de Costa Rica.....	37
7. Objetivos.....	39
A) Generales.....	39
B) Específicos.....	39
MATERIAL Y METODOS.....	41
1. Localización, clasificación y escogencia de las familias con RP.....	41
2. Diagnóstico clínico.....	47

	Página
3. Análisis molecular de la RP en familias costarricenses.....	50
A) Técnicas moleculares.....	50
B) Análisis de los resultados.....	55
RESULTADOS.....	57
1. Familias estudiadas.....	57
2. Diagnóstico clínico de pacientes y controles.....	59
A) Familia C1.....	59
B) Familia P1.....	66
3. Lectura de los marcadores polimórficos.....	72
A) Marcadores empleados.....	72
B) Análisis de ligamiento.....	74
DISCUSION.....	87
1. Calidad de las familias estudiadas.....	88
2. Frecuencias alélicas y de las mutaciones en RP.....	90
3. Regiones genómicas analizadas.....	93
4. Alternativas para continuar el análisis.....	96
5. Diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias en el futuro.....	99
6. Diagnóstico clínico.....	101
7. Necesidad de conocer la epidemiología de la RP en Costa Rica.....	102
8. Mapeo genético en Costa Rica.....	106
CONCLUSIONES.....	109
LITERATURA CITADA.....	112
Apéndice I: Lista de familias con uno o más miembros afectados con Retinosis Pigmentaria y su lugar de residencia.....	119
Apéndice II: Fórmula de consentimiento de participación.....	121
Apéndice III: Datos que conforman el expediente de los pacientes.....	123

RESUMEN

Se denomina Retinosis Pigmentaria (RP) a un grupo de enfermedades que se caracterizan por la degeneración de la retina, que provoca ceguera nocturna, reducción del campo visual, disminución de vascularidad y una pigmentación particular. Existen diversos tipos de herencia, heterogeneidad compuesta, y síndromes que presentan RP. La mayor cantidad de afectados presentan un patrón autosómico recesivo (RPAR), pero se desconocen la mayoría de los genes que lo causan. De 70 familias costarricenses con miembros afectados por RP, se escogieron dos con RPAR. La primera es la familia C1, de San José con 10 afectados vivos y 14 portadores obligatorios. Los afectados presentan una degeneración de aparición temprana (ERG plano) y severa, RPAR tipo 1 (bastón-cono).

Se utilizaron marcadores polimórficos (STRPs) para descartar algunas regiones relacionadas con la RP en la literatura, y se utilizó el programa LINKAGE para el análisis de ligamiento. El poder de ligamiento de la familia es de $Z(0.0) = 4.49$, con un marcador inventado de cuatro alelos con frecuencias igualadas. Los puntajes Lod permitieron descartar como causantes de la RP en esta familia ($Z(0.0) = -\infty$), a los genes que codifican por la fosfodiesterasa-B (4p), las proteínas que causan la RPAR I

(1q), la RPAR III (3q) y la RPAR VI (6p),), RP como Stargardt (6q), el causante de la RPAD en el cromosoma 8 (RP1) y el gen Myc (8q). Además, se sugiere la exclusión del gen de la rodopsina (3q), los genes que provocan el Síndrome de Usher 1C (11p), Usher 2 (1q), y el causante de la distrofia cono-bastón (6q). Finalmente, en esta familia se encontraron algunos puntajes Lod positivos, para los marcadores PDEB ($Z(0.3) = 0.0329$), D4s412 (cerca de PDEB, $Z(0.2) = 0.4341$), RDS ($Z(0.2) = 0.2239$) y Myc ($Z(0.2) = 0.3050$), pero no a $\theta = 0.0$.

La segunda familia (P1) es del cantón de Acosta, tiene 13 afectados vivos y 23 portadores obligatorios, y presentan numerosas uniones consanguíneas. Se trata de una RPAR de aparición temprana (ceguera nocturna, ERG plano) pero con una degeneración más lenta. Al igual que en la familia C1, se trata de una RPAR tipo 1, pero por las diferencias fenotípicas entre ambas familias es muy probable que se trate de una mutación diferente en cada familia.

El análisis de ligamiento indicó que para la familia P1, se pueden descartar ($Z(0.0) = -\infty$) los genes de la fosfodiesterasa-B, periferina, RPAR VI, los genes que provocan la RPAD de los cromosomas 7 (RP8) y 8 (RP1), y Myc. También se sugiere la exclusión de los genes que provocan la RPAR I, RPAR II (rodopsina), RPAR III y los genes Usher 1C y 2. Se obtuvieron

valores positivos en los marcadores RHO ($Z(0.1) = 0.3991$), RDS ($Z(0.2) = 0.3390$) y P1 (cerca de Usher 1A en 14q, $Z(0.09) = 0.7647$). Esta familia tiene un poder de ligamiento de $Z(0.0) = 5.25$ con un marcador inventado con cuatro alelos, uno de ellos ligado.

Para continuar con la búsqueda del gen o genes responsables de la RPAR en estas familias, y antes de continuar con el mapeo del genoma, deben descartarse por completo los loci cercanos a los marcadores que presentaron puntaje Lod positivo en alguna unidad de recombinación. Se deben descartar los restantes loci que se han relacionado con RPAR y RPAD, así como a otros síndromes con RP aún no descartados. Luego, se sugiere investigar otros genes que codifican por proteínas participantes en la transducción de la señal visual, o que juegan un papel estructural en células de la retina, así como en regiones aledañas a estos genes. Al analizar los datos, debe tenerse en cuenta la posibilidad de heterogeneidad compuesta, así como la posibilidad de que existan dos tipos de gen que originan la RP en una familia. También deberá contarse con datos de prevalencia de la RPAR en Costa Rica, por lo que es necesario iniciar estudios epidemiológicos. Deberán conocerse, además, las frecuencias de los alelos de los marcadores en la población. Con estas investigaciones se estará en capacidad de ofrecer diagnóstico molecular de RP y se avanzará en su conocimiento y tratamiento.

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
I. Tasas crudas de prevalencia de RP en distintas partes del mundo	3
II. Algunos tipos de RP que pueden ser identificados clínicamente, según el patrón de herencia	4
III. Genes humanos mapeados o clonados que causan degeneración de la retina.....	27
IV. Coeficiente de endocruzamiento de los hijos de uniones consanguíneas de las familias C1 y P1	58
V. Características fenotípicas de la RP en los individuos estudiados de las familias C1 y P1.....	66
VI. Imprimadores probados en la búsqueda de ligamiento con RPAR, región cromosómica y calidad de la lectura con P-32.....	73
VII. Puntajes Lod (Z) obtenidos entre marcadores polimórficos y el gen de la RPAR en la familia C1, según la distancia entre los loci.....	75
VIII. Puntajes Lod (Z) obtenidos entre marcadores polimórficos y el gen de la RPAR en la familia P1, según la distancia entre los loci.....	76
IX. Puntajes Lod de un marcador ideal de cuatro alelos que segrega con la RP, indicando el poder de las familias C1 y P1 para que en ellas se encuentre ligamiento con el gen que provoca su tipo de RPAR.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Componentes neurales de la retina.....	7
2. El ojo humano.....	8
3. Bastones y conos.....	10
4. Espectros de fotorrecepción de los cuatro pigmentos visuales humanos.....	12
5. Modelo de la rodopsina normal.....	14
6. Reacción del bastón a la luz.....	16
7. Ciclo de la rodopsina.....	17
8. Amplificación de la señal visual originada por la incidencia de la luz.....	18
9. Cambios en las proteínas de los bastones, que originan la traducción de la señal visual.....	20
10. Diagrama de la membrana de los discos del segmento externo de un bastón.....	21
11. Posibles mecanismos involucrados en la degeneración de la retina.....	24
12. Mecanismo hipotético que explica la disfunción de los bastones en la CSNB debido a la mutación en la posición 292 de la rodopsina.....	29

Figura	Página
13. Mecansimo hipotético que explica la permanente activación de la fosfodiesterasa, originando CSNB.....	31
14. Genealogía de la familia C1, San José.....	44
15. Genealogía de la familia P1, Acosta.....	45
16. Síntesis de la familia C1, de San José.....	46
17. Síntesis de la familia P1, de Acosta.....	48
18. Electrorretinograma escotópico normal y afectado.....	60
19. Angiografía fluorescente de persona normal y afectada.....	61
20. Campo visual de persona normal y afectada.....	63
21. Electrorretinogramas escotópicos de la familia P1.....	68
22. Angiografía y campo visual del individuo P1-3, afectado por RP.....	70
23. Marcador F13B en la familia C1.....	77
24. Marcador MYC en la familia C1.....	78
25. Marcador PDEB en la familia C1.....	79
26. Marcador F13B en la familia P1.....	80
27. Marcador D3s621 en la familia P1.....	81
28. Marcador P1 en parte de la familia P1.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

BBS	Síndrome de Bardet Biedl
BD	Enfermedad de Best
CHM	Coroideremia
CRD	Distrofia cono-bastón
CSNB	Ceguera nocturna congénita estacionaria
ERG	Electrorretinograma
MM	Mezcla maestra
MYC	Proto-oncogen Myc
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDE	Fosfodiesterasa
PDEB	Subunidad B de la fosfodiesterasa
RDS	Periferina
ROM1	Proteína de membrana del segmento externo de bastón
RP	Retinosis Pigmentaria
RPAD	Retinosis Pigmentaria autosómica dominante
RPAR	Retinosis Pigmentaria autosómica recesiva
RPLS	Retinosis Pigmentaria como Stargardt
RPLX	Retinosis Pigmentaria ligada al cromosoma X

SD	Enfermedad de Stargardt
SSCP	Polimorfismos de conformación de ADN en cadena simple
STRP	Polimorfismos en las repeticiones pequeñas en tandem
UI	Unidades Internacionales
USH	Síndrome de Usher
VNDR	Repeticiones de dinucleótidos en número variable

INTRODUCCION

Se conoce como Retinosis Pigmentaria (RP) a un grupo de enfermedades que se caracteriza por la degeneración progresiva de la retina, ceguera nocturna, pérdida del campo visual y una pigmentación oftalmológica particular (Bunker *et al.* 1984). Los afectados presentan una atrofia difusa de la retina, atenuación de los vasos de la retina, y la liberación del pigmento o migración de las células del epitelio pigmentario, agregándose a los vasos sanguíneos, particularmente en las bifurcaciones. Los pacientes de RP reportan típicamente "ceguera nocturna y pérdida de la visión en el campo visual periférico y periférico-medio debido a la pérdida progresiva de la función de los bastones y los conos. La mayoría de los pacientes tienen reducciones en la visión central entre los 50 y 80 años, y el examen del fondo ocular usualmente muestran arteriolas retinianas atenuadas y pigmento intrarretiniano alrededor de la periferia media" (Berson *et al.* 1993).

La prevalencia de la RP varía entre 1:3700 y 1:7000, como se muestra en el Cuadro I. En los Estados Unidos una de cada 80 personas es portadora de un gen defectuoso que origina RP (Boughman & Caldwell, 1982), y los casos se distribuyen en los tres patrones de herencia mendeliana: el 84% de los casos de RP presentan herencia autosómica recesiva (RPAR), el 10%

autosómica dominante (RPAD), y ligada al X (RPLX) un 6% (Boughman *et al.* 1980). Aunque Heckenlively (1988) separa los casos aislados de los presentados con un patrón RPAR comprobado, estableciendo que en ese país el 31% de los casos se trata de RPAR, el 17% de RPAD, el 10% de RPLX y un 46% corresponde a casos aislados. En cuanto a los países latinoamericanos, Cuba presenta una prevalencia de afectados de 1:4082, que se distribuyen así: 34.7% RPAR, 13.9% RPAD, 1.9% RPLX, 40.3% casos aislados, 9.2% varios casos sin un patrón de herencia definido (Peláez *et al.* 1994). No se conocen datos de otros países latinoamericanos.

1. Clasificación de la Retinosis Pigmentaria

Con base en el patrón de herencia y en exámenes clínicos que permiten observar la respuesta de los fotorreceptores a la luz, la apariencia de la retina y la amplitud del campo visual, se pueden diagnosticar distintos tipos de degeneración de la retina, como se muestra en el Cuadro II.

El diagnóstico de la RP se hace de la siguiente manera:

- 1) Se mide el campo visual, que en el caso de la RP se pierde con un patrón típico, y desaparece la fotorrecepción en las zonas donde la presencia de bastones es mayor que la de conos.

Cuadro I. Tasas crudas de prevalencia de RP en distintas partes del mundo.

País	Año	Autor	Prev.	Método de averiguación
Suiza	1965	Amman <i>et al.</i>	1:7000	Genética clínica
Israel	1970	Faber	1:4500	—
E.U.A.	1980	Boughman <i>et al.</i>	1:3700	Cuestionario, miembros RPF
E.U.A.	1984	Bunker <i>et al.</i>	1:4756	Todas las fuentes en Maine
Reino Unido	1984	Bundey & Crews	1:4869	Todas las fuentes en Birmingham
China	1987	Hu	1:3784	Búsqueda masiva
Slovenia	1992	Peterlin <i>et al.</i>	1:6023	Todas las fuentes en un área
Dinamarca	1992	Haim <i>et al.</i>	1:3943	Todas las fuentes en un área
Cuba	1994	Peláez <i>et al.</i>	1:4082	Atención clínica u hospitalaria

2) Se observa el fondo del ojo, en el que se puede detectar una retinopatía pigmentaria.

3) Se analiza el comportamiento eléctrico de los fotorreceptores, cuya **respuesta es inferior** en el caso de la RP.

4) **Conforme** degenera la retina, por supuesto disminuye la agudeza visual. En **numerosos casos** se asocia la RP con catarata, nistagmo y estrabismo.

Además, se utiliza el criterio del patrón de herencia para diagnosticar el tipo de RP, aunque la clasificación clínica será completa sólo cuando se incluya el diagnóstico molecular.

CUADRO II. Algunos tipos de Retinosis Pigmentaria (RP) que pueden ser identificados clínicamente, según el patrón de herencia.

Patrón de herencia	Tipo de Retinosis Pigmentaria
Autosómica Dominante	RP-1
	Grupo de aparición infantil
	Degeneración bastón-cono
	Degeneración cono-bastón
	Tipo 1: bastón-cono Tipo 2: cono-bastón
Autosómica Recesiva	Con pigmento para-arteriolar preservado
	Amaurosis congénita de Leber
	Amaurosis congénita con colobomata macular
	RP juvenil
	Retinosis punctata albescens Goldmann-Favre
Recesiva ligada al X	RP-2 Coroideremia Usher (distintos tipos)
Síndromes con RP	Bardet-Biedl Stargardt

Basado en Farber *et al.* 1991.

2. Transducción de la Señal Visual

A) Estructura del sistema visual

El sistema visual detecta e interpreta estímulos luminosos. Los vertebrados perciben ondas electromagnéticas que oscilan entre los 400 y los 750 nm de longitud ("luz visible"). El ojo puede distinguir dos propiedades de la luz: su luminiscencia o brillo, y su longitud de onda o color. La luz ingresa al ojo y llega a los fotorreceptores de la retina, que es un epitelio sensorial especializado, donde hay dos tipos de fotorreceptor: los conos y los bastones.

Los bastones funcionan mejor bajo condiciones de baja luminosidad (visión escotópica); sin embargo, son deficientes en la definición de imágenes visuales y no participan en la visión con color. Tienen más fotorpigmento que los conos, así como un mejor sistema de amplificación de la señal, pero muchos bastones convergen en una sola célula bipolar, por lo que no dan una visión de alta resolución. Por su parte, los conos trabajan mejor con bastante luminosidad y permiten la agudeza visual y la visión con colores. Dan visión de alta resolución porque cada cono converge con una célula bipolar (Willis, 1992). La información percibida por la retina es procesada gracias a interneuronas, que envían señales al cerebro a través de células ganglionares. Existen aproximadamente 6 millones de conos y 120 millones de bastones en

cada ojo humano, pero solamente 1.2 millones de fibras nerviosas en cada nervio óptico, por lo que la convergencia global de los receptores sobre las células ganglionares a través de las células bipolares es en promedio de 105:1 (Fig.1) (Ganong, 1988).

Los axones constituyen los nervios ópticos; algunos cruzan al lado opuesto del cerebro, al quiasma óptico, y otros continúan en el mismo lado. Luego de los quiasmas ópticos, los axones de las células ganglionares forman sinápsis en el núcleo cerebral. La principal vía de la señal visual en humanos es a través del núcleo geniculado lateral dorsal del tálamo. Este núcleo se comunica con las áreas receptoras de la corteza cerebral (Willis, 1992).

B) La retina: estructura y función

La retina es una estructura laminada, tiene diez capas y empieza por el epitelio pigmentado, situado en la parte más interna. Las células que lo conforman se extienden hasta la capa de fotorreceptores (que es la siguiente lámina de la retina) y rodean los segmentos externos de los fotorreceptores (Fig.2). Las células del epitelio cumplen importantes funciones como la fagocitosis en los extremos de los bastones, y reducir el retineno trans-completo tomado de los bastones y transformarlo en 11-cis-retineno (la forma que se une a la opsina en los bastones), para que sea de nuevo transportado a los fotorreceptores. Cada fotorreceptor incluye un cuerpo

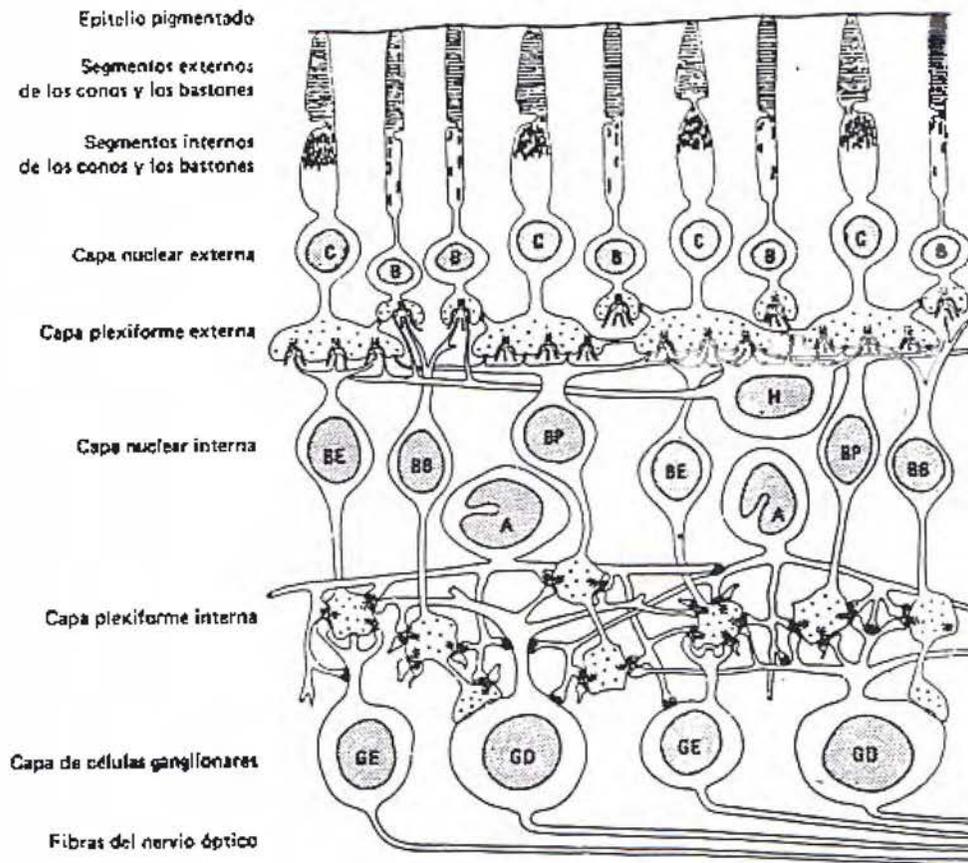


Fig. 1. Componentes neurales de la retina. C, cono; B, bastón; BE, BB y BP, células bipolares en bastón y planas; GD y GE, células ganglionares difusas y enanas; H, células horizontales; A, células amacrinas. Tomado de Ganong, 1988.

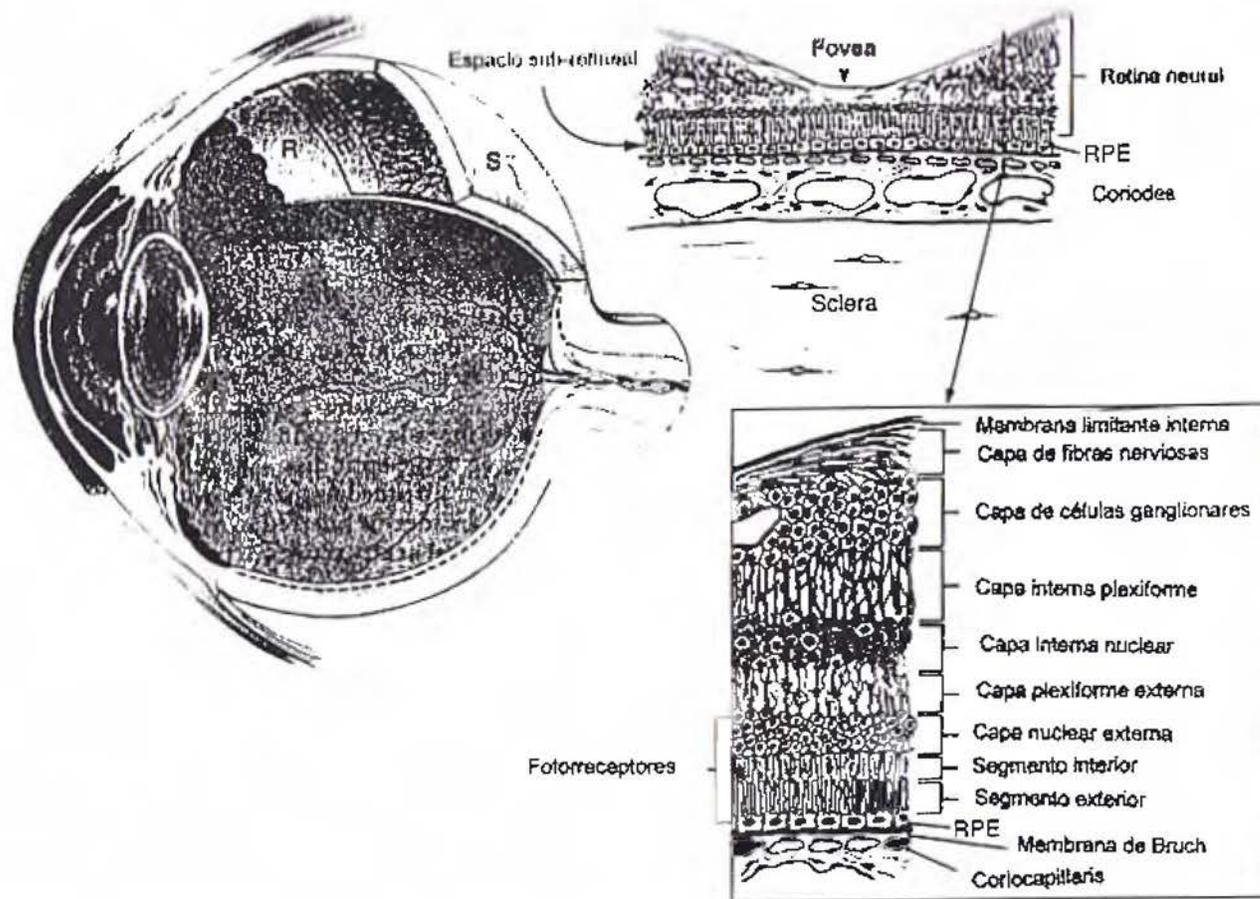


Fig. 2. El ojo humano. Corte del ojo (izquierda) que muestra la retina neural (R), el epitelio pigmentario de la retina (RPE), la corioides (C) y la esclerótica (S). Corte a nivel de la fovea (arriba a la derecha), que muestra el espacio sub-retineal entre la retina neural y el RPE, y la corioides. Corte de la retina (abajo a la derecha) que muestra la membrana limitante interna, la capa de fibras nerviosas, la de células ganglionares, la de fotorreceptores, el RPE y otras capas. Tomado de D'Amico, 1994.

celular, un segmento interno y uno externo y una terminal sináptica. El segmento externo de los bastones es más largo que el de los conos, contiene discos que flotan libremente dentro del bastón, que son reemplazados y que son ricos en moléculas de la proteína rodopsina (108 por segmento externo de bastones). El segmento externo de los conos también contiene discos de membrana con fotopigmentos, pero consisten en invaginaciones de la superficie de la membrana y no se mueven ni reemplazan (Fig.3). Además, tienen menos pigmento los conos que los bastones: sólo es necesario un fotón para producir una respuesta de un bastón, mientras que se necesitan varios cientos de fotones para provocar una respuesta de los conos.

