



# UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

Facultad de Medicina – Doctor en Medicina

Ciclo de Metodología Científica II, 2015

## Revisión bibliográfica

Aplicación de terapia génica en  
pacientes con amaurosis congénita  
de Leber en el período 2009 a 2015

### Grupo 76

Anna Alcántara

Sintia Espino

Mateo Godoy

Lucía Menendez

Tutora: Dra. María Gabriela Kramer

## INDICE

1. Resumen.....	Pag. 3
2. Introducción.....	Pag. 4
3. Objetivos.....	Pag.6
4. Metodología.....	Pag. 7
5. Marco teórico.....	Pag.8
5.1 Terapia génica. Generalidades.....	Pag.8
5.2 Anatomía y Fisiología de la visión.....	Pag.11
5.3 Amaurosis congénita de Leber.....	Pag.13
6. Ensayos pre-clínicos de terapia génica para LCA.....	Pag.14
6.1 Modelos murinos.....	Pag.14
6.2 Modelos caninos.....	Pag.16
7. Etapa clínica.....	Pag.17
8. Conclusión.....	Pag.22
9. Abreviaciones.....	Pag.23
10. Bibliografía.....	Pag.24

## RESUMEN

La terapia génica actualmente se tiene en cuenta como una herramienta fundamental en el uso terapéutico de patologías congénitas, ya que en muchas de estas se han conseguido resultados esperanzadores en lo que respecta a la historia natural de la enfermedad.

Actualmente los virus constituyen la forma más eficaz de transferir genes terapéuticos al interior de las células diana y son los vectores más utilizados en ensayos clínicos de terapia génica.

Una de las enfermedades en la cual se está trabajando fehacientemente con este tipo de terapia, es la amaurosis congénita de Leber, la cual es una patología autosómica recesiva que afecta a varios genes, caracterizándose clínicamente por una disminución de la visión desde el nacimiento por afectación de los conos y bastones de la retina. El objetivo de las investigaciones que se han realizado, ha consistido en la sustitución del gen RPE 65 mediante la utilización del virus adenoasociado, lo cual ha alcanzado grandes avances en cuanto al tratamiento, si bien no se ha logrado aún la remisión completa de la enfermedad.

Los ensayos clínicos actuales están muy cercanos a lograr mejorías totales y a largo plazo.

En cuanto a los ensayos preclínicos, muchos de ellos han demostrado resultados favorables tanto en roedores como en caninos. Como complemento a esto, ensayos recientes demostraron que los roedores que padecían amaurosis congénita de Leber recuperaron por completo la función visual.

En cuanto a los ensayos clínicos, también han logrado grandes avances, donde tres hombres comenzaron con una visión bulto.

Estos resultados constituyen un gran avance para el área clínica, puesto que cada vez hay más convicción de que las personas que sufren amaurosis congénita de Leber puedan recuperar por completo su visión.

*Palabras claves: terapia génica, amaurosis congénita de Leber, vectores, enfermedades monogénicas, mutación de RPE20/RPE65, estudios preclínicos y clínicos.*

## INTRODUCCIÓN

La presente revisión resume los datos bibliográficos encontrados sobre la aplicación de la terapia génica para el tratamiento de la amaurosis congénita de Leber (ACL). La ACL es una patología autosómica recesiva que resulta en un tipo de ceguera congénita, con una prevalencia de 10 a 18% de los casos de ceguera congénita, siendo éste un porcentaje relevante (1) por lo que parece oportuno focalizarse en esta enfermedad, para ejemplificar los avances de la terapia génica en la actualidad. La decisión de trabajar esta temática radica en la gran importancia de las terapias génicas en el ámbito médico-científico global, en contraste con un escaso conocimiento de las mismas por parte del médico clínico en el sistema de salud de nuestro país. Se eligió la ACL por ser una de las enfermedades congénitas con mayores avances en investigación en terapia génica, teniendo ensayos clínicos en fase II y III en curso (2)

La terapia