Los segmentos internos de los fotorreceptores están conectados a los segmentos externos por un cilio modificado que contiene nueve pares de microtúbulos pero carece de los dos pares centrales que se encuentran en la mayoría de los cilios. Los segmentos internos contienen varias organelas, incluye numerosas mitocondrias. El fotopigmento es sintetizado en el segmento interno e incorporado a las membranas del segmento externo. En los bastones, el pigmento es insertado en nuevos discos (se forman tres nuevos discos por hora) que se van corriendo hacia el extremo del segmento externo hasta ser fagocitados por una célula del epitelio pigmentado. En los

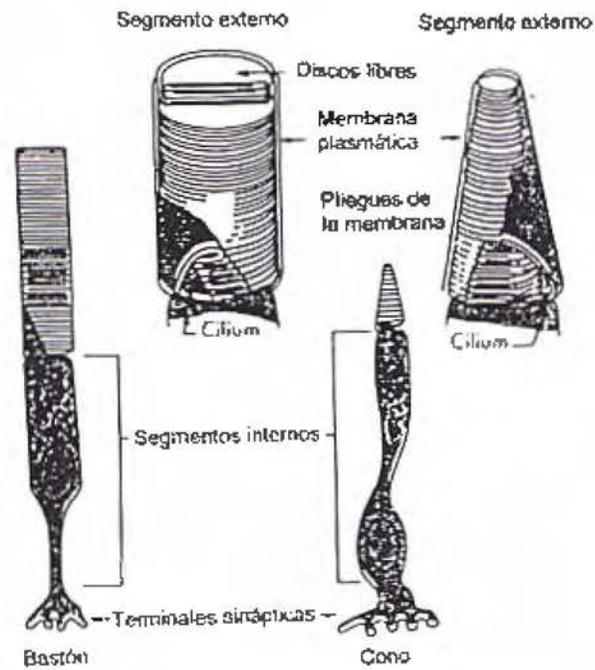


Fig. 3. Bastones y conos. Abajo se muestran las características generales del bastón y el cono. Arriba se muestran los segmentos externos con más detalle. Tomado de Willis, 1992.

conos, el fotopigmento es insertado azarosamente en los pliegues de la membrana.

C) Bioquímica de la transmisión de la señal

El fotopigmento de los bastones es la rodopsina, mientras que tres variantes de pigmento visual son encontradas en los tres tipos de conos, se trata de apoproteínas integrales de membrana unidas al cromóforo 11-cis-retineno. La rodopsina es miembro de la familia de proteínas G, que son receptores que median su efecto a través de la unión con GTP. Ella absorbe preferencialmente la luz de 500 nm, mientras que los pigmentos de los conos absorben preferencialmente a los 420 nm (azul), 531 nm (verde) y 558 nm (rojo). Sin embargo, el espectro de absorción de estos pigmentos se traslapa considerablemente (Fig. 4). La rodopsina está parcialmente constituida por un aldehído del retinol (vitamina A), llamado retineno. Como otras vitaminas, el retinol no puede ser sintetizado por el organismo humano, por lo que debe ser recibido a través de alimentos. Individuos con deficiencia severa de vitamina A sufren de ceguera nocturna, que consiste en una visión insuficiente en condiciones de baja iluminación. Un isómero del retineno conocido como 11-cis-retineno, se combina con una apoproteína llamada escotopsina (opsina) para dar origen a la rodopsina (RHO). Cuando la

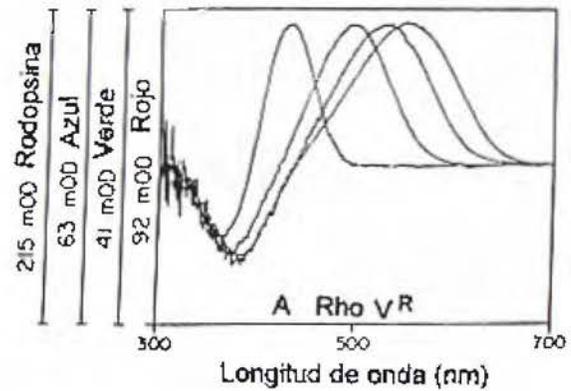


Fig. 4. Espectros de fotorrecepción de los cuatro pigmentos visuales humanos, siguiéndose reconstitución *in vitro* de las apoproteínas recombinantes con el 11-Cis-retinal. A, pigmento azul; Rho, rodopsina; V, pigmento verde; R, pigmento rojo; mOD, unidades de densidad óptica x 0.001. Tomado de Nathans, 1994.

rodopsina absorbe luz, la recepción de energía causa una serie de cambios químicos que provocan la isomerización de 11-cis-retineno a retineno trans-completo de opsina, que causa que el pigmento visual se decolore (pierda su color púrpura). La rodopsina es una proteína de 348 aa, y se entrelaza con la membrana del segmento externo del bastón atravesándola 7 veces, por lo que quedan 4 lazos en contacto con el citoplasma y 3 en el espacio intradiscal (Fig.5) (Berson, 1993). Cuando la rodopsina entra en contacto con la luz se une a la arrestina (o antígeno-S), que se encuentra de modo abundante en los bastones. Ella se encarga de inactivar a la rodopsina luego de ser activada por la luz, así como a la rodopsina quinasa que fosforila a la rodopsina (Robinson *et al.* 1994). Así, la arrestina bloquea la interacción de la rodopsina con la transducina (Murakami *et al.* 1993).

La reducción en la cantidad de rodopsina está asociada a un proceso denominado adaptación a la luz, que conduce a la reducción de la sensibilidad visual. Cuando se forma el retineno trans-completo, éste es transportado a las células del epitelio pigmentado, donde es reducido, isomerizado y esterificado, y da origen al 11-cis-retineno nuevamente, listo para ser transportado a los fotorreceptores para que se ligue a la opsina, regenerándose así la rodopsina.

En la oscuridad los bastones mantienen abiertos sus canales de sodio, por lo que iones de sodio (Na^+) fluyen libremente en lo que se llama corriente

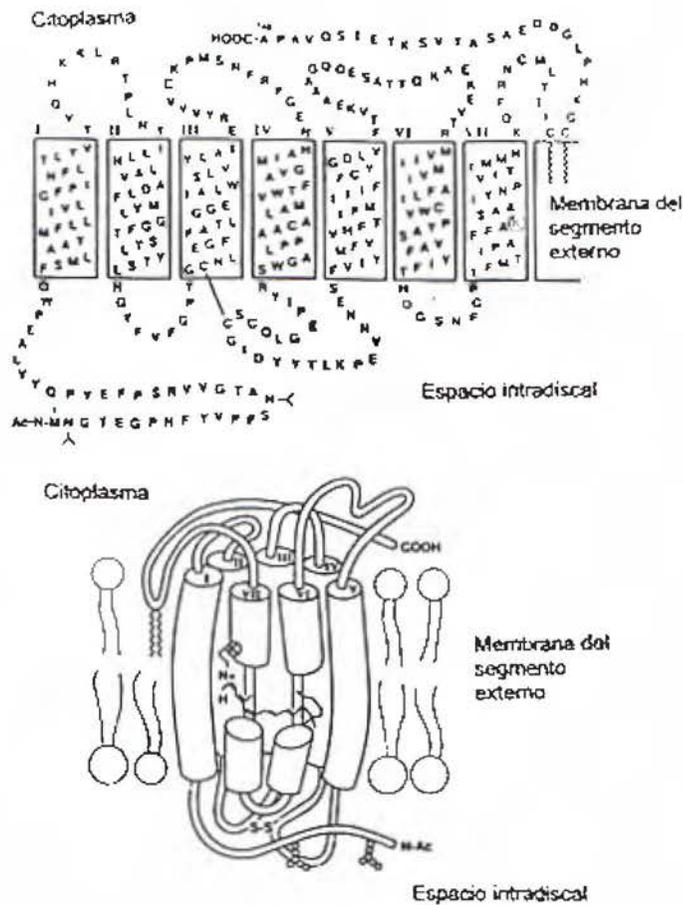


Fig. 5. Modelo de la rodopsina normal. Arriba: Rho en la membrana del disco del segmento externo de un bastón. Cada letra significa un aminoácido, usando el código convencional de una letra. Abajo: Representación de la Rho en tres dimensiones, unida al cromóforo (11-Cis-retinal), que está unido covalentemente al residuo lisina (K) en el séptimo segmento transmembranal. Tomado de Berson, 1993.

oscura. Esto causa una despolarización de los bastones, y como consecuencia de ésta se libera neurotransmisor en la sinapsis de los bastones con las células bipolares y horizontales. La concentración intracelular de Na^+ se estabiliza por medio de la bomba sodio-potasio.

En la oscuridad el retineno de la rodopsina está en la configuración 11-cis, la luz lo convierte en trans-completo, lo que activa la conversión de rodopsina en una serie de intermediarios, uno de los cuales es la metarrodopsina II, y el paso final es la separación del retineno de la opsina (Fig. 6) (Ganong, 1988).

La absorción de luz activa a la rodopsina, que activa a la transducina (proteína G), que a su vez activa a la fosfodiesterasa-GMPc, que hidroliza el GMPc a GMP-5' y hace disminuir la concentración de GMPc en el citoplasma del bastón. El GMPc normalmente mantiene los canales de sodio abiertos, por lo que al estar disminuida su concentración, se cierran los canales y se hiperpolariza la membrana (Fig.7).

Los canales catiónicos dependientes de GMPc están compuestos por 690 aa. Una sola rodopsina activa cientos de transducinas, y cada una activa cientos de fosfodiesterasas que a su vez hidrolizan cientos de moléculas de GMPc por segundo (Fig.8).

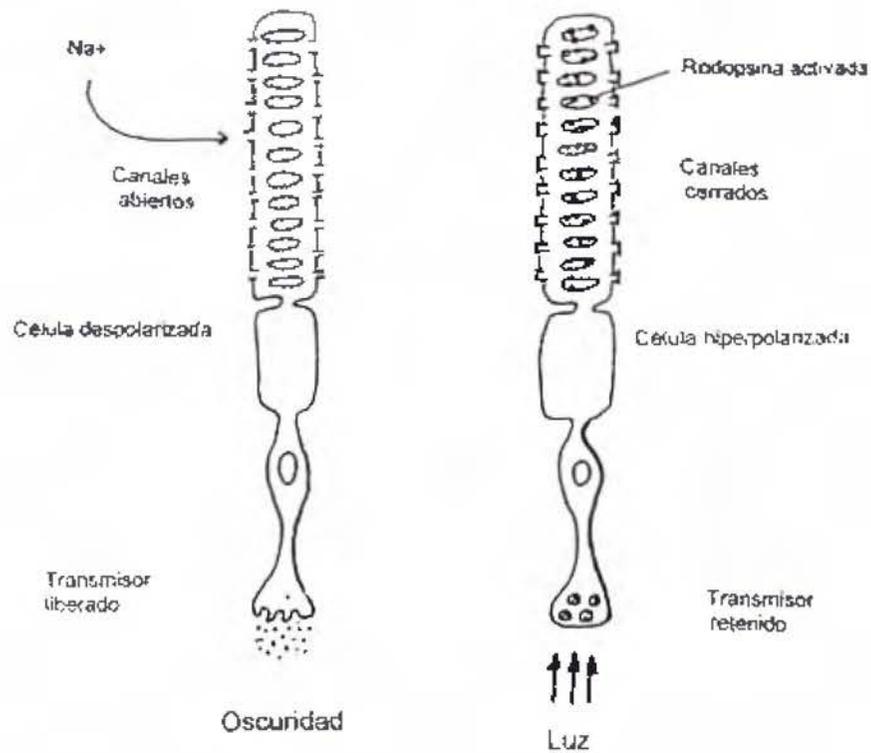


Fig. 6. Reacción del bastón a la luz. Izquierda: en la oscuridad los canales iónicos se mantienen abiertos, por lo que la célula se encuentra despolarizada y se libera neurotransmisor. Derecha; con la llegada de la luz, los canales iónicos se cierran, la célula se hiperpolariza y el transmisor es retenido.

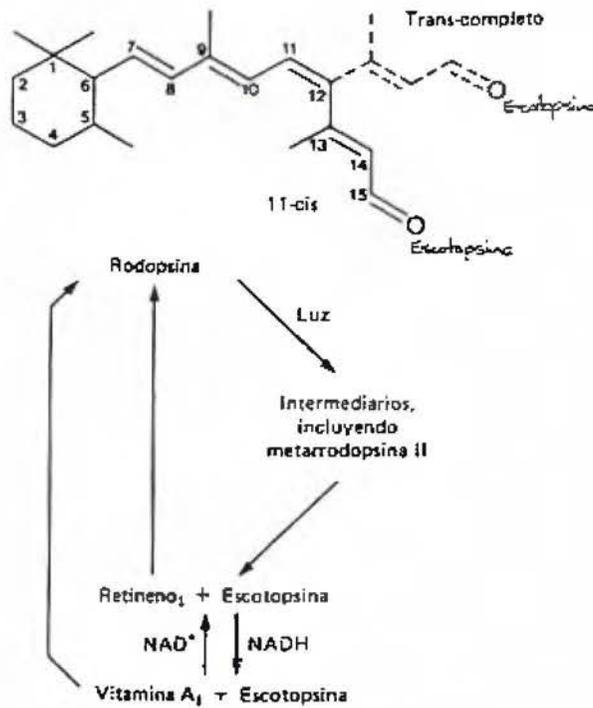


Fig. 7. Ciclo de la rodopsina. Arriba: Estructura del retineno, que muestra la configuración 11-cis (línea continua) y la configuración trans-completa, producida por la luz (línea a trazos). Abajo: Efectos de la iluminación sobre la rodopsina. Tomado de Ganong, 1988.

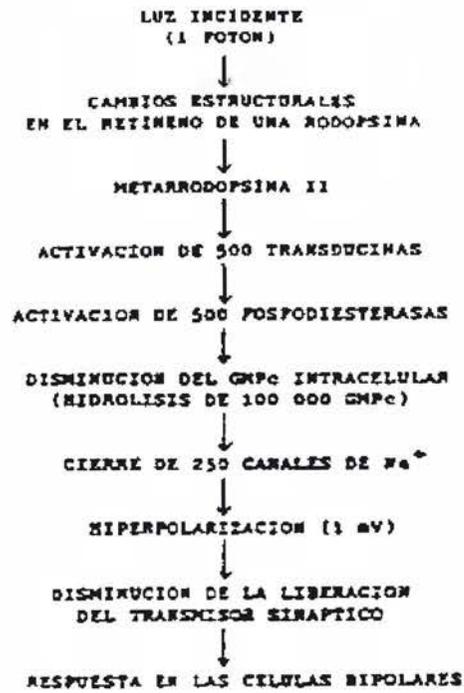


Fig. 8. Amplificación de la señal visual originada por la incidencia de luz.

La transducina es miembro de la familia heterotrimétrica de **proteínas G**, y se compone de las subunidades alfa, beta y gamma. En presencia de la metarrodopsina II (que sigue a los cambios estructurales en el retineno de la rodopsina), la subunidad alfa cambia el GDP por el GTP (Fukada *et al.* 1990), para liberarse de las unidades beta y gamma, y activar la fosfodiesterasa-GMPc, y remueve las dos subunidades gamma de esta última (Magovcevic *et al.* 1995). La fosfodiesterasa tiene, además, subunidades alfa y beta. (Fig. 9).

La periferina/RDS y la ROM-1 son proteínas de membrana de los fotorreceptores, e integran un complejo (unido no-covalentemente) que posiblemente funciona en la formación y mantenimiento de las membranas de los discos de los segmentos externos (Fig.10) (Molday, 1994). La periferina tiene una subunidad y está formada por 346 aa, mientras que la ROM-1 está compuesta por 351 aa y tiene un 35% de similitud con la periferina (Bascom *et al.* 1992).

3. Genética de los Pigmentos Visuales

Hay diferencias entre lo que percibe un ser humano de otro, a través del sentido de la vista. Variaciones en la secuencia de los genes que codifican por los fotopigmentos son una de las fuentes de esta diversidad. La variación

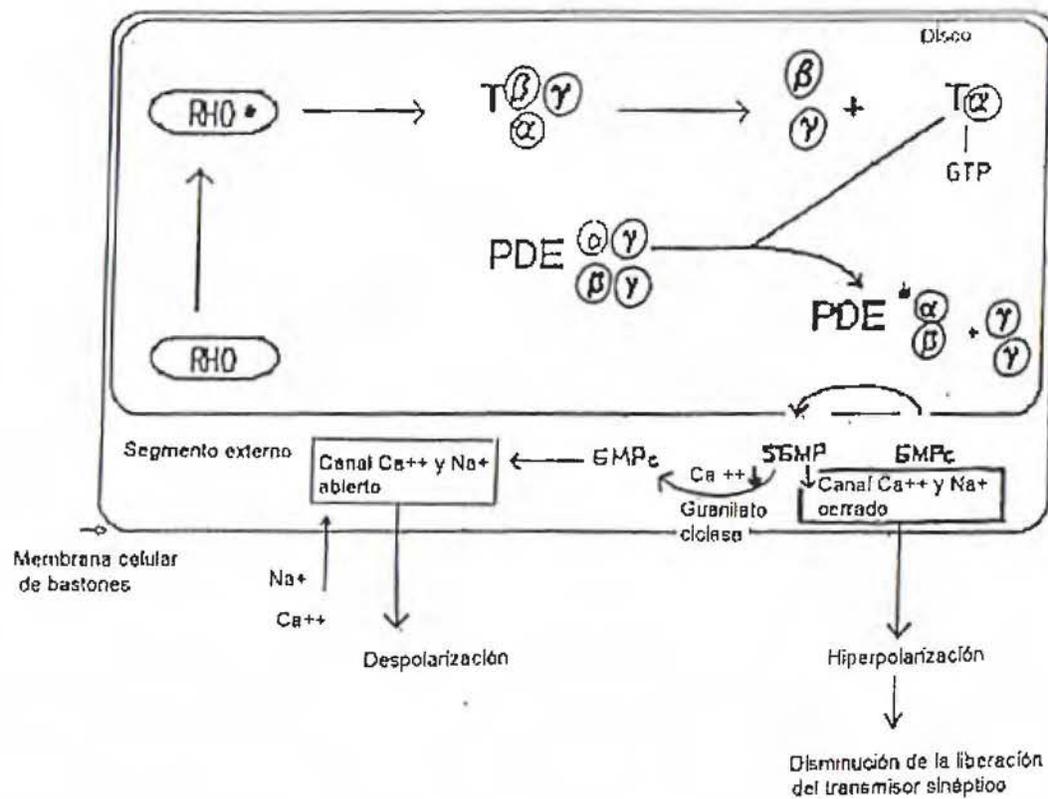


Fig. 9. Cambios en las proteínas de los bastones, que originan la transducción de la señal visual. Rho, rodopsina; T, transducina; PDE, fosfodiesterasa.

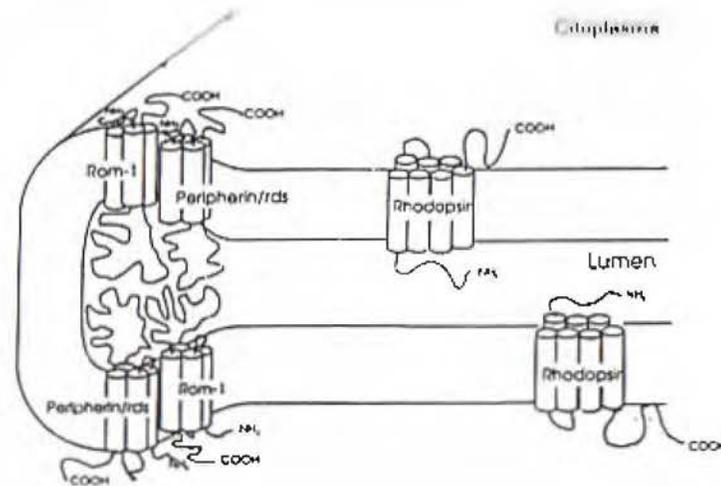


Fig. 10. Diagrama de la membrana de los discos del segmento externo de un bastón. Se muestran la rodopsina y el complejo periferina/rds-rom1. Se muestran las subunidades de la periferina/rds y de la rom-1 separadas por simplicidad, aunque estudios bioquímicos sugieren la unión entre subunidades por enlaces disulfuro. Parecen interactuar para mantener la región curvada del disco. Tomado de Molday, 1994.

más común en la visión en color humana se da por el polimorfismo serina/alanina en la posición 180 en el gen del pigmento rojo, que al igual que el pigmento verde está en el cromosoma X. El espectro de absorción con el alelo Ser-180 es 4-5 nm diferente del Ala-180 (Merbs y Nathans, 1992). Hombres con el alelo Ser-180 tienen mayor sensibilidad a la luz de larga longitud de onda que los de Ala-180 (Winderickx *et al.* 1992). En poblaciones caucasoides, el Ser-180 tiene una frecuencia del 62%, mientras que el Ala-180 está en el resto de la población.

Los genes de los pigmentos rojo y verde están organizados en "tandem" (uno seguido del otro), y las unidades de transcripción tienen 98% de homología, lo cual predispone a recombinaciones homólogas pero desiguales que generan genes híbridos, que tienen nuevas propiedades de absorción; además se dan recombinaciones intergénicas desiguales que generan arreglos con genes repetidos o perdidos. Por su parte, el gen del pigmento azul está en el cromosoma 7q31.3-32 (Fitzgibbon *et al.* 1994), y defectos en la función de conos azules se heredan con patrón autosómico dominante, y las mutaciones de este gen tienen frecuencia entre 1:500 y 1:10000. El gen de la rodopsina está en el cromosoma 3q21, es de 7 kb (Souied *et al.* 1994) y se han encontrado más de 60 mutaciones (en alguno de sus 5 exones) que causan RP

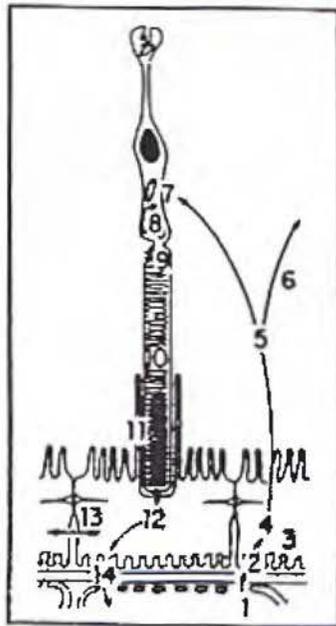
autosómica dominante, autosómica recesiva y ceguera nocturna congénita estacionaria (CSNB) (Nathans, 1994).

4. Genética y Fisiopatología de la Retinosis Pigmentaria

La gran heterogeneidad clínica de la RP se comprende si se toma en cuenta la cantidad de proteínas que participan en vías metabólicas del desarrollo y **función normales del epitelio pigmentado de la retina y de los fotorreceptores**. Si alguna proteína es defectuosa, los fotorreceptores -como es el caso en Retinosis Pigmentaria- sufren degeneración por mecanismos aún no muy claros, y mueren por apoptosis (Chang *et al.* 1993).

En la Figura 11 se muestran las vías que se podrían relacionar con esta degeneración. El problema se podría deber a un transporte transepitelial **defectuoso**, **receptores anormales de membrana**, **sitios anormales en receptores de la célula fotosensible**, defectos en el mecanismo intracelular, defecto en la fagocitosis, alteraciones en el equilibrio iónico y transporte activo, e hipoxia y anoxia, entre otros.

Los mecanismos por medio de los cuales los alelos mutantes llevan a la degeneración de bastones y conos no están claros. Por ejemplo, en el caso de las mutaciones en el gen que codifica para la rodopsina, una de la hipótesis es que la opsinina activa continuamente a la transducina, y resulta una



1. Defecto de transporte hacia el Epitelio Pigmentoso
 2. Receptores de membrana del EP dañados
 3. Defectos metabólicos dentro de las células del EP
 4. Defecto de transporte trans-epitelial
 5. Defecto en la donación al fotoreceptor
 6. A otras células de la retina
 7. Sitios anormales en el fotoreceptor
 8. Defectos en el metabolismo
 9. Fallo en la membranogénesis
 10. Incapacidad para estabilizar membranas de los discos
 11. Defecto en la fagocitosis
 12. Defecto en la lisis
 13. Comunicación y transporte lateral defectuoso
 14. Incapacidad de sacar productos de la lisis.
- (Heckenlively, 1988).

Fig. 11. Posibles mecanismos involucrados en la degeneración de la retina. Tomado de Heckenlively, 1988.

sobrestimulación patogénica de los fotorreceptores (Robinson *et al.* 1992). Se trataría de un activación continua de la fototransducción, análoga a una constante exposición a la luz, lo cual se sabe que provoca la muerte de la célula (William & Barker, 1980). Esto ha sido demostrado en algunos casos, como cuando ocurre una mutación correspondiente al sitio de unión de la opsina con el cromóforo, ocasionan que la rodopsina active constitutivamente a la transducina, y no sea fosforilada por la rodopsina quinasa (Robinson *et al.* 1994). Sin embargo, recientemente se encontró una mutación en la rodopsina que no provoca una continua activación de la fototransducción, aunque si causa la degeneración retiniana (Li *et al.* 1995).

Algo interesante es que independientemente del origen molecular de la RP, la muerte de los fotorreceptores se da por apoptosis, también conocida como muerte celular programada. Las características citopatológicas de la apoptosis comprenden la fragmentación del ADN entre los nucleosomas, condensación de la cromatina, deformación de la membrana celular, aparición de los llamados cuerpos apoptóticos y la llegada de macrófagos para fagocitar (Chang *et al.* 1993). El proto-oncogen Myc ha sido encontrado como participante en el proceso apoptótico, al igual que la p53, la Apo 1, la Bcl-2, etc. (Collins y López, 1993).

Los hallazgos en genética molecular confirman y hacen más evidente la heterogeneidad que se observa a un nivel fenotípico. Por medio del análisis de ligamiento genético se han mapeado diversos genes relacionados con la degeneración retiniana (Cuadro III). Estos mapeos se han realizado por genética reversa, debido a la gran cantidad de vías implicadas y al desconocimiento de la región del genoma que codifica para muchas de las proteínas que participan en estas vías; y como era predecible, el mapeo de genes causantes de enfermedades retinianas ha llevado a relacionarlos con proteínas fundamentales en la transducción de la señal visual, como la rodopsina, la periferina, la ROM-1 y la subunidad B de la fosfodiesterasa. En el caso de la rodopsina, inicialmente una mutación en el gen que codifica para ella se encontró como responsable de un tipo de RPAD. El gen se localizó en 1989 gracias a la búsqueda en una familia grande de Irlanda; después de una cobertura de muchos sectores del genoma, se localizó en el cromosoma 3q, muy cerca del marcador ADN C17 (D3S47). Esto dio la clave sobre la posible proteína responsable, debido a que el gen que codifica para la rodopsina había sido mapeado recientemente en esa región (Humphries *et al.* 1992).

CUADRO III. Genes humanos mapeados o clonados que causan degeneración de la retina

Símbolo	Localización	Proteína	Enfermedad
SD	1p21-p13	Ligamiento	ar Stargardt
RP12	1q31-32.1 *	Ligamiento	RPAR I
USH2	1q *	Ligamiento	Usher-2
BBS	3p	Ligamiento	ar Bardet Biedl
RHO, RP4 RP5, CSNB	3q21-q24 *	Rodopsina	35% RPAD, 1% RPAR II adCSNB
RP-	3q (10cM RHO) *	Ligamiento	RPAR III
RP-	4p14-cen	Canal iónico	RPAR IV
PDEB CSNB	4p16.3 *	GMPC- fosfodiesterasa B	5% RPAR V adCSNB
IDUA	4p16.3	IDUA	adCSNB
RP7	6p21.2-cen *	Periferina-RDS	5% RPAD
RP-	6p (20cM RDS) *	Ligamiento	RPAR VI
RPLS	6q1*	Ligamiento	ar como Stargardt
CRD-	6q27-ter	Ligamiento	ad distrofia cono-bastón
RP8	7p13-15.1 *	Ligamiento	RPAD
RP9	7q	Ligamiento	RPAD
RP1	8q11-q21 *	Ligamiento	RPAD
USH1C	11p15-p13 *	Ligamiento	Usher-1
ROM1	11q13 *	ROM1	RPAD
BD	11q13	Ligamiento(ROM1?)	ad-Best
USH1B	11q14 *	Ligamiento	Usher-1
RP-	14q11	Ligamiento	RPAR VII
USH1A	14q32 *	Ligamiento	Usher-1
RP-	17p13.1	Ligamiento	RPAD
CRD-	18q21.1	Ligamiento	ad distrofia cono-bastón
RP-	19q	Ligamiento	RPAD
RP6	Xp21.3-p21.2	Ligamiento	RPLX
RP3	Xp21.1	Ligamiento	RPLX
RP2	Xp11.4-p11.23	Ligamiento	RPLX
CHM	Xq21.1-q21.3	Transferasa	Coroideremia

Basado en Daiger *et al.* 1993; ampliado.

* Regiones estudiadas en este trabajo

Ahora bien, se encontró que una mutación nula en el gen de la rodopsina (RHO) es responsable de un tipo de RPAR; ésta fue encontrada en un paciente con una mutación "sin sentido" (nonsense), en el codón 249 de ambos alelos (Rosenfeld *et al.* 1992). Posteriormente, se han encontrado más familias con RPAR, cuyo gen incompetente es el que codifica la RHO, como la encontrada en el sur de la India que tiene una mutación por "pérdida del sentido" de la proteína (missense) en el codón 150 (Kumaramanickavel *et al.* 1994). Este tipo de mutación en la RHO, al igual que las mutaciones que truncan la formación de la proteína (nonsense), ha sido implicado -como se apuntó anteriormente- en tres tipos de enfermedad visual: RPAD, RPAR y ceguera nocturna estacionaria congénita (CSNB). Según sea el sitio de la mutación, así será la patología originada; se ha sugerido la hipótesis de que si la rodopsina sufre una mutación que provoca su activación constitutiva, entonces se originaría RP. Mientras que si el resultado de la mutación es la activación de la transducina cuando se pierde espontáneamente el cromóforo, lo que no ocurre en condiciones normales, se provocaría la CSNB (Dryja *et al.* 1993) (Fig.12). Ahora bien, el por qué una mutación en RHO causa RPAD y otra causa RPAR no está claro aún; se han encontrado diferentes mutaciones "sin sentido" que provocan RPAD y una mutación "sin sentido" que provoca

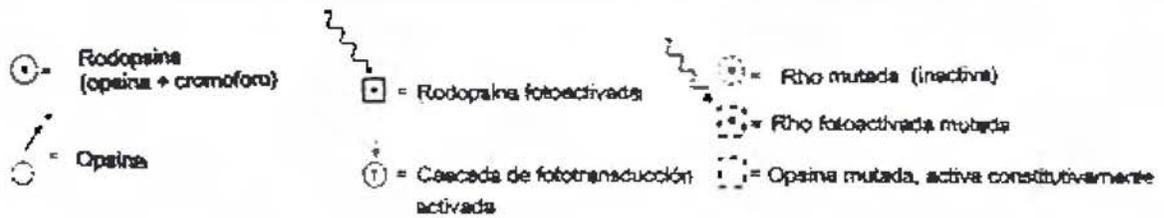
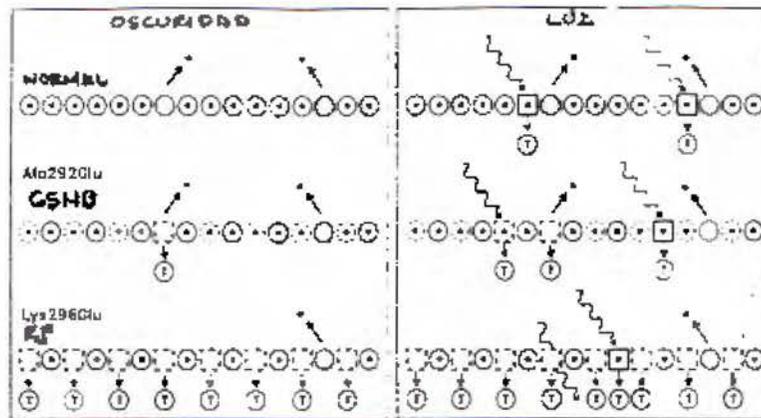


Fig. 12. Mecanismo hipotético que explica la disfunción de los bastones en la ceguera nocturna estacionaria (CSNB) debido a la mutación en la posición 292 de la rodopsina. Tomado de Dryja *et al.* 1993.

RPAR (al perder el sexto y séptimo dominio transmembranal, incluido el sitio de unión al cromóforo), pero el mecanismo con que esta mutación lleva a la degeneración se desconoce. La mutación del aminoácido 150 (que provoca RPAR), se da en un sitio que interactúa con la transducina, por lo que se especula que la mutación resulta en la incapacidad de activarla (Kumaramanickavel *et al.* 1994).

También la subunidad B de la fosfodiesterasa (PDE) es responsable de un tipo de RPAR (McLaughlin *et al.* 1993); esta subunidad se encuentra en la región 4p16.3 y se han encontrado siete mutaciones en algunos de sus 22 exones (McLaughlin *et al.* 1995). Recientemente se encontró que una duplicación en tandem de 71 bp del exón 1 es la causa de una RPAR en una familia española, que cambia el marco de lectura y origina un codón de terminación prematuro (Bayés *et al.* 1995). Además, una mutación en la subunidad B de la fosfodiesterasa es causante de ceguera congénita estacionaria (CSNB) (Gal *et al.* 1994), al igual que la RHO. El mecanismo hipotético para explicar el origen de la CSNB debido a una mutación en la PDEB consiste en que la subunidad B no permite el contacto con una subunidad γ , por lo que no se inactiva la PDE en la oscuridad (Fig.13), por lo que los fotorreceptores permanecen siempre hiperpolarizados, y como resultado final se obtiene la incapacidad de transmitir niveles bajos de luz y

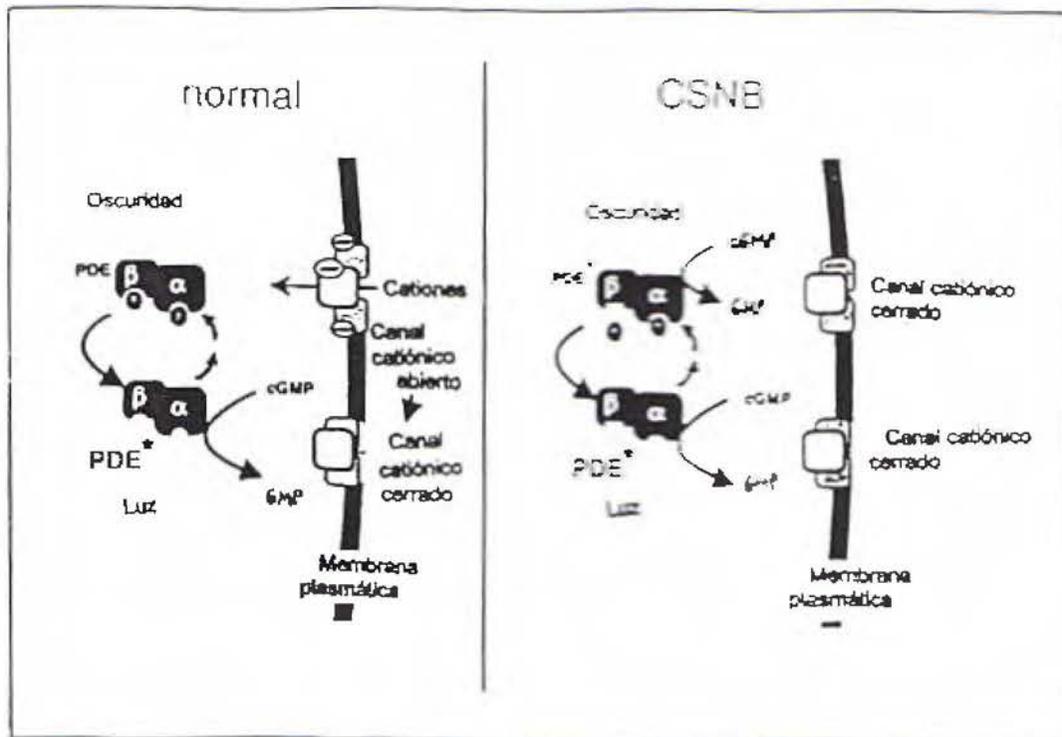


Fig. 13. Mecanismo hipotético que explica la permanente activación de la fosfodiesterasa (PDE), que origina CSNB. A la izquierda, la vía normal de activación de la PDE, que al sufrir cambio por la transducción de la señal visual mueve las sub-unidades γ , lo que lleva a que se hidrolice el GMPc y se hiperpolarice el fotorreceptor. A la derecha, el desplazamiento de una sub-unidad γ en la PDE β lleva a la inhabilidad de inactivar la PDE en la oscuridad, por lo que los canales catiónicos permanecen cerrados y los fotorreceptores hiperpolarizados. Tomado de Gal *et al.* 1994.

ceguera nocturna. Mientras que, la RP ocasionada por una mutación en la PDEB se explica por el incremento en niveles de GMPc (que se ha propuesto como deletereo para los fotorreceptores), debido al decrecimiento de la actividad de la PDEB por las mutaciones. Sin embargo, el mecanismo preciso que lleva a la muerte celular no está claro todavía (McLaughlin *et al.* 1995).

Por su parte, no se ha encontrado relación entre ningún tipo de RP ni Usher con el gen de la subunidad γ de la fosfodiesterasa-GMPc, que se encuentra en el cromosoma 17q21.1,(Cotran *et al.* 1991).

Cabe añadir que de acuerdo con los datos hasta ahora encontrados, el gen de la PDEB no es el principal responsable de la RPAR. En la familia española se encontró sólo una familia afectada por una mutación en ese gen de un total de 19, mientras que Mc Laughlin y colaboradores (1993) encontraron una mutación en el gen PDEB en tres de 99 pacientes no relacionados (3%), aunque sólo estudiaron 7 de los 22 exones. Riess y colaboradores (1992) no encontraron ninguna mutación responsable en ese gen al analizar 13 pacientes no emparentados. Mientras tanto, el gen de la RHO ha sido involucrado en sólo un caso de la enfermedad (de 126 pacientes estudiados) (Rosenfeld *et al.* 1992). Esto indica que la causa de la RPAR es desconocida en más del 90% de las familias (Bayés *et al.* 1995).

No obstante, hay loci que se han relacionado por ligamiento con la RPAR; tal es el caso del canal catiónico dependiente de GMPc (Bruford *et al.* 1994), cuyo gen está en la región 4p14-cen (Pittler *et al.* 1992). Además, se ha encontrado ligamiento de la RPAR con la región 14q11 (marcador D14s80), por lo que puede tratarse del gen para un zipper de leucina específico de retina (NRL), candidato muy probable ($x^2=3.64$; $p=0.028$) (Bruford *et al.* 1994).

La arrestina (antígeno-S), situada en el cromosoma 2p no se ha encontrado como responsable de ninguna RP, como tampoco la X-arrestina (cr. Xcen-Xq21), que tiene 50% de homología con la primera, y se encuentra en los segmentos interno y externo de los fotorreceptores (Murakami *et al.* 1993).

La periferina/RDS y la ROM-1 son proteínas estructurales de los discos del segmento externo de los bastones y conos. La periferina está implicada en RP autosómica dominante, y su gen se encuentra en el cromosoma 6p (Farrar *et al.* 1991). La ROM-1 está en el cromosoma 11q13, y sola no ha sido encontrada como responsable de RP. Su región codificante es de 1 kb interrumpida por dos intrones (Bascom *et al.* 1993; Molday, 1994).

Además, se han mapeado otros genes responsables de RPAR, y aunque todavía no se han aislado, se ha encontrado ligamiento en la región 6p y en la región 1q31-q32.1. El gen situado en 6p, cerca del marcador D6s291, no es el mismo que el de la periferina/RDS, proteína implicada en la RP

autosómica dominante, sino que está a unos 20 cM telomérico de ese gen. Se encontró ligado en una familia de República Dominicana obteniendo un $Z_{max} = 5.34$ con un 5% de recombinación (Knowles *et al.* 1994). En el cromosoma 1q se encontró un gen implicado con la RPAR, ligado al marcador F13B, gracias al análisis en una familia holandesa ($Z_{max}=4.99$ con 8% de recombinación) (van Soest *et al.* 1994).

Es notoria la gran heterogeneidad de la RP, pero la complejidad del estudio de la RP no sólo se debe a heterogeneidad genética sino también al hallazgo de una RP provocada por heterogeneidad compuesta. Kajiwara y colaboradores (1994) encontraron que una familia con RP con un patrón de herencia aparentemente autosómico recesivo, los afectados presentaban una mutación en uno de los genes RDS y otra en uno de los genes ROM-1, mientras que los otros dos genes correspondientes a los cromosomas homólogos eran normales. Por otra parte, van Soest y colaboradores (1994) encontraron una familia de RPAR que aunque sus miembros tienen ancestros comunes, el origen de la RP se debe aparentemente a dos genes distintos en la misma familia: los afectados de una parte de la familia tienen el gen ligado a 1q31-32.1, mientras que los afectados de otra parte de la familia no. Estos hallazgos indican que el estudio de la RPAR es particularmente difícil.

5. Tratamientos para la Retinosis Pigmentaria

Con base en los síntomas de la RP se han aplicado diversos tratamientos para intentar -al menos- disminuir el ritmo de la degeneración retiniana. Se han utilizado vasodilatadores, tejido de placenta, terapia con vitamina A por varios meses (hasta tres años), vitamina E por un año, hidrolisato de ARN de levadura, y otros tratamientos, y con ninguno se ha obtenido efecto beneficioso. Además, se han implementado tratamientos para curar esta enfermedad, pero sin un protocolo que incluya distribución al azar, con controles adecuados y no se han medido los resultados mediante una prueba objetiva, como el electroretinograma (ERG) (Berson *et al.* 1993). Para numerosos oftalmólogos tal es el caso del tratamiento propuesto y ejecutado en Cuba, que tiene tres componentes: ozonoterapia, tratamiento con electricidad y procedimiento quirúrgico, denominado "Cirugía Revitalizadora". Este último consiste en realizar **microincisiones en el polo posterior del ojo**, y unir ese sitio con el **tejido graso orbitario para llevar vías vasculares** y aumentar la irrigación en la retina. A los **especialistas no les queda claro cómo el procedimiento garantiza el detenimiento de la degeneración**, puesto que el problema original es una **proteína deficiente**. Además no se han comprobado

los resultados con el ERG. No obstante, los médicos que aplican el tratamiento afirman que el mismo detiene la degeneración en el 47% de los casos, mientras que obtiene mejoría en el 44% y empeoramiento en el 9%, al valorar el campo visual (Peláez *et al.* 1994). Por su parte, numerosos pacientes expresan mejoría a través del estudio del campo visual (método que requiere de la participación subjetiva del paciente). El hospital "Camilo Cienfuegos" en La Habana, es el único lugar en el que se está efectuando este tratamiento.

Por otra parte, Berson y colaboradores (1993) encontraron que la ingestión de 15 000 UI diarias de vitamina A en su forma palmitato hace más lenta la declinación de la función retineno, la cual se mide con el ERG. También encontraron que la ingestión de 400 UI diarias de vitamina E era perjudicial para el paciente; por esta razón, se recomienda la vitamina A en esas dosis y se desaconseja la E.

Silverman y colaboradores (1994) afirman -por sus trabajos en ratones- que el trasplante de fotorreceptores es un recurso potencial para recuperar la visión, y presentan evidencia de una adecuada conectividad sináptica directa entre los fotorreceptores transplantados y las células del huésped; y de que los fotorreceptores transplantados pueden rescatar células distróficas y revierte cambios degenerativos en tejidos oculares, lo cual constituye una esperanza

para los afectados. Otra es la terapia genética: el hecho de que la muerte de los fotorreceptores siempre sea por apoptosis, permite hipotetizar que si se logra introducir un gen inhibidor de la misma, quizás se evite la degeneración en diversos tipos de RP (Gregory & Bird, 1995). Por otra parte, Li y colaboradores (1994) inyectaron un vector adenoviral en ratones con degeneración retiniana (rds), y lograron la transferencia y expresión génica en células del epitelio pigmentado, fotorreceptores (tanto conos como bastones) y células de la capa interna de la retina, por un período máximo de un mes.

Este último experimento hace evidente la importancia de que los genes que provocan la RP sean conocidos, para que un día, eventualmente, puedan ser insertados en la retina en degeneración para disminuir la pérdida de la visión en pacientes con RP.

6. El problema y la situación de Costa Rica

En Costa Rica, no existen datos epidemiológicos confiables en relación a la Retinosis Pigmentaria, aunque se sabe que es una de las primeras causas de ceguera en el país (Dr. V. Carazo, Com. Pers., 1993); hasta ahora ninguna entidad de salud ni asociación de personas ciegas ha financiado un estudio formal sobre la prevalencia o la incidencia de la RP en Costa Rica. Tampoco

se ha tomado en cuenta al diagnóstico molecular de la RP en la clasificación, pronóstico y consejo genético en el país, por lo que son deficientes.

Por medio de las instituciones que diagnostican y ayudan a las personas con problemas de ceguera es posible encontrar muchas familias con Retinosis Pigmentaria en nuestro país (Apéndice I), las que en su mayoría tienen aparentemente una herencia autosómica recesiva. Aunque en otros países se han encontrado varias regiones relacionadas con la RPAR, se desconocen las mutaciones responsables de la enfermedad en la mayoría de las familias; a diferencia de la RPAD, en cuyo caso se han mapeado por ligamiento o se ha encontrado el gen responsable en la mayor parte de las familias, o sea que se conocen las causas de los principales subtipos.

Si se considera la importancia de la RPAR en Costa Rica, y lo poco que se sabe a nivel mundial sobre la genética de esta patología, es prioritario el estudio de este tipo de RP. Cabe preguntarse si algunas familias costarricenses presentan RPAR debido a un defecto en los genes que codifican para la rodopsina o para la subunidad B de la fosfodiesterasa, la periferina/RDS, la ROM-1, o si el problema está ligado a loci que se han encontrado implicados por el mapeo por ligamiento en otros estudios.

Descartar loci candidatos es el primer paso para que en un futuro se determine cuál o cuáles son los genes que han provocado la RPAR en las

familias de afectados. Este conocimiento podría emplearse para diagnosticar portadores, apoyar el diagnóstico clínico, dar luces sobre la fisiopatología del problema, y contribuir en la búsqueda de la prevención y el tratamiento.

7. Objetivos

A) Generales

1. Determinar si dos grandes familias costarricenses presentan Retinosis Pigmentaria Autosómica Recesiva por tener una mutación en los genes de la rodopsina o subunidad B de la fosfodiesterasa y en otros genes candidatos.
2. Establecer las bases para estudios genéticos futuros sobre la RP y otras enfermedades hereditarias en Costa Rica.

B) Específicos

1. Establecer el patrón de herencia de la RP en algunas familias de la población costarricense.
2. Ratificar clínicamente la Retinosis Pigmentaria en familias con RPAR.
3. Estudiar la genealogía, consanguinidad y factibilidad para el análisis de ligamiento en esas familias.

4. Determinar la presencia de ligamiento entre el fenotipo de las familias con afectados y alguno de los loci candidatos para la RPAR, o bien, descartar a estos loci como responsables de la enfermedad.
5. Determinar los pasos subsiguientes para la investigación genética de la RP en Costa Rica.
6. Establecer sugerencias para estudios similares que requieran técnicas de genética molecular en el país.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Localización, clasificación y escogencia de las familias con RP

Se localizaron familias con miembros diagnosticados con RP (aunque el diagnóstico no fuera preciso), por medio de los archivos del Ministerio de Salud y de la Asociación de Servicios Médicos para el Bien Social. Además, se solicitó información a todos los oftalmólogos del país sobre familias que conocieran con más de un miembro afectado. Así se hizo un registro de familias con al menos un miembro afectado por RP. Se entrevistaron miembros de las familias, y en el caso de familias con varios afectados se llenó un registro de información, se construyó el árbol genealógico, y se determinó el número de afectados y el patrón de herencia de la RP. Seguidamente se escogieron algunas familias con RPAR, con base en el número de afectados y controles más adecuado para hacer el análisis de ligamiento. Se escogieron familias que tuvieran RP con patrón autosómico recesivo, que presentaran homogeneidad clínica y expresión temprana. Para determinar cuales familias padecen de RP autosómica recesiva, se utilizó la CLAVE de Haim (1993):

1. Se excluye el patrón autosómico dominante, si al menos ocurre uno de los siguientes eventos:

- 1.1 Transmisión de RP de padre o madre a hijo (a), no explicada por consanguinidad.
 - 1.2 Al menos la transmisión de un afectado, a través de una persona no afectada, afectando a una tercera persona en línea descendiente, no explicada por consanguinidad.
 - 1.3 Medios-hermanos afectados, y los dos compañeros (as) de su progenitor (a) común, no relacionados (as) y sin historia familiar de RP.
2. Se excluye la herencia ligada al cromosoma X. Si se tratara de RPLX no presentaría transmisión de padre a hijo, ni a través de hombres afectados, y presentaría al menos uno de los siguientes eventos:
- 2.1 En dos generaciones en línea descendiente al menos un hijo afectado de una madre no afectada.
 - 2.2 Medios-hermanos afectados de una madre no afectada, y sus compañeros no relacionados y no afectados.
 - 2.3 Fondo ocular típico de portadora de RP ligada al X en la madre, hermana o hija.
 - 2.4 Diagnóstico de coroideremia.
3. Cumple con alguno de estos requisitos:
- 3.1 Al menos dos hermanos (de padre y madre sanos) afectados

3.2 Todos los hijos que están afectados tienen padres sanos consanguíneos, incluso si se trata de casos aislados.

Seguidamente se amplió el estudio genealógico de las familias escogidas (C1, Fig.14 y P1, Fig.15), por medio de los registros eclesiásticos de la Curia Metropolitana y de la Parroquia de San Ignacio de Acosta. Además, se obtuvo el coeficiente de endocruzamiento (F) (probabilidad de que un individuo reciba en un locus dado dos genes idénticos por descendencia) como medida de la consanguinidad de las uniones que dieron origen a los afectados (Wright, 1922).

Posteriormente se determinaron los miembros de cada familia más adecuados para hacer pruebas con su ADN. Se escogieron todos los afectados que no fueran niños muy pequeños (para evitar molestias por la extracción de sangre), y como no afectados se escogieron a todos los portadores obligatorios.

Los individuos seleccionados para las pruebas de ligamiento, que estuvieron en disposición de participar en el estudio, y que donaron una muestra de sangre, fueron los siguientes:

Familia C1: 36, 39, 40, 44, 45, 46, 47, 41, 42, 43, 13, 30, 16, 35, 27, 21, 20,
24, 32, 33, 28 (Fig. 16).

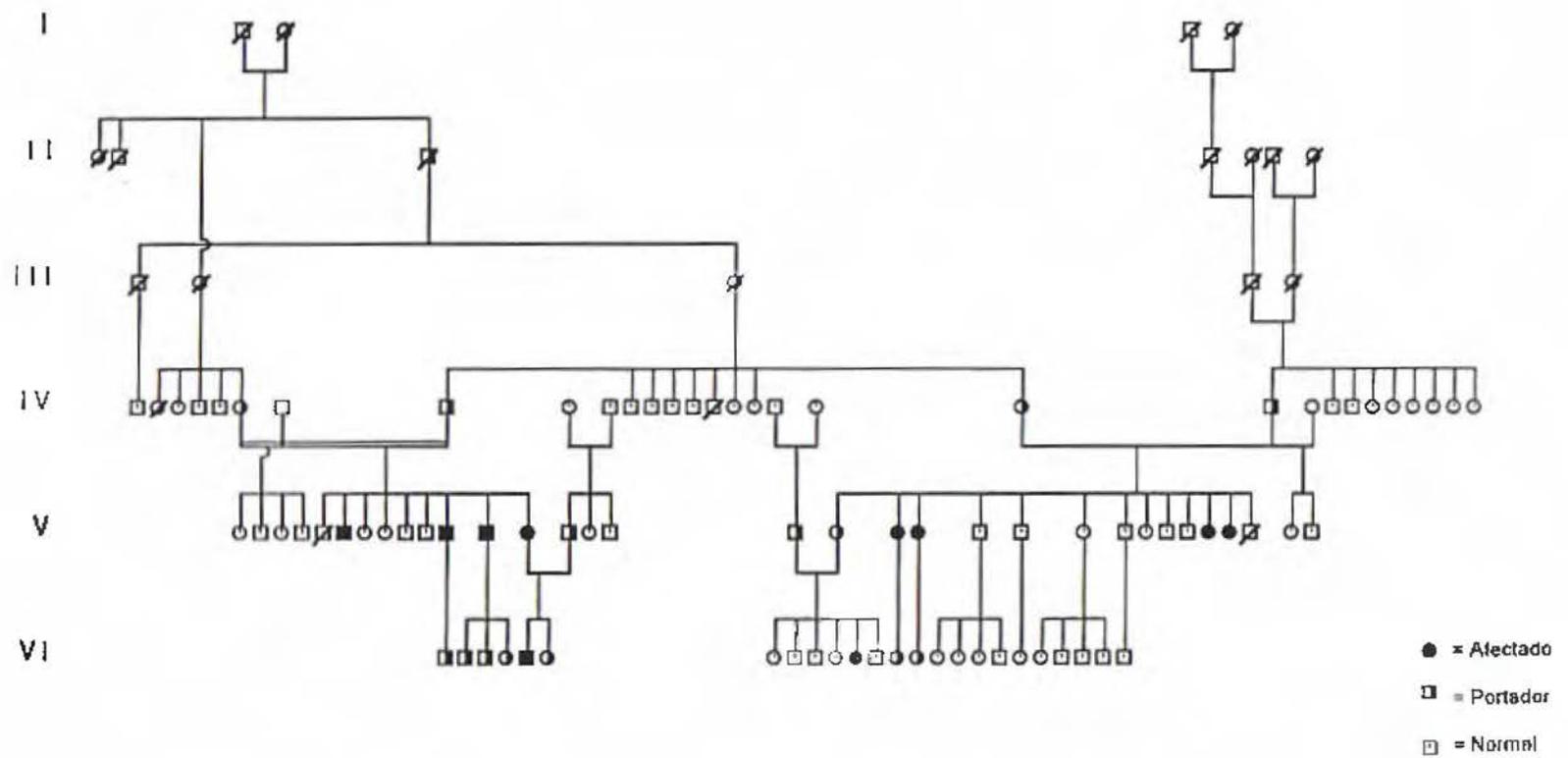


Fig. 14. Árbol genealógico de la familia C1, de San José.

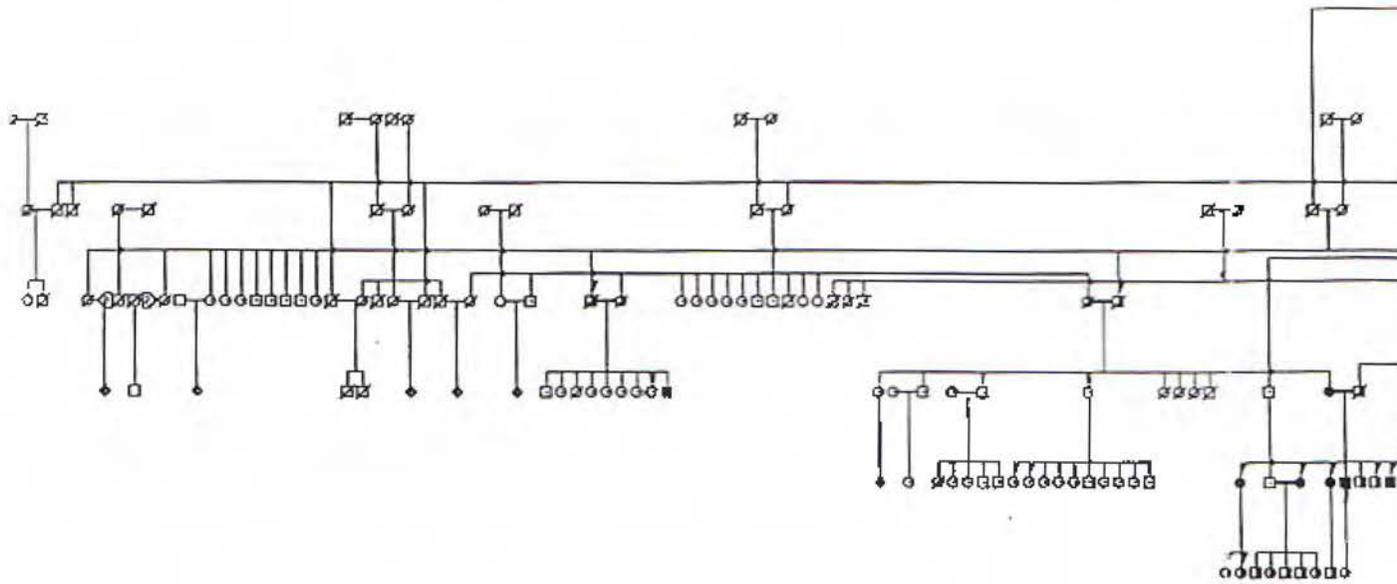
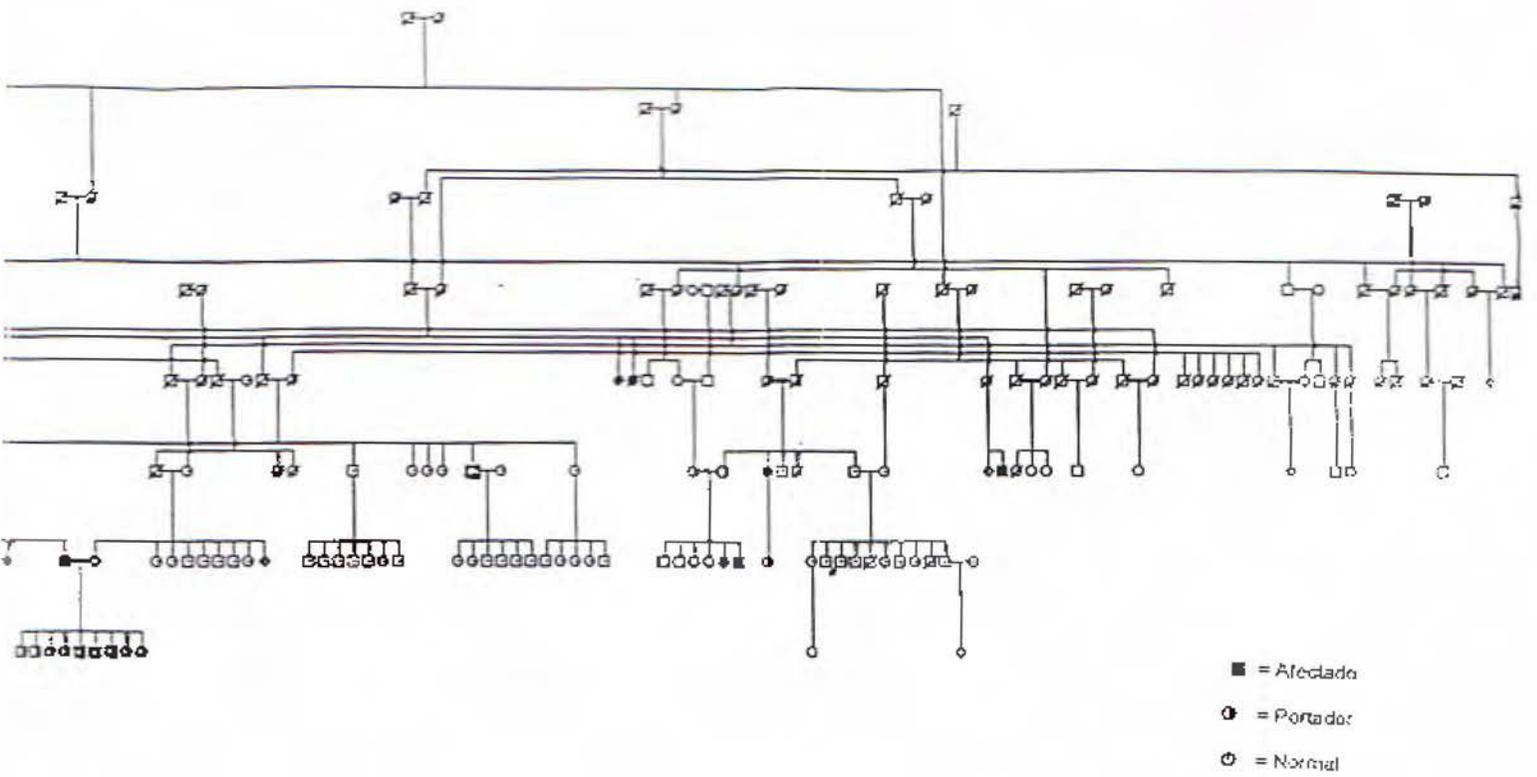


Fig. 15. Árbol genealógico



gico de la familia P1, de Acosta.

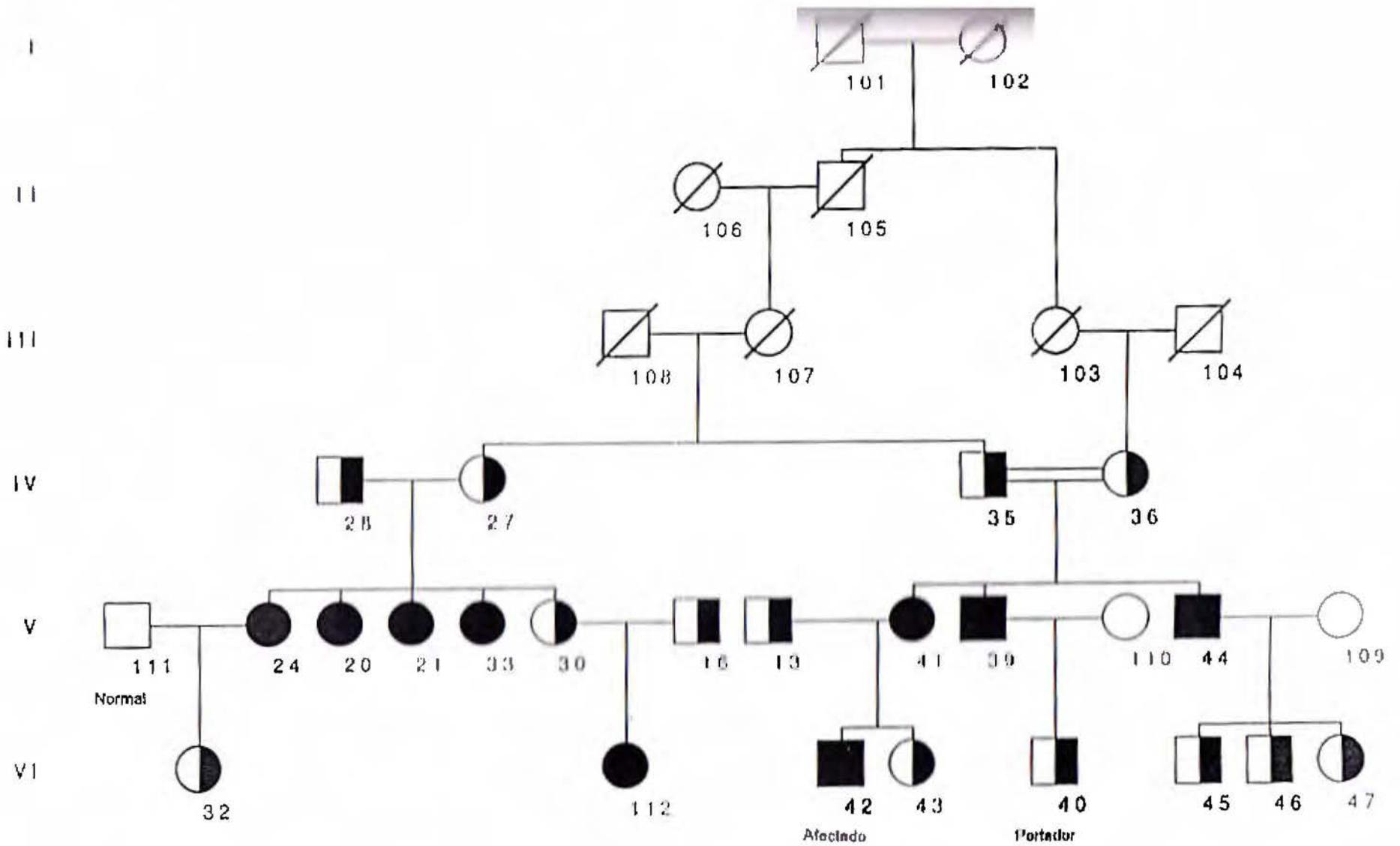


Fig. 16. Síntesis de la familia C1, de San José.

Familia P1: 22, 16, 17, 18, 19, 1, 2, 14, 15, 13, 12, 11, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,
23, 24, 25, 28, 29, 30, 27, 26, 31, 32 (Fig. 17).

Los individuos subrayados están afectados por RP, los demás son portadores obligatorios, con excepción de los individuos P1-25 y P1-30, que no se tiene certeza de que se trate de portadores.

Se explicó a las familias escogidas el propósito y la naturaleza de la investigación, y a los miembros escogidos se les pidió su consentimiento para participar en la investigación (Apéndice II). Luego se les abrió un expediente con sus datos personales y clínicos (Apéndice III).

2. Diagnóstico Clínico

Se consiguieron electroretinogramas (ERG) y diagnósticos clínicos de 16 miembros de la familia C1, realizados en el Ministerio de Salud, incluyendo a afectados, portadores y controles sanos. Entre los individuos a los que se les efectuaron estos exámenes estaban: (C1-) 20, 21, 23, 24 y 112, además se estudiaron individuos sanos (controles).

Además se llevaron 3 personas *afectadas* de la familia C1 y 2 de la P1 al Instituto de la Visión (Dr. David Flikier) para efectuar el diagnóstico clínico. Para obtener un diagnóstico preciso y detallado se efectuaron las siguientes

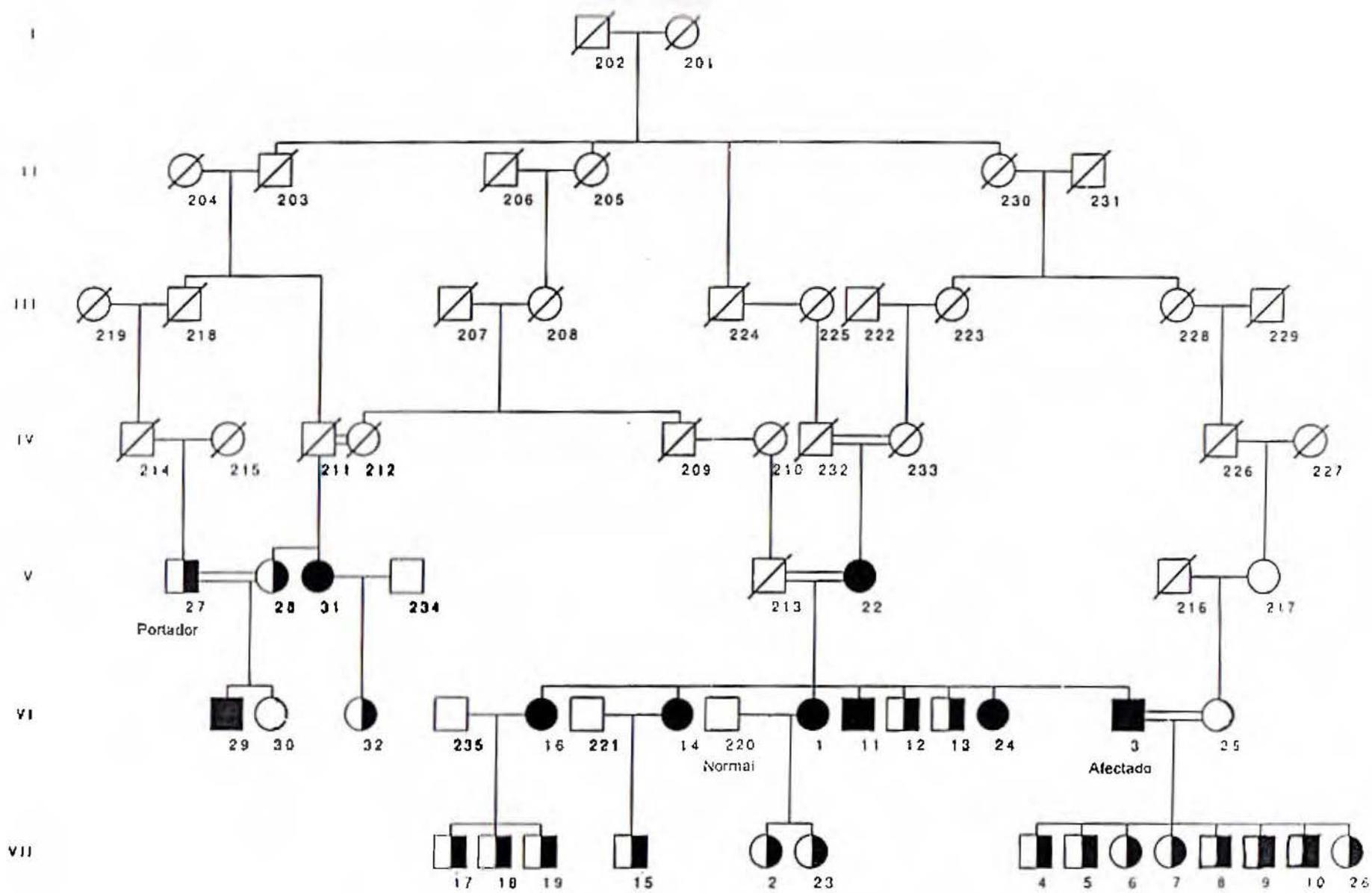


Fig. 17. Síntesis de la familia P1, de Acosta.

pruebas: electroretinograma (ERG), angiografía y estudio del campo visual. Estos análisis también se efectuaron a portadores sanos (controles). Las personas seleccionadas para el diagnóstico completo fueron: de la familia C1, los individuos 24, 32, 41 y 42; y de la familia P1, los individuos 3, 9 y 25. Por razones económicas no se pudieron hacer exámenes a todos los participantes en la investigación.

En el caso de la RP, el ERG es el examen principal debido a que mide la actividad eléctrica de los fotorreceptores. Se realizó el análisis en ambos ojos de los pacientes, bajo sedación con hidrato de cloral, con un equipo Tomey (PE-400). Se hizo un ERG flash con midriasis y adaptado a la oscuridad por 45 minutos, y se midió la amplitud y tiempo implícito para las ondas A y B (ERG escotópico). Luego se hizo un ERG con luz intermitente de 30 Hz (roja), y se midió la latencia y la amplitud. Después, para evaluar la visión fotópica, se efectuó un ERG flash adaptado a la luz por 5 minutos, y se volvió a medir la amplitud y el tiempo implícito para las ondas A y B, y finalmente se midieron los potenciales visuales evocados, con flash intermitente con frecuencia de 2 Hz/s., y se anotaron la amplitud (P100) y la latencia (P100 y F70).

La angiografía en ambos ojos se realizó con un equipo Top-Con (FD-32 y TRC-50 FT) añadiendo fluoresceína intravenosa, y el estudio del campo visual se realizó con la presentación automática de señales en todo el

perímetro, y con la indicación subjetiva del paciente en el momento en que observaba la señal. Se utilizó un equipo Tomey automático, que realizó la prueba central 30-2 (30 grados a partir del centro en ambas direcciones).

3. Análisis molecular de la RP en familias costarricenses

A) Técnicas moleculares

A las personas escogidas y disponibles se les extrajeron 10 mL de sangre, se separaron 2 mL, y se extrajo el ADN por el método de fenol-cloroformo. Se centrifugaron a 2500 r.p.m. los restantes 8 mL y se separaron los linfocitos y se almacenaron a -20 °C, por si se necesitara más ADN en el futuro. El ADN se cuantificó y se guardó a 4 °C. Seguidamente se prepararon soluciones de ADN en agua a 0.008 ug/uL, para ser utilizadas en PCR. Las concentraciones fueron cuantificadas con un espectrofotómetro Shimadzu 204-04550 (1992).

Para observar si había ligamiento entre una de las regiones candidatas y la RP se utilizaron marcadores polimórficos con imprimadores específicos de una región conocida, que amplifican productos de tamaño variable debido a la existencia de repeticiones CA (short tandem repeat polymorphisms, STRP). Estos marcadores son internos o cercanos a las regiones cromosómicas en las que se encuentran los genes RHO y PDEB (3c21-c24 y 4p16.3), así como a

las regiones señaladas (*) en el Cuadro III. Los imprimadores fueron seleccionados de entre los sugeridos por Weissenbach y colaboradores (1992) para el mapeo genético humano, como marcadores de segunda generación, y de entre otros que distribuye la empresa Research Genetics. La lista de marcadores utilizados está en el Cuadro VI, y sus concentraciones originales fueron de 20 μ M. Se probaron diferentes técnicas para observar los polimorfismos, y fueron las pruebas de PCR con marcaje radiactivo de imprimadores (con fósforo-32) las que dieron resultados más claros y rápidos. Para marcar el ADN con fósforo se realizó la reacción quinasa en las siguientes condiciones:

Buffer quinasa 10X	4 μ L
Agua bidestilada estéril	20 μ L
Imprimador .1 (F)	14 μ L
Fósforo-32 γ -GTP (10 μ Ci/ μ L)	2 μ L
T4 quinasa (1 U/ μ L)	0.4 μ L

La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 30 minutos para favorecer la reacción, y luego a 70 °C por otros 30 minutos para desactivar la enzima.

La mezcla maestra (MM) para 80 PCRs se preparó de la siguiente manera:

Agua bidestilada estéril	400 uL
dNTPs (2mM)	80 uL
Buffer polimerasa 10X	80 uL
MgCl ₂ (25 mM)	32 uL
Imprimador .2 (R)	14 uL
Imprimador .1 Marcado	38.4 uL
Taq ADN Polimerasa	5.28 uL

Se agregaron 7.5 uL del MM a cada muestra de 3.5 uL de ADN (8 ng/uL), para un volumen final de 11 uL. Las condiciones de amplificación fueron:

Paso	Temperatura (94 °C)	Tiempo (min:seg)
1	94	3:00
2	94	0:45
3	55	1:20
4	72	0:45
5	9 veces al 2	
6	90	0:45
7	55	1:20
8	72	0:45
9	16 veces al 6	
10	72	3:00
11	4	Hasta alcanzar la temp.
12	Final	

El producto de las PCR's se corrió en geles de poliacrilamida al 6% de 0.5 mm de espesor y de 39 x 31 cm. Para prepararlos se siguió el siguiente protocolo:

Poliacrilamida 20%	18 mL
Urea 7M	42 mL

B) Análisis de los resultados

Se colocaron los polimorfismos en arboles genealogicos que contenian todos los probandos y se verificó la herencia mendeliana de los polimorfismos, con el programa LINKAGE INTERFASE (Nichols, 1994). Seguidamente se utilizó el programa LINKAGE (Lathrop et al. 1984), y se analizó si había ligamiento entre 2 puntos ("two point analysis") con MLINK, y se obtuvo el puntaje Lod como medida de ligamiento (Morton, 1955); además, si hubo un puntaje Lod positivo en $\theta = 0$, se obtuvo un puntaje Lod máximo con el subprograma ILINK. Además, con el fin de determinar el poder de las familias, en cuanto a la capacidad de que se encuentre ligamiento en ellas, se calculó un puntaje Lod en condiciones ideales, asumiendo una correspondencia en la segregación de un alelo del marcador y el gen mutado. Para esto se estableció una segregación de cuatro alelos del gen ligado a RP en las familias.

Por desconocerse las frecuencias alélicas en Costa Rica de los loci marcadores utilizados, se asumió que todas eran iguales para los diferentes alelos, como se suele realizar en estos casos (Terwilliger & Ott, 1994). Para evaluar la trascendencia de asumir la igualdad en las frecuencias, se varió la proporción en las frecuencias en los marcadores MYC y RHO y se efectuó el

análisis de ligamiento (MLINK) con la familia C1. Por último, la frecuencia del alelo mutado del gen causante de la RP en cada familia se calculó asumiendo una incidencia de 1:3500 de RP debido a ese gen (incidencia de RP en Estados Unidos según Boughman *et al.* 1982), en cuyo caso la frecuencia de afectados sería de $q^2 = 0.0002857$, y la frecuencia génica $q = 0.016903$, por lo que la frecuencia de un alelo normal utilizada fue $p = 0.983097$.

RESULTADOS

1. Familias estudiadas.

Se localizaron 70 familias con algún miembro afectado por la RP (Apéndice I), de las cuales se escogieron para el estudio las familias C1 y P1. La familia C1 (Fig. 14) tiene 10 afectados vivos, 14 portadores obligatorios vivos y actualmente la mayoría habita en el Area Metropolitana, al sur de San José. Cuatro de los afectados (hijos de C1-35 y C1-36) proceden de un matrimonio consanguíneo (primos hermanos), mientras que los otros 6 son hijos de parejas que no se pueden considerar genealógicamente como consanguíneas. Se excluyó tanto la RP autosómica dominante como la ligada al X, y se clasificó como de herencia autosómica recesiva porque cumplen los números de la clave de Haim 3.1 y 3.2.

La familia P1 (Fig.15) tiene 13 afectados y 23 portadores obligatorios, y todos los miembros provienen de Ceiba Baja de Acosta. En esta familia, la totalidad de los afectados son hijos de uniones consanguíneas, como sucede con frecuencia en numerosas enfermedades hereditarias. Se excluyeron los patrones dominante y ligado al sexo, y se clasificó como RPAR porque cumple en todos los núcleos familiares el requisito 3.2 de la clave, así como el 3.1.

Como indicador de la consanguinidad de ambas familias, se obtuvo el coeficiente de endocruzamiento (F), para los hijos de uniones entre parientes (Cuadro IV). Cabe recordar, que la familia P1 procede de Acosta, una de las comunidades con mayor coeficiente medio de endocruzamiento del país (Zumbado, 1989). Estos coeficientes de endocruzamiento pueden ser comparados con los valores de F para un cruce entre primos hermanos ($F = 0.0625$) o entre primos segundos ($F = 0.015625$).

Cuadro IV. Coeficiente de Endocruzamiento (F) de los hijos de uniones consanguíneas de las familias C1 y P1.

Familia	Padres (ID-ID)	Descendientes	F
C1	35-36	39, 41, 44	0.03125
P1	27-28	29, 30	0.03516
P1	211-212	28, 31	0.03125
P1	232-233	22	0.03125
P1	213-22	1, 3, 11, 12, 13, 14, 16, 24	0.01172
P1	3-25	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 26	0.00684

2. Diagnóstico clínico de pacientes y controles.

A) Familia C1

Esta familia tiene miembros que padecen de una RP de aparición temprana; antes de que los niños aprendan a hablar ya se observan buscando la luz. La pérdida de la visión es rápida, llegando a ser ciegos, para efectos legales, antes de los 10 años de edad.

A los siguientes miembros de la familia, ya se les conocía el resultado del ERG y se les encontró una respuesta plana, lo que evidencia que los fotorreceptores se encuentran en un estado avanzado de degeneración. (C1-) 20, 21, 24, 33 y 112. Los otros pacientes examinados presentaron un ERG normal.

A continuación se presentan los resultados de los exámenes en los individuos seleccionados para un diagnóstico más detallado.

Paciente C1-32

De sexo femenino y 6 años de edad, hija de la paciente 24 y portadora obligatoria del gen RPAR. Las respuestas fueron normales tanto para el ERG escotópico (Fig. 18a) como fotópico. De igual modo, el tránsito angiográfico (Fig. 19a) y el campímetro se presentaron normales. Este último presentó algunos puntos ciegos, pero sin duda se debió al cansancio de la prueba y la

FLASH ERG (ON)

DATE: SET/95

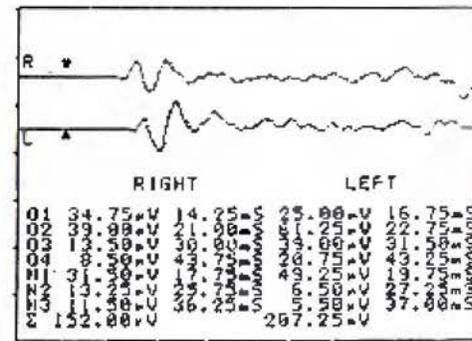
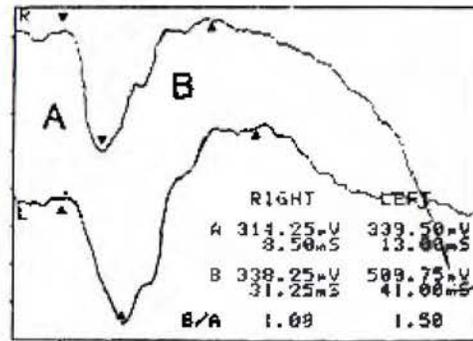
NAME: C1-72

AGE: 6 SEX: M/F

DARK ADAP: 45 MIN

20J 100µV/DIV

0.2SEC 10µS/DIV



FLASH ERG (ON)

DATE: SET/95

NAME: C1-42

AGE: 10 SEX: M/F

DARK ADAP: 45 MIN

20J 100µV/DIV

0.2SEC 10µS/DIV

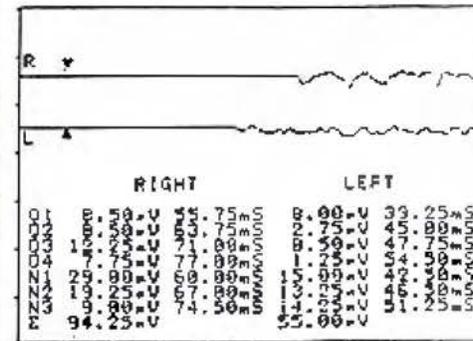
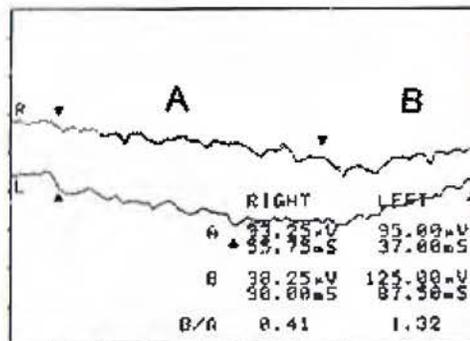
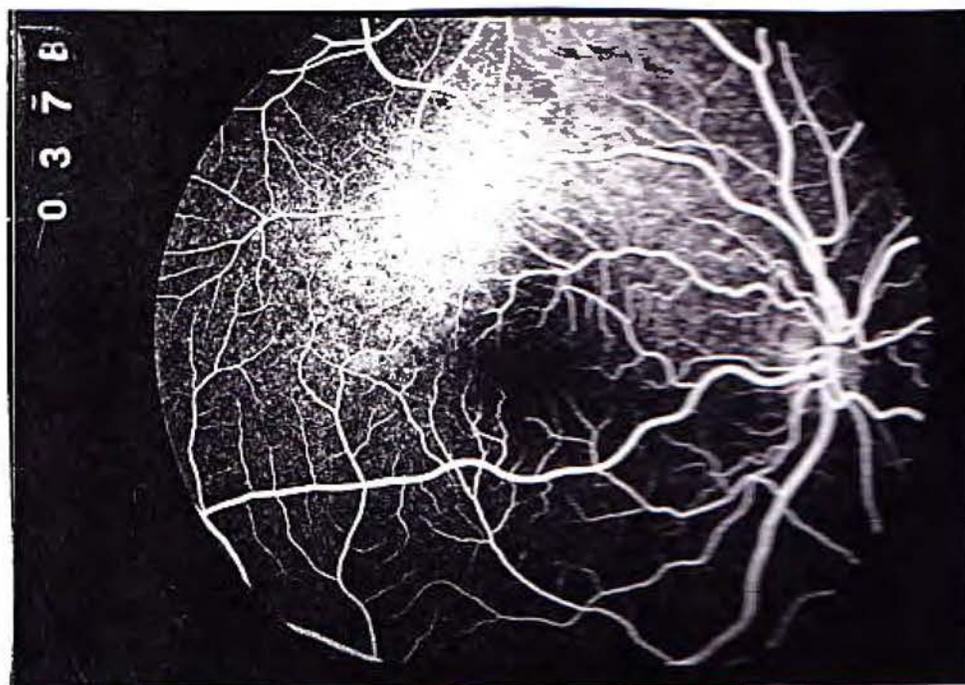
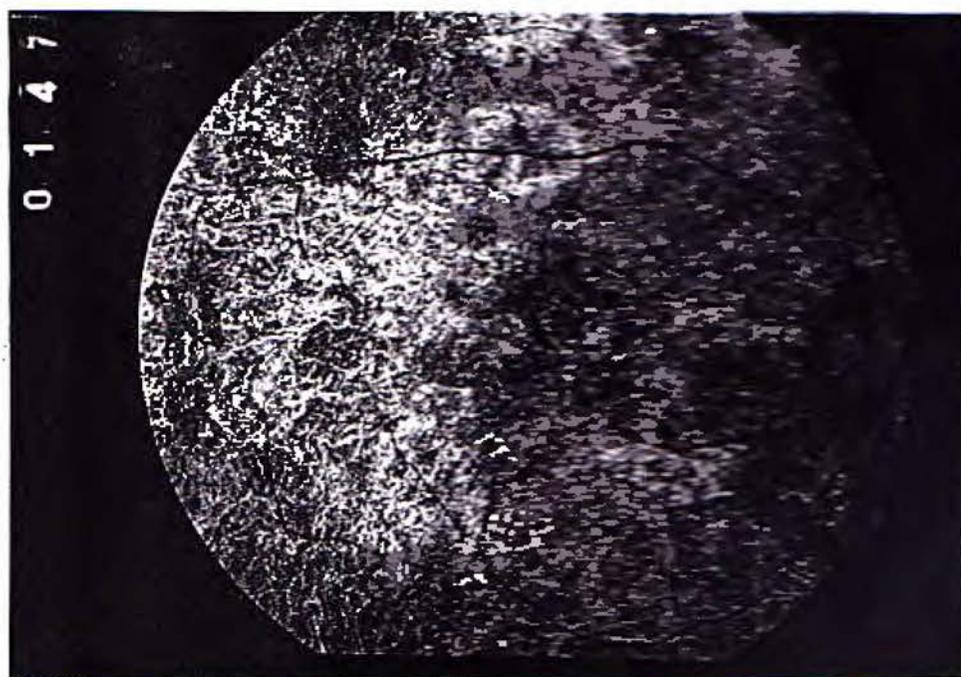


Fig. 18. Electroretinograma escolópico normal y afectado. A: ERG del individuo C1-32 (6 años), con las ondas A y B normales. B: ERG del individuo C1-42 (10 años), con ondas anormales.



A



B

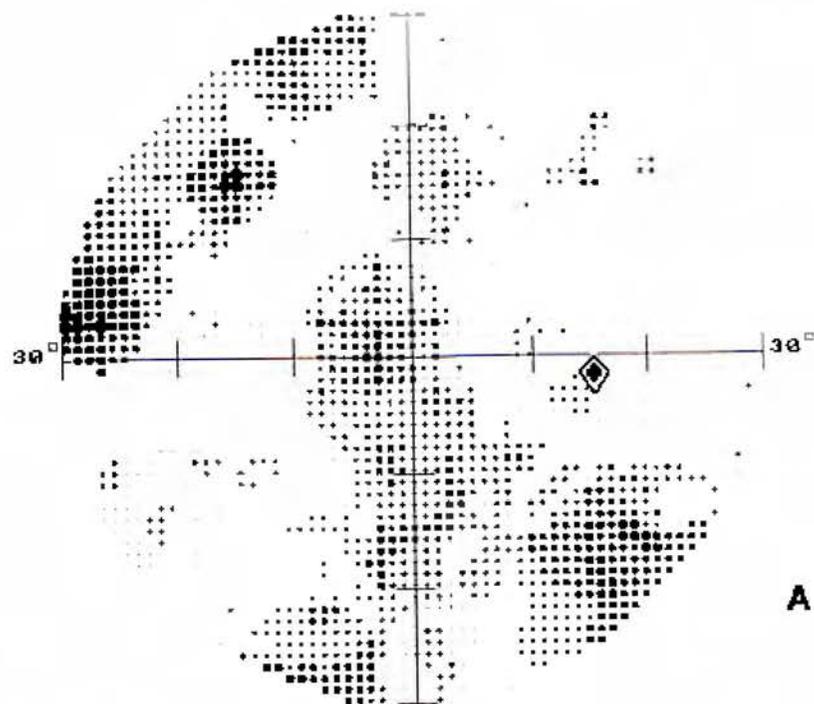
Fig. 19. Angiografía fluorescente de persona normal y afectada. A: Individuo C1-32, irrigación normal. B: Individuo C1-24 (34 años), irrigación atenuada, se puede notar ausencia de fluoresceína en el sistema vascular retiniano. Mácula atrofiada.

edad de la niña (Fig. 20a). Se trata de una portadora sana sin ningún indicio de RP.

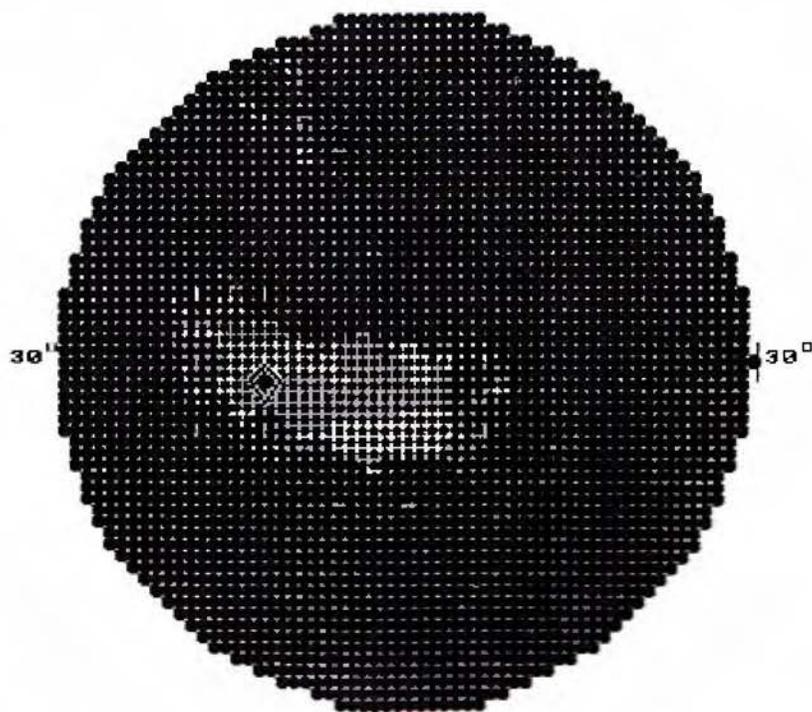
Paciente C1-42

De sexo masculino y 10 años de edad. Presenta serias dificultades para ver de día y de noche. Se encontraron respuestas marcadamente aporadas en los ERG fotópicos y escotópicos que demuestran una severa alteración del sistema de fotorreceptores, tanto de bastones (Fig. 18b) como de conos.

La angiografía fluoresceínica se realizó con dificultad por instagrus. En las fotos libres de rojo se evidencia atenuación del sistema vascular retinal y marcada palidez. Se observa un moteado difuso macular y de la media periferia sin evidenciarse proliferación de pigmento. Con la inyección de fluoresceína se da un llenado coroideo lento, con marcada atrofia coro-capilar, y se logran ver vasos de mediano calibre con facilidad. Existe hiperfluorescencia en parches en la media periferia por atrofia focal del epitelio pigmentario. El tránsito por el sistema vascular retinal está muy retardado y disminuido.



A



B

De mayor a menor visión

dB	30	25	20	17	15	18	5	2	1	0
	30	25	20	17	16	14	9	6	1	0

Fig. 20. Campo Visual de persona normal y afectada. A: Individuo C1-32; por estar de un examen de larga duración, el cansancio en la niña provocó la aparición de sombras en algunas partes del perímetro. B: Individuo C1-24 (34 años), campímetro visual típico de RP, con un remanente visual en la mácula.

El campímetro en ambos ojos evidenció incapacidad de observar la presentación visual correspondiente, en todo el perímetro. El diagnóstico clínico del paciente es: Retinosis Pigmentaria en estadio avanzado.

Paciente C1-41

Es de sexo femenino y tiene 45 años de edad, madre del paciente 42. Se encuentra un marcado aplanamiento de los potenciales en el ERG escotópico, con alguna función residual en el fotópico. Por lo tanto, presenta alteración predominantemente de los bastones, pero con afectación de los conos.

También ella presenta nistagmus. En cuanto a la angiografía, en las fotos libres de rojo se evidencia palidez de las papilas con marcada atenuación del sistema vascular retiniano. Presenta un moteado difuso que involucra el polo posterior y la media periferia, con desaparición del reflejo foveal. Con la inyección de la fluoresceína se observa el llenado coroidal lento, en parches con áreas de hipofluorescencia por bloqueo debido a la proliferación de pigmento y a la atrofia del epitelio pigmentario (la atenuación produce un patrón moteado). A nivel de mácula existe un área geográfica de bordes definidos e irregulares de marcada hipofluorescencia por atrofia coroidal. Hay ausencia de llenado de vasos retinales en el ojo derecho y gran atenuación en el

izquierdo. El diagnóstico es: Retinosis Pigmentaria avanzada con marcada alteración macular.

Paciente C1-24

De sexo femenino y 34 años, prima hermana de la paciente 41. En el ERG se encuentra un marcado aplanamiento de la respuesta escotópica y fotópica, asociado a una severa alteración de los fotorreceptores, tanto bastones como conos en ambos ojos.

Presenta nistagmus. En las fotos libres de rojo se evidencia atenuación del sistema vascular retinal, marcada palidez de la papila, y un área de atrofia macular (Fig. 19b). Existe un moteado difuso macular y de la media periferia sin evidenciarse proliferación de pigmento. Con la inyección de fluoresceína se evidencia llenado coroideo lento, con marcada atrofia corio-capilar, logrando evidenciar vasos de mediano calibre con facilidad. Tiene un área de hipofluorescencia macular en ambos ojos por una marcada atrofia coroidea. El tránsito por el sistema vascular retinal está muy retardado y disminuido, y existe hiperfluorescencia en parches en la media periferia por atrofia focal del epitelio pigmentario. Por su parte, el campímetro presenta un reducido sector con capacidad de visión (Fig. 20b). El diagnóstico es: Retinosis Pigmentaria, atrofia coroidea geográfica macular, atrofia II par.

En el Cuadro V pueden observarse, en resumen, las características de la RP en la familia C1, que corresponden a una RPAR tipo 1 (bastón-cono), de aparición temprana.

Cuadro V. Características fenotípicas de la RP en los individuos estudiados de las familias C1 y P1.

Característica/Familia	C1	P1
● Electrofisiología conos	Respuesta nula temprana o tardía	Respuesta nula tardía
● Electrofisiología bastones	Respuesta nula temprana	Respuesta nula
● Mácula	Moteado difuso temprano Muy alterada, con atrofia geográfica	Atrofiada
● Atenuación vascular	Presente	Presente
● Proliferación de pigmento	Presente (Tardía)	Presente
● Nistagmus temprano	Presente	Ausente
● Epitelio pigmentario	Atrofiado	Atrofiado
● Campo Visual	Típico RP	Típico RP

B) Familia P1

En esta familia se observaban originalmente dos tipos de RP, lo que daba la impresión de RP de expresión variable. Un tipo, el de la mayoría de afectados, es una RP de temprana ceguera nocturna, pero de progresión lenta, y se llega a padecerse una ceguera diurna a los 25 años aproximadamente.

El otro tipo, manifestado por los individuos 8, 9 y 10, consiste en una ceguera nocturna y diurna de aparición muy temprana, así como catarata congénita. Cabe notar que, el diagnóstico clínico reveló la ausencia de RP en este último caso.

Paciente P1-9

De sexo masculino y 8 años de edad. Aunque este individuo presentó un campímetro que demostró ceguera en todo el perímetro, se encontraron respuestas normales en los ERG escotópico (Fig. 21a) y fotópico, por lo que se descartó el diagnóstico de RP. Los potenciales visuales evocados con flash demuestran una disminución de los potenciales en ambos ojos, y se pudo relacionar el cuadro a una profunda ambliopía por antecedentes de cataratas congénitas. Al descartarse alteración en los fotorreceptores, fue necesario excluir a este paciente y a sus hermanos (que presentan características similares), de la condición de afectados por RP. A este individuo no fue posible realizarle la angiografía.

Paciente P1-3

En este paciente, de sexo masculino y 44 años de edad, y padre del individuo 9, sí se encontró una respuesta aplanada tanto en el ERG escotópico (Fig. 21b) como en el fotópico, por atrofia del sistema fotorreceptor (bastones y

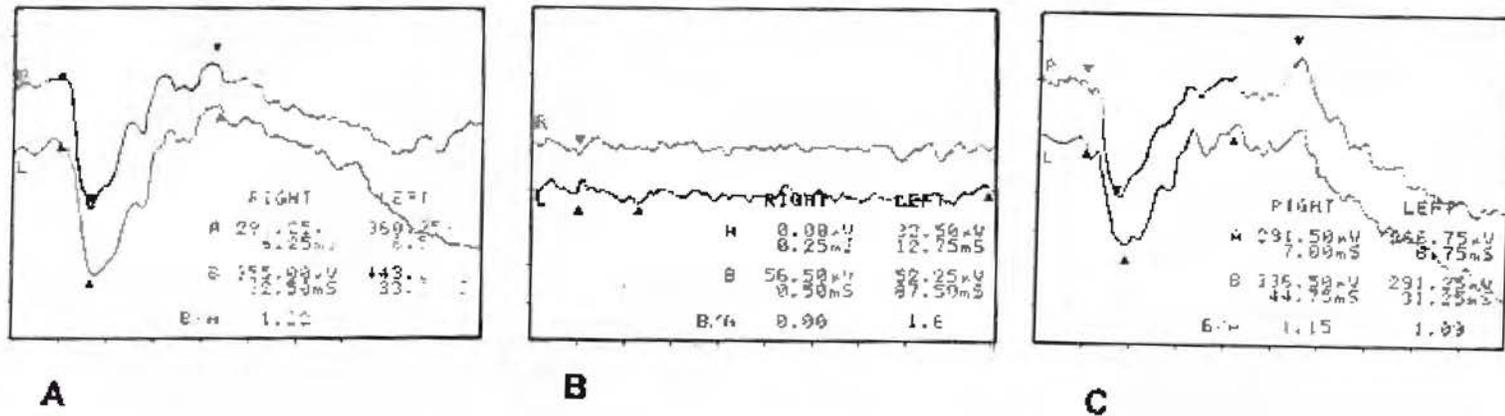


Fig. 21. Electrorretinogramas escotópicos de la familia P1. A: Individuo P1-9 (8 años), ciego por haber tenido catarata congénita, pero con ERG normal. B: Individuo P1-3 (44 años), afectado con RP. C: Individuo P1-25 (40 años), con leves potenciales en la onda B, posible síntoma clínico de un estado portador.

conos). Los potenciales evocados también demuestran un marcado aplanamiento por atrofia del II par.

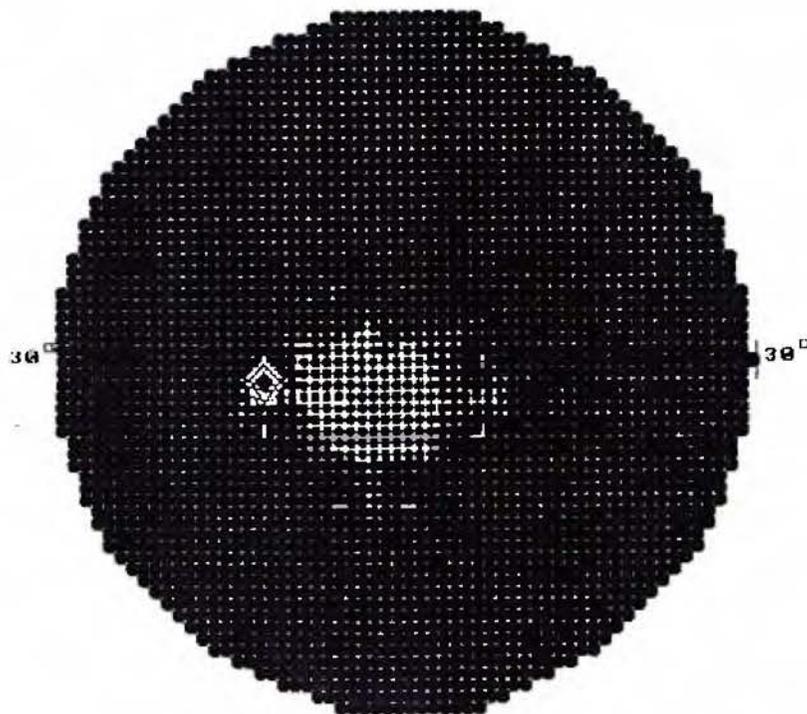
Por su parte, la angiografía demostró, en las fotos libres de rojo la evidencia de espículas pigmentarias hacia la media periferia (Fig. 22a); marcado adelgazamiento del sistema vascular, y palidez del II par por atrofia. Con la inyección de fluorescencia se observa un retardo en el llenado arterial en ambos ojos, con marcado adelgazamiento del sistema vascular retinal. También se presentan áreas de hipofluorescencia (disminución de la fluorescencia de base) por atrofia coriocapilar marcada, así como hipofluorescencia hacia la media periferia por bloqueo de la fluorescencia de base por espículas pigmentarias. Se muestran áreas geográficas de atrofia del epitelio pigmentario macular en ambos ojos.

El campo visual en el individuo 3 muestra un remanente de visión en el área de mayor concentración de conos, por lo que se evidencia un degeneración bastón-cono (Fig. 22b).

El diagnóstico es: Retinosis Pigmentaria en estadio avanzado, atrofia en el II par, y atrofia macular. En el Cuadro V se sintetizan las características patológicas de esta RP, que se trata de una RPAR tipo 1 (bastón-cono), de aparición temprana.



A



B

Fig. 22. Angiografía y campo visual del Individuo P1-3, afectado por RP. A: Se muestra la marcada reducción del sistema vascular, así como la pigmentación característica de RP. B: El campímetro reducido, dejando un remanente en la mácula, indica degeneración bastón-cono.

Paciente P1-25

De sexo femenino y 40 años de edad, madre del individuo 9 y esposa de su primo tercero (individuo 3). Nunca ha presentado problemas en la visión. Las amplitudes de la onda A en el ERG escotópico fueron normales, por lo que se descartó alguna alteración de RP. Existe una leve disminución de los potenciales de la onda B en el ERG escotópico, que no se relaciona con la clínica de la paciente (Fig. 21c). El resto del estudio electrofisiológico es normal.

La angiografía fluoresceínica en ambos ojos, así como el estudio del campo visual fueron normales. No obstante el campímetro mostró dificultades para percibir la señal en la periferia. El diagnóstico es: paciente sana, con disminución en la onda B del ERG escotópico. Se ignora si se trata de una portadora de RP o no, debido a que ninguno de sus hijos se le ha diagnosticado RP, aunque sí catarata congénita. Habría que realizar ERG a portadores obligatorios de RP en esta familia, para observar si la disminución en la onda B del ERG escotópico es útil para el diagnóstico de portadores.

Aunque las características fenotípicas de la RP son similares en ambas familias, la degeneración retiniana es más rápida en la familia C1, que se muestra además del individuo 42, en una niña con la misma severidad, y en el

historial clínico de los demás afectados. En la familia P1 la degeneración es más lenta y la función de los conos dura mucho más tiempo, como es el caso de todos los afectados de esta familia, con excepción de los afectados por catarata congénita (individuos 8, 9 y 10).

3. Lectura de los marcadores polimórficos.

A) Marcadores empleados

Los marcadores utilizados en el estudio, así como la región que amplifican y su efectividad a la hora de ser utilizados en PCR con P-32, se muestran en el Cuadro VI.

CUADRO VI. Imprimadores probados en la búsqueda de ligamiento con RPAR, región cromosómica y calidad de la lectura con P-32, según la familia.

Imprimador	Región	Loci-probando	Calidad de Lectura	
			C1	P1
F13B	1q31-32.1	Cercano a RPAR I	Buena	Buena
C4BPA/B	1q32	Cercano a RPAR I y USH2	Buena	Buena
RHO	3q21-q24	Rodopsina (RPAR II)	Buena	Buena
D3s1309	3q21	Cercano a RHO	Buena	Buena
D3s1268	3q23	Cercano a RHO	Buena	Mala
D3s1279	3q23	Cercano a RHO	Mala	Mala
D3s1306	3q23	Cercano a RHO	Mala	Mala
D3s621	3q	Cercano a RPAR III	Buena	Buena
PDEB	4p16.3	PDEB (RPAR V)	Buena	Buena
D4s412	4p16	Cercano a PDEB	Buena	Mala
D4s431	4p16	Cercano a PDEB	Buena	Mala
D4s432	4p16	Cercano a PDEB	Mala	Mala
D6s105	6p	Cercano a RPAR VI	Buena	Buena
D6s291	6p21.3	Cercano a RPAR VI	Mala	Mala
RDS	6p12	Periferina/RDS	Buena	Buena
D6s251	6q14-q15	Cercano a RPLS	Buena	Mala

CUADRO VI. Imprimadores probados en la búsqueda de ligamiento con RPAR, región cromosómica y calidad de la lectura con P-32, según la familia. (Continuación)

Imprimador	Región	Loci-probando	Calidad de Lectura	
			C1	P1
IGF2R	6q25-q27	Cercano a CRD	Buena	Mala
D7s460	7p	Cercano a RP8	Mala	Mala
D7s435	7p15.1	Cercano a RP8	Mala	Buena
D8s87	8p12	Cercano a RPAD	Buena	Buena
PLAT	8p12-q11.2	Cercano a RP1	Mala	Mala
MYC	8q24	MYC (Proto-oncogen)	Buena	Buena
D10s169	10q26-qter	Cercano a RBP	Mala	Mala
D11s875	11p15	Cercano a USH1C	Buena	Buena
PYGM (CA)	11q13	Cercano a ROM-1	Mala	Mala
D11s876	11q14-q21	Cercano a USH1B	Buena	Mala
D14s43	14q24.3		Mala	Mala
P1	14q32.1	Cercano a USH1A	Buena	Buena
D18s41	18q21.1-q21.3	Cercano a RPAD	Mala	Mala

B) Análisis de ligamiento

En los Cuadros VII y VIII se observan los resultados del puntaje Lod (entre dos puntos del genoma: el gen de la RPAR y el locus del marcador),

para las familias C1 y P1. De las Figuras 23 a 28 se pueden ver ejemplos de los alelos polimórficos en las familias C1 y P1. En el caso de los marcadores que no incluyen información en los Cuadros VII y VIII, no fue posible hacer lectura de los alelos en las radiografías.

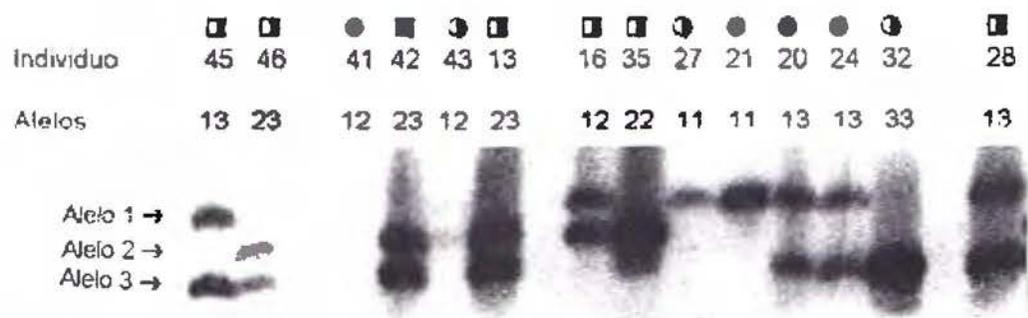
Cuadro VII. Puntajes Lod (Z) obtenidos entre marcadores polimórficos y el gen de la Retinosis Pigmentaria Autosómica Recesiva en la familia C1, según la distancia entre los loci.

Marcador(t)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4
F13B	-∞	-0.4899	-0.1611	-0.0456	-0.0064
C4BPA/B	-∞	-1.0426	-0.4216	-0.1562	-0.0395
RHO	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
D3s1309	-∞	-0.8998	-0.2460	-0.0375	0.0013
D3s1268	-∞	-0.6685	-0.2787	-0.1033	-0.0227
D3s1306	-∞	-0.5247	-0.1894	-0.0601	-0.0038
D3s621	-∞	-0.7053	-0.3118	-0.1236	-0.0310
PDEB	-∞	-0.2183	0.0092	0.0329	0.0271
D4s412	-∞	0.3845	0.4341	0.2754	0.0965
D4s431	-∞	-1.0882	-0.3627	-0.1015	-0.0113
D6s105	-∞	-0.7161	-0.1399	0.0118	0.0124
RDS	-0.0083	0.2063	0.2239	0.1408	0.0414
D6s251	-∞	-1.1975	-0.4637	-0.1647	-0.0388
IGF2R	-∞	-0.8401	-0.3383	-0.1303	-0.0375
D8s87	-∞	-0.7260	-0.1496	0.0002	0.0065
MYC	-∞	0.0233	0.3050	0.2479	0.1028
D11s875	-∞	-0.5789	-0.1503	-0.0220	0.0042
D11s876	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
P1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

Cuadro VIII. Puntajes Lod (Z) obtenidos entre marcadores polimórficos y el gen de la Retinosis Pigmentaria Autosómica Recesiva en la familia P1, según la distancia entre los loci.

Marcador/θ	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4
F13B	- 1.0099	- 1.1001	0.0597	0.0561	0.0098
C4BPA/B	- 1.0716	- 0.2211	- 0.0752	- 0.0242	- 0.0045
RHO	- 0.3485	0.3991	0.3154	0.1833	0.0763
D3s1309	- ∞	- 1.3915	- 0.5357	- 0.1904	- 0.0455
D3s621	- 0.4256	- 0.0832	- 0.0501	- 0.0337	- 0.0181
PDEB	- ∞	- 1.1956	- 0.3996	- 0.1046	- 0.0040
D6s105	- ∞	- 2.2524	- 0.9870	- 0.3974	- 0.1070
RDS	- ∞	- 0.1009	0.3390	0.2919	0.1121
IGF2R	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
D7s435	- ∞	- 1.6914	- 0.6926	- 0.2598	- 0.0633
D8s87	- ∞	- 1.0923	- 0.4046	- 0.1357	- 0.0271
MYC	- ∞	- 0.9240	- 0.3007	- 0.0784	- 0.0005
D11s875	- ∞	- 1.3461	- 0.5778	- 0.2288	- 0.0605
P1	0.4845	0.7632	0.6385	0.4050	0.1390

Como puede observarse en el Cuadro IX, ambas familias tienen poder suficiente para que un marcador ligado a la RPAR que las afecta, demuestre la existencia de ligamiento. En la familia C1 es posible un puntaje Lod de $Z(0.0) = 4.58$ y en la familia P1 se puede alcanzar un puntaje de $Z(0.0) = 5.25$. Por esta razón, si un marcador no iguala o supera un puntaje Lod de $Z(0.0) = 3.3$ (o sea 1995:1 a favor de existencia de ligamiento, y no $Z = 3$ porque se podrían producir 9% de falsos positivos) (Lander y Schork, 1994), no existe seguridad de que corresponda al locus ligado a la RPAR en la familia probada.



■ ● = Hombre y mujer afectados
 □ ○ = Hombre y mujer portadores

Fig. 23. Marcador F13B en la familia C1. Con este marcador se descarta al gen de la RPAR I en esta familia ($Z(0,0) = -\infty$).

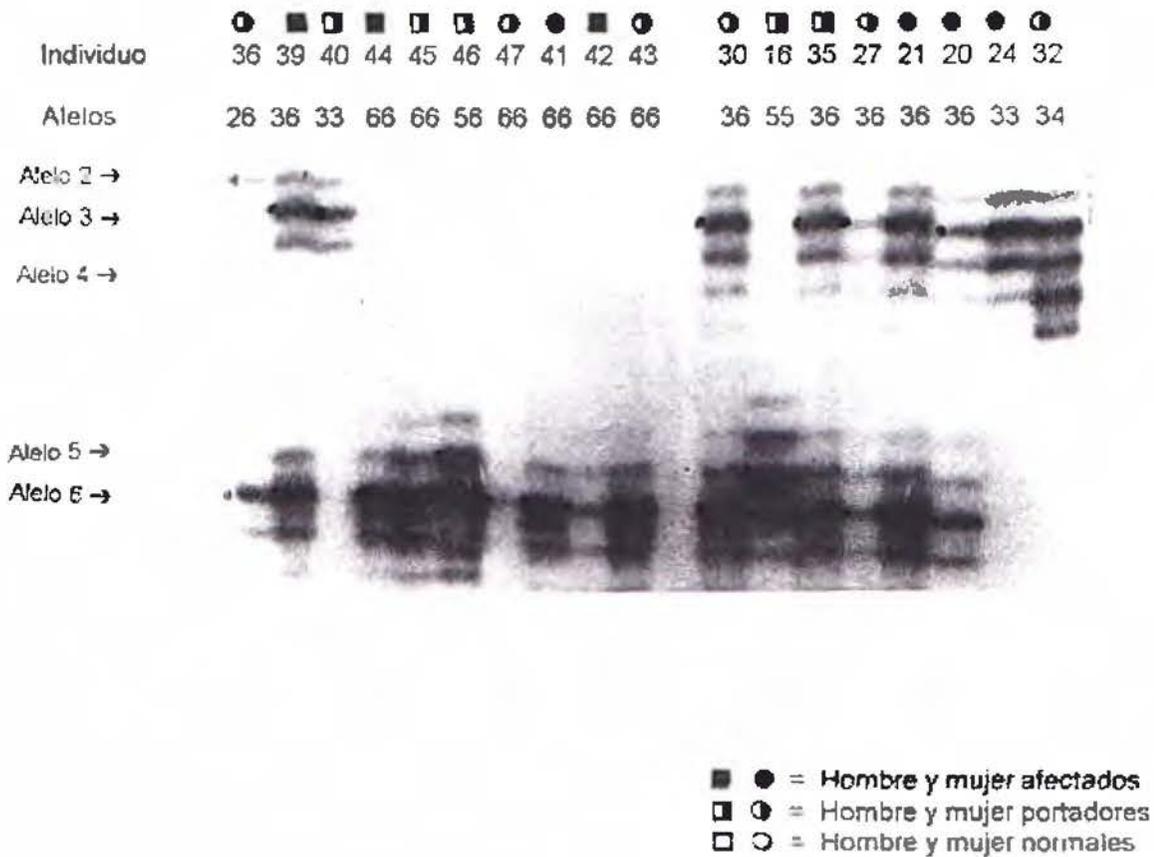
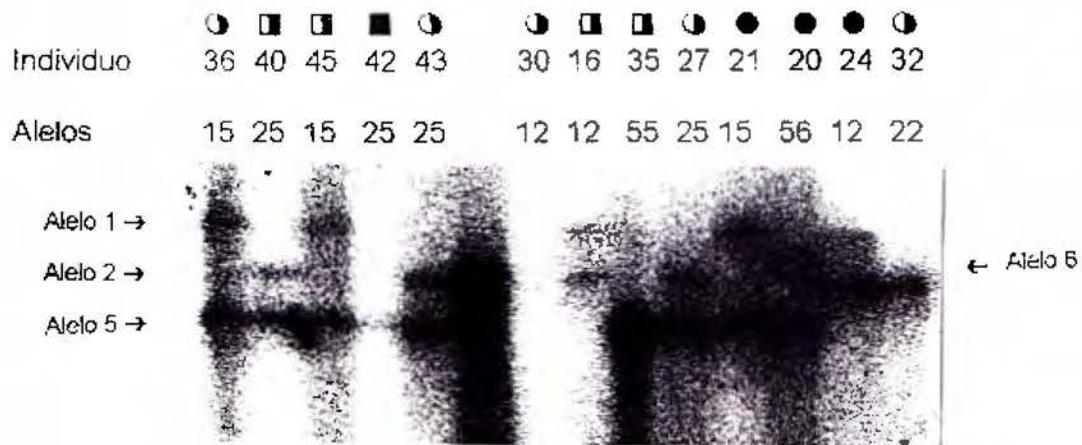
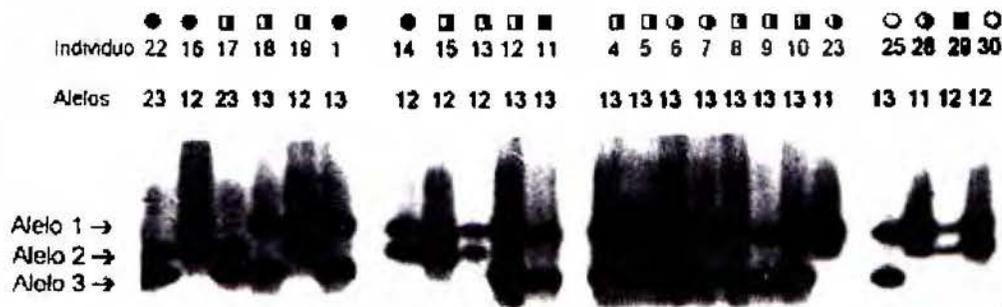


Fig. 24. Marcador MYC en la familia C1. Con este marcador se descarta al gen Myc, participante en la apoptosis ($Z(0.0) = -\infty$), aunque se obtuvo un puntaje de $Z(0.2) = 0.3050$.



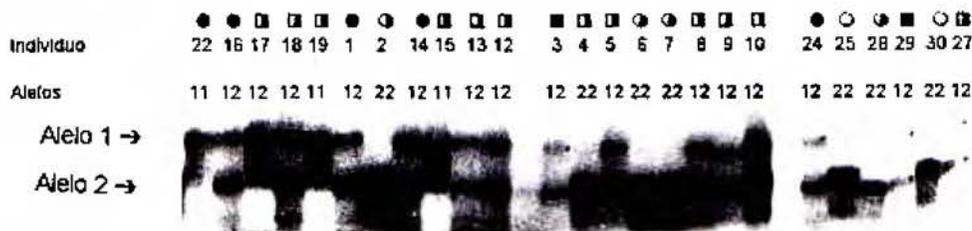
■ ● = *Hombre y mujer afectados*
 □ ○ = *Hombre y mujer portadores*

Fig. 25. Marcador PDEB en la familia C1. Con este marcador se descarta al gen de la RPAR V en esta familia ($Z(0.0) = -\infty$).



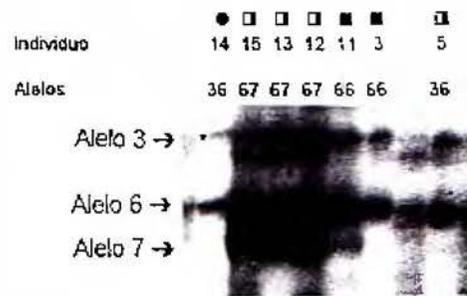
■ ● = Hombre y mujer afectados
 ■ ○ = Hombre y mujer portadores
 □ ○ = Hombre y mujer normales

Fig. 26. Marcador F13B en la familia P1. Con este marcador se obtuvo un puntaje de $Z(0.0) = -1.0099$ en esta familia.



■ ● = Hombre y mujer afectados
 ■ ○ = Hombre y mujer portadores
 ○ = Mujer normal

Fig. 27. Marcador D3s621 en la familia P1. Con este marcador se obtuvo un puntaje de $Z(0.0) = -0.4256$ en esta familia.



■ ● = Hombre y mujer afectados
 ■ ○ = Hombre y mujer portadores

Fig. 28. Marcador P1 en parte de la familia P1. Con este marcador se obtuvo un puntaje de $Z(0.1) = 0.7632$ en esta familia.

Cuadro IX. Puntajes Lod de un marcador ideal de 4 alelos que segrega con la RP, e indica el poder de las familias C1 y P1 para que en ellas se encuentre ligamiento con el gen que provoca su tipo de RPAR.

Familia / θ	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4
C1	4.5850	3.5936	2.5616	1.5154	0.5428
P1	5.2460	3.9549	2.6848	1.5234	0.5615

Los programas MLINK e ILINK (análisis de dos puntos) encontraron resultados que dan luces sobre la genética molecular de la RPAR en las familias estudiadas. El análisis de los marcadores polimórficos ha permitido descartar varios genes de interés, como responsables de la RPAR en las familias C1 y P1. Al no encontrarse ligados con la enfermedad distintos marcadores cercanos, no tuvo sentido realizar el análisis de muchos loci (Multipoint analysis) (Terwilliger y Ott, 1994), por lo que no se utilizó el CILINK.

Por tratarse de marcadores ligados a los genes candidatos, un puntaje Lod de menos infinito en cero unidades de recombinación ($Z(0.0) = -\infty$), permite considerar muy improbable que sea el causante de la patología. En la familia C1, tal es el caso de los genes de la RPAR I (F13B, $Z(0.0) = -\infty$), RPAR III (D3s621, $Z(0.0) = -\infty$), fosfodiesterasa B (PDEB, $Z(0.0) = -\infty$; D4s412, $Z(0.0) = -\infty$; D4s431, $Z(0.0) = -\infty$), RPAR VI (D6s105, $Z(0.0) = -\infty$), de la RP con fenotipo de Stargardt (D6s251, $Z(0.0)$)

= $-\infty$), de la RPAD del cromosoma 8 (D8s87, $Z(0.0) = -\infty$) y del proto-oncogen Myc (MYC, $Z(0.0) = -\infty$). Además, marcadores cercanos sugieren que el problema en esta familia no se debe a una mutación en los genes de Usher tipo 2 (C4BPA/B, $Z(0.0) = -\infty$), Usher tipo 1C (D11s875, $Z(0.0) = -\infty$), distrofia cono-bastón (IGF2R, $Z(0.0) = -\infty$) o rodopsina (D3s1309, $Z(0.0) = -\infty$; D3s1268, $Z(0.0) = -\infty$; D3s1306, $Z(0.0) = -\infty$), aunque en este último caso, el marcador más importante (RHO) no fue informativo. Debe observarse, sin embargo, que ninguno de los marcadores utilizados alcanzó un puntaje Lod de -2 , cuando las unidades de recombinación fueron mayores o iguales a 0.1 . Por su parte, el puntaje Lod con el marcador RDS, no permite descartar con certeza al gen RDS ($Z(0.0) = -0.0083$). Finalmente, se puede observar la existencia de puntajes Lod positivos con los marcadores PDEB ($Z(0.3) = 0.0329$) y D4s412 ($Z(0.3) = 0.4341$), lo que indica una leve posibilidad de que el gen responsable se encuentre cercano al gen de la fosfodiesterasa-B. De igual modo, se obtuvieron valores positivos a 0.2 unidades de recombinación del gen Myc ($Z(\theta) = 0.3050$), y a $\theta = 0.1$ del gen RDS ($Z(\theta) = 2062$) por lo que es necesario descartar estos loci con marcadores cercanos.

En cuanto a la familia P1, se descartan los siguientes genes como causantes de la RPAR: fosfodiesterasa B (PDEB, $Z(0.0) = -\infty$), RPAR VI

(D6s105, $Z(0.0) = -\infty$), periférica (RDS, $Z(0.0) = -\infty$), RPAD del cromosoma 8 (D8s87, $Z(0.0) = -\infty$), RPAD del cromosoma 7 (D7s435, $Z(0.0) = -\infty$) y Myc (MYC, $Z(0.0) = -\infty$). También se sugiere que no causan la RPAD en esta familia genes de la RPAD I (F13B, $Z(0.0) = -1.0099$), rodopsina (RHO, $Z(0.0) = -0.3485$; D3s1309, $Z(0.0) = -\infty$), RPAD III (D3s621, $Z(0.0) = -0.4256$), Usher tipo 2 (C4BPA/B, $Z(0.0) = -1.0716$) o Usher tipo 1C (D11s875, $Z(0.0) = -\infty$). No obstante, se encontraron puntajes Lod positivos en marcadores cercanos al gen de la rodopsina (RHO, $Z(0.1) = 0.3991$), periférica (RDS, $Z(0.2) = 0.3390$) y Usher tipo 1A en el cromosoma 14q (P1, $Z(\max) = 0.7647$ a $\theta = 0.09$). Hay que ponerle atención a este último caso, ya que presenta puntajes Lod positivos desde $\theta = 0$, por lo que amerita la prueba con otros marcadores cercanos.

Ahora bien, hay que tener en cuenta que todos los resultados anteriores corresponden a puntajes Lod obtenidos asumiendo igualdad en la frecuencia de los alelos del marcador, lo cual introduce un error. De hecho, al realizarse variaciones en la proporción de los alelos con el marcador Myc en la familia C1 (con 6 alelos), se puede ilustrar como los puntajes Lod pueden cambiar con variaciones en las frecuencias alélicas. Al asignar una frecuencia de 0.2 a los alelos número 4 y 6, mientras que a los alelos del 1 al 3 y 5 una frecuencia de 0.15, se obtuvo un puntaje Lod de $Z(0.1) = -0.0414$, mientras que con las

frecuencias igualadas se obtuvo un puntaje Lod de $Z(0.1) = 0.0234$. Sin embargo, en el caso del marcador RHO, el variar las frecuencias (de igualadas en 0.3) a 0.35 para el alelo 3 y 0.3 para los alelos 1 y 2, no se obtuvo diferencia en los puntajes Lod. Esto indica que al variar las frecuencias en ciertos casos no se variarán los puntajes Lod, mientras que en otros variarán poco o significativamente, por lo que los resultados anteriormente obtenidos quedan sujetos a que la frecuencia de los alelos en la población a la que pertenecen las familias se acerquen a la igualdad.

Sin dejar esto de lado, se puede afirmar que el análisis de los marcadores polimórficos no ha encontrado ninguno ligado a la RPAR en las familias C1 y P1, sino que al contrario, en la mayoría de los casos se han descartado los genes probados, y en otros existe evidencia de que no hay ligamiento. Este trabajo presenta indicios de que el problema de la RPAR en estas familias costarricenses se debe a una mutación en otro u otros genes, distintos a los que se han analizado.

DISCUSION

La RP constituye un grupo de enfermedades particularmente difícil de analizar desde la perspectiva de la genética molecular, pues el diagnóstico clínico preciso, necesario para definir su fenotipo, es costoso. Además, técnicamente se pueden presentar falsos negativos en los primeros estadios de desarrollo de la enfermedad, así como resultados falsos positivos (como se demostró en este trabajo); sumado a esto, la RP muestra heterogeneidad genética. Inclusive, como es el caso de la rodopsina, proteína codificada por un solo locus, puede originar RP con distinto patrón de herencia dependiendo de la mutación que sufra (Rosenfeld *et al.* 1992; Dryja *et al.* 1993). La RP autosómica recesiva presenta aún más complicaciones debido a heterogeneidad compuesta, mientras que también se ha reportado un caso de diferentes genes de herencia autosómica recesiva que actúa en la misma familia (van Soest *et al.* 1994). Un problema adicional para el estudio, lo constituyen los pocos casos de afectados que se dan en familias con herencia autosómica recesiva.

1. Calidad de las familias estudiadas

Aún en medio de estas dificultades, las familias C1 y P1 aquí estudiadas presentan ciertas características que permiten el análisis genético molecular, como lo son el número de afectados y de portadores obligatorios. De hecho, el análisis de ligamiento con un marcador inventado, que incluye un alelo que segrega con el gen mutado, permitió constatar que las familias C1 ($Z(0.0) = 4.59$) y P1 ($Z(0.0) = 5.25$) tienen suficiente poder de ligamiento, por lo que ambas familias son adecuadas para que en ellas se encuentre al locus responsable de su tipo de RPAR.

Además, la reconstrucción genealógica de la familia P1 que permitió el establecimiento de nexos consanguíneos, hace pensar que en esta familia un sólo gen es el causante de la RP. Además, se evidenció un alto grado de consanguinidad al obtenerse los coeficientes de endocruzamiento (F) para los descendientes en núcleos familiares con afectados y portadores, que era dos veces mayor que un cruce entre primos segundos (Cuadro IV). Esto podría facilitar el análisis, pues la participación de más de un locus podría dificultar enormemente el hallazgo de un gen por genética reversa. Aún así no es posible descartar totalmente que el problema se deba a la interacción de dos loci en las familias, que sólo en condición de heterocigosidad compuesta expresen el problema por codificar proteínas que formen complejos proteicos

entre sí, como podría ser el caso de la proteína ROM-1 y la periferina/RDS (Kajiwara *et al.* 1994).

Aunque la familia P1 tiene 13 afectados vivos y 23 portadores obligatorios, presenta dos inconvenientes: a) que no se cuenta con la información del individuo No. 213, que hubiera sido de gran utilidad para el análisis de ligamiento en el núcleo familiar que originó (el más numeroso en afectados); b) el diagnóstico clínico determinó que el individuo número 9 no padecía RP, sino una catarata congénita que había confundido el diagnóstico inicial, por lo que se eliminó como afectado al igual que a sus hermanos, los números 8 y 10, para evitar falsos positivos. Con estos tres individuos, el número de afectados vivos hubiese sido de 16. Esto reafirma la prioridad de efectuar análisis clínicos precisos antes de iniciar las pruebas moleculares, al menos el ERG en el caso de la RP. En este sentido, el problema para el presente estudio consistió en que dicha prueba sólo fue posible realizarla cuando el estudio ya había avanzado, debido a la inexistencia de un electroretinógrafo y de un operador calificado en Costa Rica durante 1993 y 1994. Además, se debieron efectuar análisis clínicos completos a todos los miembros participantes en el estudio; sin embargo, no se contó con presupuesto para hacerlo.

Por su parte, la familia C1 con 10 afectados vivos y 14 portadores obligatorios, presenta el inconveniente de que no se estableció relación genealógica entre el tronco familiar y los individuos No. 28, 16 y 13, por lo que queda una mayor probabilidad de que la heterogeneidad compuesta sea responsable del padecimiento.

Para analizar la presencia de un defecto en los diferentes loci relacionados con la RP se siguió la estrategia de utilizar marcadores polimórficos y realizar análisis de ligamiento. Esto debido a que la mayoría de los loci candidatos no corresponden a genes aislados, aunque se encuentran en sitios bien determinados. Además, esta estrategia permite un análisis más rápido de varios loci, en contraposición a la técnica del estudio de polimorfismos de conformación de ADN de cadena simple (SSCP), pues ésta requiere del análisis de cada exón (Orita *et al.* 1989). No obstante, esta técnica es más directa y segura para encontrar mutaciones, por lo que se hubiera utilizado en caso de encontrarse ligamiento, para luego seguir con la secuenciación del ADN del gen.

2. Frecuencias alélicas y de las mutaciones en RP

El análisis de ligamiento se realizó con los subprogramas MLINK e ILINK, que requieren los datos de las frecuencias alélicas del locus afectado

(alelos normal y mutado) y las frecuencias alélicas del marcador polimórfico. La veracidad en estas frecuencias es importante porque mientras menos común sea el gen mutado en la población, es menos probable que el individuo lo tenga por azar, proveniente de un ancestro no tomado en cuenta en la genealogía. El problema es que no se cuenta con datos de frecuencia del gen mutado en la población estudiada porque no hay datos de incidencia de RPAR en la población estudiada, y menos de cada subtipo de RPAR. Para hacer una estimación de la frecuencia del alelo mutado se podría considerar el promedio de incidencia de la RP en los países que cuentan con datos epidemiológicos (Cuadro I), que sería de $1/4500$, por lo que la frecuencia de todos los genes que producen RP sería $q(RP) = 0.0149$. Pero como el porcentaje de genes que podrían provocar RPAR es del 77% (uniendo RPAR y casos aislados) (Heckenlively, 1988), entonces la frecuencia de los alelos mutados que provocan RPAR sería aproximadamente de $q(RPAR) = 0.0115$. Además habría que considerar que existen varios o muchos genes que provocan RPAR, y que de los conocidos hasta ahora el mayor responsable es la PDEB con un 5% de los casos de RPAR (Cuadro III), no es poco probable que la frecuencia de un gen que provoca RPAR sea cercana a $q = 0.00115$. No obstante, para ser conservador con los cálculos se utilizó $q = 0.016903$ como frecuencia del alelo mutado, que es la frecuencia de algún alelo causante

de la RP en los Estados Unidos, asumiendo que la incidencia sea de 1:3500 (Boughman *et al.* 1982).

Por su parte, la frecuencia de los alelos en la población del Valle Central de Costa Rica, para los marcadores utilizados en este estudio, no está disponible, por lo que se optó por igualar las frecuencias, como suele realizarse: "con frecuencia los investigadores que trabajan con marcadores multialélicos con repeticiones CA, asumen para propósitos de ligamiento, que todos los alelos tienen iguales frecuencias. Esto se hace típicamente porque estos marcadores no están suficientemente caracterizados, y una frecuencia génica precisa no está disponible. Además, es frecuente que sea difícil caracterizar los alelos en una población. Por ejemplo, el alelo 1 en la familia 1 puede no corresponder al alelo 1 de la familia 2" (porque los productos pueden ser de peso molecular semejante) (Terwilliger y Ott, 1994). Al tratarse de alelos que se siguen a través de las generaciones de familias grandes, el problema al asumir frecuencias iguales no es tan serio como en casos en que se unen núcleos familiares no relacionados, pues se puede seguir la relación entre el gen mutado con un alelo dado en diversas generaciones. Además, de este modo es posible tener árboles genealógicos con varios núcleos en "fase conocida", y por tanto más informativos (Thompson *et al.* 1991). No obstante, al hacerse variaciones en las frecuencias del gen Myc se observó como los

puntajes Lod varían al cambiar levemente las frecuencias alélicas, por lo que sin duda, al desconocerse las verdaderas frecuencias de los alelos en la población, se incurre en un error.

3. Regiones genómicas analizadas

Los marcadores utilizados, repeticiones pequeñas en tandem (STRPs) o repeticiones de dinucleótidos en número variable (VNDRs), tienen la ventaja de ser muy polimórficos y de estar a disposición en el mercado a bajo costo, pero a no ser que se encuentren dentro de un gen o entre exones, se trata de un método menos seguro por la posibilidad de que haya recombinación entre el gen y el marcador. Incluso la recombinación puede ocurrir dentro del gen, variando el tamaño del fragmento amplificado. Por su posición, los siguientes marcadores son de considerable confianza: RHO, PDEB, RDS y MYC. Los demás se han encontrado ligados a las regiones de interés, pero no se encuentran dentro de los genes correspondientes.

Los análisis permitieron descartar a los genes de la fosfodiesterasa-B (RPAR V), periférica, Myc y RPAR VI como causantes de la degeneración retiniana en la familia P1. También se descartaron algunos genes involucrados en la patología de otros tipos de RP (RP1 y RP8), los cuales era razonable estudiar por tratarse de una enfermedad que ha presentado -en el caso de la

rodopsina- una proteína implicada en la RP con diferentes patrones de herencia. Existe evidencia, además, de que el gen responsable es distinto de los genes de la RPAR I, RPAR II, RPAR III y Usher tipos 1C y 2. Se obtuvieron resultados positivos para el marcador P1, cercano al gen de Usher 1A ($Z(\max) = 0.7647$, $\theta = 0.090$), por lo que es conveniente continuar los análisis cerca de este locus, a pesar de que el puntaje Lod sea poco relevante. Deben descartarse además, genes cercanos a RHO y RDS, que no sería extraño que se tratara de genes que participan en la transducción de la señal visual, y que tuvieran un origen común con los genes que codifican por estas proteínas de los fotorreceptores, por ejemplo, por recombinación desigual.

Por su parte, los datos obtenidos con el análisis de ligamiento, permitieron excluir como causantes de la RP en la familia C1 a los genes de la fosfodiesterasa-B (RPAR V) y RPAR I, III y VI, así como a los genes de Myc, RPLS y RP1. Además marcadores cercanos sugieren que la rodopsina (RPAR II) no es el gen mutado, aunque es preciso, al no ser informativo para esta familia el marcador RHO, confirmar el resultado con algún método más directo.

También hay evidencia de que los genes responsables no son el de la CRD y Usher tipos 1C y 2. Finalmente, se obtuvieron algunos valores positivos en el puntaje Lod a θ distinto de 0, en los casos de la fosfodiesterasa-B, periferina y del gen MYC, cuya proteína participa en el proceso de apoptosis.

La proteína producida por la traducción de MYC participa tanto en el desarrollo del cáncer, como en la apoptosis, mecanismo por el que mueren las células de la retina cuando hay RP. Es predecible que de haberse heredado ese gen con una mutación que predisponga a la apoptosis (y no al cáncer) la muerte celular se daría en estadios tempranos y en diversos tejidos, no sólo en la retina. Sin embargo, se probó porque podría haberse dado el caso de que por regulación, los niveles de síntesis proteica en retina fueran diferentes, y que las consecuencias de la mutación se pudieran dar a esos niveles específicamente en ese tejido. Al obtenerse un puntaje Lod positivo ($Z(0.2) = 0.3050$) para la familia C1, es necesario aumentar los estudios en sitios cercanos a este gen, aunque nuevamente el puntaje Lod sea bajo. Del mismo modo, regiones cercanas a los genes PDEB y periferina podrían estar implicadas, por lo que hay que probar -con marcadores apropiados- para descartar algún gen vecino responsable de la RP.

Finalmente, hay que señalar que las familias C1 y P1 al contar con suficiente poder de ligamiento, la información que se obtuvo con los marcadores polimórficos es confiable como indicadora de la relación entre el marcador y el gen responsable de la RPAR en las familias.

4. Alternativas para continuar el análisis

Los análisis moleculares en la búsqueda del gen causante de la RPAR en estas familias deben continuar descartando los genes que se han relacionado con algún tipo de RP, y que no han sido estudiados en este trabajo. El orden de estudio deberá ser el siguiente:

1. Descartar los genes correspondientes a los marcadores con leve puntaje Lod positivo, aumentando al máximo el número de probandos, y estudiando marcadores vecinos.
2. Descartar al gen que produce la RPAR IV, situado en 4p14-cen, el del canal catiónico dependiente de GMPc. También el locus que está ligado a la RPAR VII, que posiblemente corresponde al gen de un "zipper" de leucina específico de retina (NRL); para esto se puede utilizar el marcador D14s80.
3. Obtener un puntaje Lod inferior a -2, para los genes que no obtuvieron puntajes iguales o inferiores a ese número convencional.
4. Descartar los genes que se han relacionado con algún síndrome de herencia autosómica recesiva, pues es posible que se den algunas mutaciones que sólo perjudiquen la retina, o que estén cerca de otros genes implicados, ligados por haberse originado por el fenómeno de duplicación génica. Tal es el caso del gen que provoca la RP con síntomas de Stargardt (6q1), los distintos tipos de

Síndrome de Usher no descartados en este trabajo, y el Síndrome de Bardet-Biedl (3p).

5. Descartar otros genes relacionados con RPAD (herencia dominante), no estudiados en este trabajo, como el IDUA (4p16.3) que produce ceguera nocturna estacionaria congénita (CSNB), el que produce distrofia cono-bastón (18q21.1), RP9 (7q), Síndrome Best (11q13), y la región 17p13.1 que tiene un gen que causa RPAD.

6. Utilizar marcadores para todo el genoma, empezando por las regiones aledañas a los genes implicados con algún tipo de RP, para descartar genes del sistema visual que se encuentren cerca por duplicación, y siguiendo con las regiones del genoma ricas en CpG, por probabilidad de que ahí se encuentren los genes buscados.

Para esto se pueden escoger marcadores STRPs que tengan repeticiones de cuatro nucleótidos, con el fin de poder analizarlos más fácilmente y sin utilizar radiación, teñir con bromuro de etidio o con plata, siempre en geles de poli-acrilamida o agarosa de alta resolución (MetaPhor, FMC BioProducts). Un método más rápido, pero que requiere de equipo costoso, sería marcar a diversos imprimadores con distinta molécula fluorescente (Weber Human Screening Set, IR-labeled M13 primers, Research Genetics), y que con la ayuda de un foto-detector (LI-COR 4000S) se lean los

productos amplificados de los distintos pares de imprimadores (Brumbaugh, 1993). De este modo se podrían analizar hasta 8 marcadores por PCR.

En el caso de este tipo de enfermedad y familias, al existir un gen que es idéntico por descendencia, que es el responsable de la patología, se puede utilizar la técnica de mapeo por homocigosis ("Homozygosity Mapping", Lander y Botstein, 1987). Esta técnica se basa en que las regiones adyacentes al gen responsable de la enfermedad, al tener un mismo origen deben ser homocigotas por descendencia, por lo que se busca la homocigosis en los alelos entre los afectados.

De este modo se podrían encontrar el gen o los genes que causan la RP en estas familias, y posiblemente en muchas otras. De hecho, se han desarrollado varios métodos estadísticos para mapear enfermedades hereditarias complejas, como los métodos de división de alelos (Allele-Sharing Methods) que son no-paramétricos e intentan probar si una región es idéntica por descendencia o se trata de la misma por segregación azarosa (Lander y Schork, 1994); o bien, los estudios de asociación (Association Studies) que no necesitan del conocimiento previo de los patrones de herencia seguidos por la enfermedad, sino que son estudios de caso-control, donde se comparan individuos afectados con individuos sanos de la población (Thomson, 1995). Existen modelos que son capaces de contemplar un probable origen

multigénico de las enfermedades, cuando éstas no presentan un patrón de herencia mendeliano para un solo locus; por ejemplo, los cruces experimentales con ratones (que generalmente padecen enfermedades análogas a las humanas), que garantizan homogeneidad genética y permiten contar con una progenie numerosa (Lander & Schork, 1994).

Seguidamente se podría hacer el diagnóstico de portadores en estas familias y consejo genético, así como realizar un diagnóstico molecular más temprano y preciso y se podría ofrecer una prognosis de la enfermedad (luego de los estudios que permitan relacionar el tipo de mutación con el desarrollo de la RP). Se podría conocer a mayor profundidad la fisiopatología y se darían luces hacia una futura terapia. Finalmente, quizás pueda darse el paso hacia la terapia genética, al integrar genes sanos, ya sea dando origen a una proteína participante en el sistema visual, evitando la apoptosis prematura, u otras alternativas según sea la causa de la enfermedad.

5. Diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias en el futuro

La RP es un ejemplo de la complejidad que presenta el estudio molecular de las enfermedades hereditarias. Se trata de una patología que presenta grandes inconvenientes para su estudio, como son la existencia de diversos genes mutados que provocan los mismos síntomas, la participación

de diversas mutaciones para originar un fenotipo de RP (heterogeneidad compuesta), penetrancia incompleta en las formas dominantes, expresión tardía y variable en algunos casos, y de difícil y costoso diagnóstico clínico preciso. Pasarán todavía algunos años antes de que se encuentren los genes participantes en enfermedades no tan complicadas, para luego dar paso a los casos como el de la RP, especialmente enfermedades de herencia autosómica recesiva.

Es por esta razón que el avance en la obtención rápida de los resultados de laboratorio debe ir acompañado de la utilización de programas que contemplen una posible heterogeneidad compuesta (sistemas capaces de encontrar correlación entre dos alelos de distinto gen), que contemplen además una posible participación de diversos genes en familias con el mismo fenotipo, y aún en núcleos familiares relacionados. Por ejemplo, el programa HOMOG (Ott, 1985) ha sido utilizado para encontrar heterogeneidad genética en retinosis pigmentaria: van Soest y colaboradores (1994) determinaron que la probabilidad de heterogeneidad era de 122:1 al hacer el análisis con un locus en una gran familia de afectados.

En este tipo de enfermedades, con heterogeneidad genética, es necesario implementar un diagnóstico preciso, por lo que los sistemas de salud deberán estar en capacidad de ofrecer un diagnóstico temprano. La

identificación de síntomas en personas con baja expresividad, permitiría estudiar con mayor eficacia la genética molecular de estos tipos de patología.

6. Diagnóstico clínico

Llama la atención que se presenten en la misma familia, diferentes enfermedades visuales relativamente poco comunes, como la RP y la catarata congénita. La catarata puede deberse a malformaciones congénitas aisladas, pero podría deberse también a la existencia de un gen dañado distinto a RP en la familia P1. No es de extrañar que en una comunidad con tan alto endocruzamiento como Acosta, y en una familia con tantas uniones consanguíneas se encuentren dos genes distintos: el que provoca la RP y el que predispone a la formación de cataratas congénitas. Lo que más llama la atención es que los dos genes dañados tengan que ver con el sistema visual, y que se trate de catarata, una característica muy común en pacientes con RP.

Los estudios clínicos indican que se trata en ambos casos de RPAR tipo 1, pero características como la velocidad de la degeneración sugieren que se trata de subtipos distintos de RP. Es muy posible, dada la heterogeneidad genética que presentan las retinosis, que se trate de mutaciones distintas en un mismo gen, o de genes distintos que provocan una degeneración similar. Estas características fenotípicas confirman la necesidad de analizar

moleculamente a cada familia por separado, para evitar al máximo la heterogeneidad genética en el análisis de ligamiento. Sin duda, esta medida habrá que tomarla en otras enfermedades complejas.

7. Necesidad de conocer la epidemiología de la RP en Costa Rica

También este estudio hace evidente la enorme necesidad de conocer datos epidemiológicos de las distintas enfermedades hereditarias en Costa Rica. Solamente contando con información veraz sobre la situación de las distintas enfermedades, es posible clasificarlas adecuadamente en el orden de prioridades para ser estudiadas. Sólo así se contará, además, con datos de prevalencia e incidencia que permitan una mayor confianza en los resultados de los análisis, y es de esa forma como se pueden localizar las mejores familias para efectuar los estudios.

A continuación sugiero un modelo para realizar un estudio epidemiológico de la RP en Costa Rica. Este modelo se podría integrar a otro modelo mayor, destinado a hacer un estudio de prevalencia de distintas enfermedades hereditarias en nuestro país.

Propuesta metodológica para estudiar la prevalencia de la Retinosis

Pigmentaria en Costa Rica

1. Localizar los casos de sospechosos de padecer RP.

a) Introducir en una base de datos información de las personas que aparecen como afectadas en los archivos de:

- Ministerio de Salud
- Asociaciones de Ciegos y Discapacitados
- Consultorios médicos privados (hay 60 oftalmólogos en el país).

b) Solicitar en los Hospitales (especialmente México y de Niños) apuntar a los pacientes sospechosos de RP.

c) Entrevistar al personal de salud que labora en las Clínicas (194 en todo el país), Centros de Salud, Dispensarios médicos y a visitantes sobre su **conocimiento de personas ciegas** en las comunidades que atienden.

Especialmente, se deben estudiar las poblaciones que presentan alta consanguinidad. Estas son poblaciones prioritarias que deben ser escogidas si existen limitaciones económicas que obliguen a reducir el número de localidades estudiadas. También se puede hacer un estudio zonal, por ejemplo, del Valle Central.

d) Por radio (de audiencia urbana y rural), periódico (cartas a la columna) y televisión (noticieros), solicitar reporte a los que presentan los síntomas de la

RP, y ofrecer vitamina A en dosis adecuadas e información importante a los afectados.

e) Localizar a cada afectado (por teléfono, a través del puesto de salud o personalmente) y consultarle datos familiares, con el fin de conocer sobre otros afectados de su familia.

2. Para corroborar los síntomas de RP.

a) Llenar el formulario con los afectados que establezca:

- Ceguera nocturna
- Pérdida de visión periférica
- Si presenta otros síntomas asociados a RP.
- Si tiene datos clínicos
- Si tiene otros padecimientos físicos
- Edades de aparición de los síntomas
- Información genealógica

b) A los que tienen síntomas de RP, remitirlos a un centro donde se les realicen los siguientes exámenes:

- Electrorretinograma (prueba más importante, evalúa actividad retiniana)
- Estudio de campo visual (para corroborar pérdida de visión periférica).

- Fondo de ojo, angiografía (para observar si la retina está pigmentada y los vasos sanguíneos atenuados).
- Adaptometría (para demostrar ceguera nocturna).

3. Para clasificar los pacientes según el tipo clínico de RP, el especialista usará una clave. Este diagnóstico, junto con el tipo de herencia observado servirá para clasificar adecuadamente al paciente.

4. Estos datos permitirán hacer una ESTIMATIVA de la PREVALENCIA de la RP en Costa Rica. En el Cuadro 1, además de las tasas crudas de prevalencia de RP en varios países, puede observarse la metodología utilizada para localizar los casos.

Finalmente, las limitaciones de un estudio de prevalencia de RP se podrían resumir en las siguientes: no se va a llegar a todos los afectados porque el estudio no sería lo suficientemente grande, el sistema de salud del país no ha fijado obligatoriedad de reportar a los pacientes sospechosos de RP, los afectados que tienen parientes afectados que no les han dado ninguna esperanza no van a consultas, etc. Además de que la enfermedad de por sí tiene limitaciones para que se conozcan los que tienen genotipo RP: la penetrancia de la RPAD es 0.87 (Kaplan *et al.* 1990) y no se trata de una enfermedad congénita.

8. Mapeo genético en Costa Rica

Este trabajo es un ejemplo de la necesidad de establecer una base fundamental, sobre la cual construir el sucesivo estudio de la genética molecular de enfermedades humanas, sin el cual, los pocos recursos con que cuenta nuestro país para estas investigaciones **no van a utilizarse** del modo más adecuado. La siguiente es una lista de las **necesidades**:

1. **Primeramente** se requiere un tamizaje nacional de las enfermedades hereditarias, **sobre todo** de las más frecuentes en poblaciones con un componente caucasoide preponderante, para tener datos epidemiológicos que definan cuáles enfermedades son de mayor interés en salud pública, y para identificar familias adecuadas para los estudios.
2. Es importante un foro de discusión entre las distintas instituciones que realizan este tipo de estudios en el país, con el fin de analizar los resultados del tamizaje y comunicarse entre sí los casos de mayor interés para las distintas instituciones, y que exista oportunidad de establecer convenios e intercambiar recursos.
3. Para las enfermedades que ameriten hacer un mapeo por ligamiento genético, debería haber un banco de marcadores genéticos de todo el genoma, abastecido por las distintas instituciones interesadas en este tipo de análisis. Se deberían incluir marcadores de distintos tipos. Una compra masiva de

marcadores es la más favorable económicamente; podría ser una buena alternativa que ésta se realice por varios proyectos de distintos centros en colaboración.

4. Al demostrar el interés desde el punto de vista de la salud y de la ciencia, se establecerán convenios con el Ministerio de Salud, la Caja Costarricense de Seguro Social y otros entes gubernamentales y no gubernamentales para garantizar un diagnóstico adecuado.

5. Se requiere el establecimiento de equipos de trabajo que permitan efectuar estudios de alto nivel en:

- a) Administración de fondos
- b) Trabajo social con los afectados
- c) Análisis genealógico
- d) Diagnóstico clínico
- e) Toma de muestras
- f) Preparación de reactivos y equipo
- g) Genética molecular
- h) Procesamiento de los datos

6. Deberá crearse un comité de ética que analice las investigaciones en genética humana, y garantice el respeto a los derechos humanos de los

participantes en la investigación. Además, deberá garantizar la conveniencia social de los estudios y el manejo de los resultados de los mismos.

CONCLUSIONES

1. A las familias con RP, C1 y P1, se les determinó un patrón de herencia autosómico recesivo. Además se encontró un alto coeficiente de endocruzamiento (F) en los núcleos familiares con afectados, especialmente en el caso de la familia P1; lo cual sugiere que sólo hay un locus involucrado en la RP de esta familia.
2. En ambas familias se presenta una RPAR tipo 1 (bastón-cono) de expresión temprana, pero en la familia C1 la degeneración es más rápida que en la P1. Esto sugiere que la RP de estas familias se origina por mutaciones distintas.
3. La familia C1 presenta un poder de ligamiento (LINKAGE) de $Z(0.0) = 4.59$ y la familia P1 presenta uno de $Z(0.0) = 5.25$, como puntaje Lod máximo, obtenido con datos de un marcador inventado de cuatro alelos, uno de los cuales segrega con el gen responsable de la RPAR en la familia. Esto indica que ambas familias son apropiadas para encontrar el gen responsable de su tipo de RPAR.
4. El análisis de ligamiento basado en marcadores polimórficos (STRPs) determinó que los genes causantes de la RP en la familia C1 no son los siguientes: fosfodiesterasa-B, el causante de la RPAR I, RPARIII, RPARVI, RPLS y RP1 (RPAD del cromosoma 8). Además se sugiere la exclusión del

gen de la rodopsina, así como de los genes que provocan el Síndrome de Usher 1C, Usher 2 y el de la distrofia cono-bastón (6q).

5. El análisis de ligamiento indicó que la RPAR en la familia P1 no es originada por los siguientes genes: fosfodiesterasa-B, periferina, el de la RPAR VI, RP8 (RPAD del cromosoma 7p), RP1 (RPAD del cromosoma 8) y Myc. También se sugiere la exclusión de los genes que provocan la RPAR I, RPAR II (rodopsina), RPAR III y Usher 1C y 2.

6. Para continuar el análisis es necesario aumentar los estudios en los loci cercanos a los marcadores con ligero puntaje Lod positivo, particularmente en el caso de la familia C1 cerca de los loci PDEB y MYC; y en la familia P1 cerca de RHO, RDS y P1 (Usher 1A). Luego se deberán descartar los restantes genes que provocan RPAR y RPAD hasta ahora identificados, así como genes responsables de síndromes. Luego se deben investigar regiones cercanas a los genes hasta ahora implicados en la RP, y por último iniciar el análisis en el resto del genoma. Debe tomarse en cuenta la posibilidad de heterogeneidad compuesta, así como la posibilidad de que existan dos genes distintos que originan la RP en las familias.

7. El estudio recalca la importancia de contar con datos de prevalencia, y de tener un registro nacional de enfermedades hereditarias que permitan establecer prioridades e identificar familias con afectados.

8. Queda clara la necesidad de tener los marcadores polimórficos, programas de computación, planes de cooperación, y equipos multidisciplinarios para encontrar genes responsables de enfermedades, y así ofrecer diagnóstico molecular, identificar portadores, dar pronósticos, conocer mejor la fisiopatología y considerar la terapia genética.

LITERATURA CITADA

- Amman, F., D. Klein & A. Franceschetti. 1965. Genetic and epidemiological investigations on pigmentary degeneration of retina and allied disorders in Switzerland. *J. Neurol. Sci.* 2: 183-196.
- Bascom, R., S. Manara, L. Collins, R. Molday, V. Kalnins & R. McInnes. 1992a. Cloning of the cDNA for a novel photoreceptor membrane protein (rom-1) identifies a disk rim protein family implicated in human retinopathies. *Neuron* 8: 1171-1184.
- Bascom, R., K. Schappert & R. McInnes. 1993. Cloning of the human and murine ROM1 genes: genomic organization and sequence conservation. *Hum. Molec. Genet.* 2: 385-391.
- Bayés, M., M. Giordano, S. Balcells, D. Grinberg, L. Vilageliu, I. Martínez, C. Ayuso, J. Benitez, M. Ramos-Arroyo, P. Chivelet, T. Solans, D. Valverde, S. Amselem, M. Goossens, M. Baiget, R. González-Duarte & C. Besmond. 1995. Homozygous tandem duplication within the gene encoding the B-subunit of rod phosphodiesterase as a cause for autosomal recessive Retinitis Pigmentosa. *Human Mutation* 5: 228-234.
- Berson, E. 1993. Retinitis Pigmentosa: The Friedenwald lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34: 1656-1676.
- Berson, E., B. Rosner, M. Sandberg, K. Hayes, B. Nicholson, C. Weigel-DiFranco & W. Willett. 1993. A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for Retinitis Pigmentosa. *Arch. Ophthalmol.* 111: 761-72.
- Boughman, J., M. Conneally & W. Nance. 1980. Population genetic studies of Retinitis Pigmentosa. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 223-235.
- Boughman, J. & R. Caldwell. 1982. Genetic and clinical characterization of a survey population with Retinitis Pigmentosa. pp. 147-166. In: Cotlier, E., I. Maumenee, E. Berman (eds.). *Clinical, structural and biochemical advances in hereditary eye disorders*. Alan R. Liss, NY.

- Bruford, E., D. Mansfield, P. Teague, A. Barber, M. Fossarello & A. Wright. 1994. Genetic linkage in autosomal studies in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Am. J. Hum. Genet.* 55 (3), Sept. Supplement. Program and Abstracts Annual Meeting. Montreal. p. A181.
- Brumbaugh, J. 1993. Genome screening for disease loci using infrared fluorescence labeling of short tandem repeat polymorphisms. Human Genome Mapping Workshop, Noviembre. Kobe, Japan.
- Bundey, S. & S. Crews. 1984. A study of Retinitis Pigmentaria in the city of Birmingham. I and II. Clinical and genetic heterogeneity. *J. Med. Genet.* 21: 421-428.
- Bunker, C., E. Berson, W. Bromley, R. Haves & T. Roderick. 1984. Prevalence of Retinitis Pigmentosa in Maine. *Am. J. Ophthalmol.* 97: 357-365.
- Collins, M. & A. López. 1993. The control of apoptosis in mammalian cells. *TIBS* 18: 20-23.
- Cotran, P., G. Bruns, E. Berson & T. Dryja. 1991. Genetic analysis of patients with Retinitis Pigmentosa using a cloned cDNA probe for the human gamma subunit of cyclic GMP phosphodiesterase. *Exp. Eye Res.* 53: 557-564.
- Chang, G., Y. Hao & F. Wong. 1993. Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron* 11: 595-605.
- Daiger, S., L. Sadler & J. Rodríguez. 1993. Why do mutations in photoreceptor-specific proteins lead to retinal degeneration? In: *Controversies in Neuroscience III: Signal transduction in the retina and brain.*
- D'Amico, D. 1994. Diseases of the retina. *New Engl. J. Med.* 331: 95-106.
- Dryja, T., E. Berson, V. Rao & D. Oprian. 1993. Heterozygous missense mutation in the rhodopsin gene as a cause of congenital stationary night blindness. *Nat. Genet.* 4: 280-3.
- Farber, D., J. Heckenlively, R. Sparkes & B. Bateman. 1991. Molecular genetics of Retinitis Pigmentosa. *West. J. Med.* 155: 388-399.

- Farber, J. 1970. RP in Israel. Statistical-clinical survey (MD Thesis). Hebrew University, Jerusalem.
- Farrar, J., P. Kenna, S. Jordan, R. Kumar-Singh, M. Humphries, E. Sharp, D. Sheils & P. Humphries. 1991. A three-base-pair deletion in the peripherin-RDS gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 354: 478-480.
- Fitzgibbon, J., B. Appukuttan, S. Gayther, D. Wells, J. Delhanty & D. Hunt. 1994. Localisation of the human blue cone pigment gene to chromosome band 7q31.3-32. *Hum. Genet.* 93: 79-80.
- Fukada, Y., T. Takao, H. Ohguro, T. Toshizawa, A. Akino & Y. Shimonishi. 1990. Farnesylated Gamma subunit of photoreceptor G protein indispensable for GTP-binding. *Nature* 346: 658-660.
- Gal, A., U. Orth, W. Baehr, E. Schwinger & T. Rosenberg. 1994. Heterozygous missense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase B-subunit gene in autosomal dominant stationary night blindness. *Nat. Genet.* 7: 64-8.
- Ganong, W. 1988. *Fisiología Médica*. 11ed. El Manual Moderno. México. 692p.
- Gregory, C. & A. Bird. 1995. Cell loss in retinal dystrophies by apoptosis - death by informed consent! *Brit. J. Ophthalmol.* 79: 186-90.
- Haim, M., N. Holm & T. Rosenberg. 1992. Prevalence of retinitis pigmentosa and allied disorders in Denmark. *Acta Ophthalmol.* 70: 178-186.
- Haim, M. 1993. Retinitis pigmentosa: problems associated with genetic classification. *Clin. Genet.* 44: 62-70.
- Heckenlively, J. 1988. The diagnosis and classification of Retinitis Pigmentosa. Cap. 2, pp. 15-24. In: *Retinitis Pigmentosa*, J.B. Lippincott, Philadelphia.
- Hu, D. 1987. Prevalence and mode of inheritance of major genetic eye diseases in China. *J. Med. Genet.* 24: 584-588.
- Humphries, P., P. Kenna & G. Farrar. 1992. On the molecular genetics of Retinitis Pigmentosa. *Science* 256: 804-808.

- Kajiwara, K., E. Berson & T. Dryja. 1994. Digenic Retinitis Pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science* 264: 1604-1608.
- Kaplan, J., D. Bonneau, J. Frézal, A. Munnich & J. Dufier. 1990. Clinical and genetic heterogeneity in retinitis pigmentosa. *Hum. Genet.* 85: 635-642.
- Kumaramanickavel, G., M. Maw, M. Denton, S. John, C. Srisailapathy, U. Orth, R. Oehlmann & A. Gal. 1994. Missense rhodopsin mutation in a family with recessive Retinitis Pigmentosa. *Nat. Genet.* 8: 10-11.
- Knowles, J., Y. Shugart, P. Banerjee, C. Gilliam, C. Lewis, S. Jacobson & J. Ott. 1994. Identification of a locus, distinct from RDS-peripherin, for autosomal recessive retinitis pigmentosa on chromosome 6p. *Hum. Molec. Genet.* 3: 1401- 1403.
- Lander, E. & D. Botstein. 1987. Homozygosity mapping: A way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science* 236: 1567-70.
- Lander, E. & N. Schork. 1994. Genetic dissection of complex traits. *Science* 265: 2037-48.
- Lathrop, G., J. Lalouel & C. Julier. 1984. Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3443-3446.
- Li, T., M. Adamian, D. Roof, E. Berson, T. Dryja, B. Roessler & B. Davidson. 1994. In vivo transfer of a reporter gene to the retina mediated by an adenoviral vector. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.* 35: 2543-9.
- Li, T., W. Franson, J. Gordon, E. Berson & T. Dryja. 1995. Constitutive activation of phototransduction by K29E opsin is not a cause of photoreceptor degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3551-3555.
- Magovcevic, I., S. Weremoxicz, C. Morton, S. Fong, E. Berson & T. Dryja. 1995. Mapping of the human cone transducin alfa subunit (GNAT2) gene to 1p13 and negative mutation analysis in patients with Stargardt disease. *Genomics* 25: 288-290.
- McLaughlin, M., E. Berson, T. Dryja. 1993. Recessive mutations in the gene encoding the B-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 4: 130-4.

- McLaughlin, M., T. Ehrhart, E. Berson & T. Dryja. 1995. Mutation spectrum of the gene encoding the B subunit of rod phosphodiesterase among patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3249- 3253.
- Merbs, S. & J. Nathans. 1992. Absorption spectra of human cone pigments. *Nature* 356: 433-435.
- Molday, R. 1994. Peripherin/rds and rom-1: Molecular properties and role in photoreceptor cell degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* 13: 271-299.
- Morton, N. 1955. Sequential tests for the detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet.* 7: 277-318.
- Murakami, A., T. Yajima, H. Sakuma, M. McLaren & G. Inana. 1993. X-Arrestin: a new retinal arrestin mapping to the X chromosome. *FEBS* 334: 203-209.
- Nathans, J. 1994. In the Eye of the Beholder: Visual Pigments and Inherited Variation in Human Vision. *Cell* 78: 357-360.
- Nichols, B. 1994. Linkage Interphase for Macintosh 3.1. Molecular Ophthalmology Lab. University of Iowa. April.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2766-2770.
- Ott, J. 1985. *Analysis of Human Genetic Linkage*, Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore.
- Peláez, O., J. Sarmiento, P. Pérez, J. Rodríguez, M. Herrera, J. Fernández-Britto, N. Moreno & A. Barrientos. 1994. Experiencia cubana en la Retinosis Pigmentaria. p. 12. En: *Primer Simposio Internacional de Retinosis Pigmentaria*, La Habana, Noviembre-Diciembre.
- Peterlin, B., N. Canki-Klain, V. Morela, B. Stim, S. Rainer & V. Cerar. 1992. Prevalence of RP in Slovenia. *Clin. Genet.* 42: 122-123.

- Pittler, S., A. Lee, M. Altherr, T. Howard, M. Seldin, R. Hurwitz, J. Wasmuth & W. Baehr. 1992. Primary structure and chromosomal localization of human and mouse rod photoreceptor cGMP-gated cation channel. *J. Biol. Chem.* 267: 6257-6262.
- Riess, O., A. Noerremoele, B. Weber, M. Mussarella & M. Hayden. 1992. The search for mutations in the gene for the beta subunit of the cGMP phosphodiesterase (PDEB) in patients with autosomal recessive Retinitis Pigmentosa. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 755-762.
- Robinson, P., G. Cohen, E. Zhukovsky & D. Oprian. 1992. Constitutively active mutants of rhodopsin. *Neuron* 9: 719-725.
- Robinson, P., J. Buczylo, H. Ohguro & K. Palczewski. 1994. Opsins with mutations at the site of chromophore attachment constitutively activate transducin are not phosphorylated by rhodopsin kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5411-5415.
- Rosenfeld, P., G. Cowley, T. McGee, M. Sandberg, E. Berson & T. Dryja. 1992. A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 1: 209-212.
- Silverman, M., J. Ogilvie, J. Lett, H. Fang, M. Wu, X. Wang & M. Landgraf. 1994. Photoreceptor transplantation: potential for recovery of visual function. p. 43-59. In: *Les Séminaires ophtalmologiques d'IPSEN, tome 5, "Rétine, vieillissement et transplantation"*. Y. Christen, M. Doly & M. Droy-Lefaix (eds.), Elsevier, Paris.
- Souied, E., S. Gerber, J. Rozet, D. Bonneau, J. Dufier, I. Ghazi, N. Philip, G. Soubrane, G. Coscas, A. Munnich & J. Kaplan. 1994. Five novel missense mutations of the rhodopsin gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum. Molec. Genet.* 3: 1433-1434.
- Terwilliger, J. & J. Ott. 1994. *Handbook of Human Genetic Linkage*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. 307 p.
- Thompson, M., R. McInnes & H. Willard. 1991. *Genetics in medicine*. W.B. Saunders Co., Filadelfia. p. 183.

- Thomson, G. 1995. Mapping disease genes: family-based association studies. *Am. J. Hum. Genet.* 57: 487-498.
- van Soest, S., L. van den Born, A. Gal, J. Farrar, L. Bleeker, A. Westerveld, P. Humphries, L. Sandkuijl & A. Bergen. 1994. Assignment of a gene for autosomal recessive Retinitis Pigmentosa (RP12) to chromosome 1q31-q32.1 in an inbred and genetically heterogeneous disease population. *Genomics* 22: 499-504.
- Weissenbach, J., G. Gyapay, C. Dib, A. Vignal, J. Morissette, P. Millasseau, G. Vaysseix, M. Lathrop. 1992. A second generation linkage map of the human genome. *Nature* 359: 794-801.
- William, T & B. Baker. 1980. The effects of constant light on visual processes. *Plenum, New York.* p. 3-159.
- Willis, W. 1992. The Visual System. En: Berne, R. & M. Levy (eds.). *Physiology.* Mosby Year Book, St. Louis. 1071 p.
- Winderickx, J., D. Lindsey, E. Sanocki, D. Teller, A. Motulsky & S. Deeb. 1992. Polymorphism in red photopigment underlies variation in colour matching. *Nature* 356: 431-433.
- Wright, S. 1922. Coefficients of inbreeding and relationship. *Amer. Natur.* 56: 330-338.
- Zumbado, A.L. 1989. La consanguinidad en Costa Rica. Tesis de Maestria. Universidad de Costa Rica, San José. p. 30.

APÉNDICE I

LISTA DE FAMILIAS CON UNO O MÁS MIEMBROS AFECTADOS CON RETINOSIS PIGMENTARIA & SU LUGAR DE RESIDENCIA

Acuña Venegas (-.)
 Acuña Pascua (-.)
 Acuña Solera (-.)
 Argüello Zúñiga (Río Azul)
 Arias -. (Cedros)
 Arias Acuña (Juan Viñas)
 Arias Herrera (Heredia)
 Arias Monge (-.)
 Arias Obando (Escazú)
 Arias Rojas (Tibás)
 Arias Solera (-.)
 Ávila Martínez (Alajuelita)
 Badilla Madriz (Desamparados)
 Barboza Borbón (Guadalupe)
 Barrionuevo Rojas (La Uruca)
 Blanco Soto (Curridabat)
 Camacho Chacón (Coronado) °
 Campos Portuguez (Paso Ancho)
 Castillo Durán (Barrio Cuba)
 Carboni Blanco (Fco. Peralta)
 Cardona Casco (San José)
 Castillo Durán (Barrio Cuba)
 Castro Montero (-.)
 Cene Campos (-.)
 Chacón Chacón (Santo Domingo)
 Durán Mora (Barrio México)
 Esquivel -. (San Carlos)
 Esquivel Rodríguez (-.)
 Fallas Serrano (-.)
 Gamboa Mora (San José)
 Garita Castillo (Alajuela)
 Garita Zúñiga (-.)
 González Salazar (Coto Brus)
 Hernández Hernández (Moravia)
 Hernández Cedeño (Grecia)
 Herrera Chaves (-.)
 Hidalgo Umaña (Moravia)
 Jiménez Fernández (San Ramón)

Madriz Mejías (Alajuelita)
 Molina Araya (Turrialba)
 Murillo Murillo (San Pedro, Poás)
 Pererira Morales (Paso Ancho)
 Petersen Gutiérrez (Turrialba)
 Pérez Granados (Río Frío)
 Piedra Miranda (San Carlos)^o
 Pinado Campos (Coto Brus)
 Portuguez Sandoval (Poás, Heredia, Cartago, etc.)
 Portuguez Vargas (Paso Ancho)
 Prado Quesada (Guadalupe)
 Quesada Aguilar (Grecia)
 Quesada Betta (San Pedro)
 Quesada Campos (Pavas)^o
 Quesada Ortiz (Juan Viñas)
 Quesada Rodríguez (Grecia)
 Ramírez Cordero (Cartago)
 Rodríguez Chavarría (Pavas)
 Rodríguez Murillo (Belén)
 Solera Valverde (-.)
 Thames M. (Desamparados)
 Troyo Quesada (Pavas)
 Valerio Ramírez (Guayabo de Mora)
 Valverde Fallas (Desamparados)
 Valverde Hernández (Puriscal)
 Valverde Quesada (-.)
 Vargas -. (Alfaro Ruíz)
 Vargas Lara (La Guácima)
 Vindas Prado (Acosta)^o

Notas:

1. Las familias que se han emparentado con otras, aparecen unidas en una sola.
2. Cuando no se especifica el lugar de residencia, es porque no se ha logrado aún el contacto con esas familias.
3. Señaladas con un ^o están las familias que por su patrón de herencia & número de afectados, fueron escogidas para la primera fase del estudio.

APÉNDICE II

FÓRMULA DE CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACIÓN

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN SALUD (INISA)
SECCION DE GENETICA HUMANA

PROYECTO "DIAGNOSTICO MOLECULAR DE LA RETINOSIS
PIGMENTARIA AUTOSOMICA RECESIVA"

CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACION EN INVESTIGACION

Este proyecto tiene como objetivo encontrar las causas genéticas de la Retinosis Pigmentaria en algunas familias costarricenses. El conocimiento de estas causas aumentará la comprensión de esta enfermedad, lo que podría dar luces para una futura terapia efectiva.

En esta investigación participan el Dr. Ramiro Barrantes Mesén, el M.Sc. Gustavo Gutiérrez Espeleta, el Br. Alejandro Leal Esquivel & el Dr. Vladimir Carazo, & está aprobada por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

Para encontrar el gen que está alterado en los afectados con Retinosis Pigmentaria, es necesario hacer pruebas con ADN, que es extraído de una pequeña cantidad de sangre de personas afectadas & no afectadas. Con 10 mL de sangre, extraída con la mayor higiene, es posible contribuir con el

avance en el conocimiento de esta enfermedad. Además, deben hacerse unas preguntas personales, clínicas & familiares, & se anotarán las respuestas en un documento estrictamente confidencial.

Ciertamente, no se puede ofrecer un beneficio directo a las familias que colaboren con esta investigación, pero el avance en este campo podría prevenir la aparición de este tipo de Retinosis & ayudar a afectados en el futuro.

Si usted firma esta hoja de consentimiento, estará contribuyendo con el esclarecimiento de las causas de uno de los problemas hereditarios que más afectan a los costarricenses.

Podrá preguntar a los científicos encargados de esta investigación en relación con el progreso de los estudios, & resolver con ellos cualquier duda.

Nombre de persona que colabora: _____

Cédula: _____

Firma de la persona que colabora: _____

Firma de un familiar responsable: _____

(Si la persona no puede firmar o es menor de edad)

Parentesco: _____ Cédula: _____

Firma del investigador: _____

Fecha: _____

Sello del INISA

APENDICE III**DATOS QUE CONFORMAN EL EXPEDIENTE DE LOS PACIENTES**

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
 INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN SALUD (INISA)
 SECCIÓN DE GENÉTICA HUMANA

EXP. No.

PROYECTO "DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA RETINOSIS
 PIGMENTARIA"

REGISTRO DE DATOS PERSONALES CLINICOS & FAMILIARES
 (INFORMACIÓN CONFIDENCIAL)

FAMILIA: _____ CÓDIGO: _____ FECHA: _____

I. DATOS PERSONALES

Nombre: _____ 1 Apellido: _____

2 Apellido: _____ Cédula: _____

Conocido como: _____ No. asegurado: _____

Sexo: ___ Rasgos: ___ C ___ A ___ N ___ O, Otro: _____

Fecha/nacimiento: _____ Hospital/nacim: _____

Dirección: _____

Distrito: _____ Cantón: _____ Provincia: _____

Teléfono: _____ Apartado postal: _____

Trabajo: _____ Teléfono: _____

Estado civil: _____ Fecha de unión con cónyuge actual: _____

Anteriores uniones: No__ No sabe__ Sí__ Fechas: _____

SI ES OTRA PERSONA LA QUE BRINDA LA INFORMACIÓN:

Nombre & apellidos: _____

Relación: _____ Teléfono: _____

Dirección: _____

II. HISTORIAL CLÍNICO

¿Tiene degeneración de la retina? No__ No sabe__ Sí__

Fuentes: _____

Tipo de degeneración de la retina:

__ Retinosis Pigmentaria

__ Coroideremia

__ Retinitis Punctata
Albescens

__ Ceguera nocturna
congénita estacionaria

__ Enfermedad de Goldmann-
Favre

__ Síndrome de Usher Tipo I

__ Enfermedad de Stargardt

__ Síndrome de Usher Tipo II

__ Amaurosis de Leber

__ Síndrome de Laurence-Moon

__ Degeneración macular

__ Síndrome de Senior-Loken

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> RP Atípica | <input type="checkbox"/> Síndrome de Bardet-Biedl |
| <input type="checkbox"/> Distrofia de conos | <input type="checkbox"/> Bassen-Kornzweig |
| <input type="checkbox"/> Distrofia viteliforme | <input type="checkbox"/> Refsum |
| <input type="checkbox"/> Distrofia de Sorsby | <input type="checkbox"/> Otro: _____ |
| <input type="checkbox"/> Atrofia giratoria | <input type="checkbox"/> Desconocido |

Motivo del diagnóstico: _____

Número de expediente: _____

Edad a la que se le diagnosticó: _____

Centro médico: _____

Nombre de quién diagnosticó: _____

Oftalmólogo (M.D.) Optometrista (O.D.)

Otro: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Prueba realizada	Fecha	Médico o Técnico	Resultado	Copia/Dx
Estado refractivo				
Electrorretinograma				
Fondo de ojo				
Campo visual				
Motilidad ocular				
Otra: _____				

HISTORIA OCULAR

Padecimiento	Izquierdo	Derecho	Año/inicio	Progresión
Ceguera nocturna				
Pérdida de visión periférica				
Pérdida de visión de lectura				
Dificultad en visión de cerca				
Dificultad en visión de largo				
Catarata				

Glaucoma

Desprendimiento
de la retina

Alteraciones en
el humor vítreo

Otro: _____

Cirugía ocular: ___ No ___ Sí Motivo: _____

Agudeza visual actual

Sin lentes: Ojo izquierdo ___/___ Ojo derecho ___/___

Con lentes: Ojo izquierdo ___/___ Ojo derecho ___/___

Fuente: _____

Pérdida auditiva

___ No ___ No sabe ___ Sí: Edad de inicio: ___

___ Profunda ___ Moderada ___ Progresiva

___ Bilateral ___ Unilateral: Oído _____

Fuente: _____

Otros problemas médicos Sí No No sabe Especificar Atención

Médica

Otra enfermedad hereditaria

Retardo mental

Sistema nervioso

Sistema digestivo

Sistema cardiovascular

Piel

Sangre

Músculos

Enfermedades venéreas

Resfríos frecuentes

Otro: _____

SUSTANCIAS INGERIDAS & TRATAMIENTOS DE LA PERSONA:

Tratamiento o sustancia	Nombre	Recetó	Fuente	Tomado Desde Hasta
----------------------------	--------	--------	--------	-----------------------

Para la presión

Cloroquina

Melaryl

Para la tiroides

Anticonceptivos

Esterilización

Tranquilizantes

Retinoide

Vitaminas

Homeopatía

Hierbas naturales

Otro: _____

TRATAMIENTO PARA LA RETINA	SÍ	No	Fuente	Tomado Desde Hasta	Comentarios
-------------------------------	----	----	--------	-----------------------	-------------

DMSO

Deprivación-luz

Ruso - ENCAD

Extracto-placenta

Inmunoterapia

Cubano

Homeopatía

Medicina natural

Otro: _____

III. GENEALOGÍA & HERENCIA

ÁRBOL GENEALÓGICO Código: _____

Considerar: fechas de nacimiento (aprox.), procedencias, hijos de otras uniones, hijos fallecidos, abortos espontáneos, pseudonombres, preguntar si son padres biológicos, año & tipo de unión, ocupación, padecimientos.

PATRÓN DE HERENCIA	Evidente	Candidato	Descartado
--------------------	----------	-----------	------------

Autosómica Recesiva

Autosómica Dominante

Ligada al X Recesiva

Ligada al X Dominante

Mitocondrial

Hombres de una generación
sin antecedentes

Caso aislado

EN CASO DE SER RP AUTOSÓMICA RECESIVA:

Tipo de ARRP	Evidente	Candidato	Descartado
--------------	----------	-----------	------------

DISTROFIA BASTÓN-CONO:

Aparición temprana, forma severa

Aparición tardía, forma moderada

DISTROFIA CONO-BASTÓN

OTRO: _____

Comentarios: _____

Próximos contactos: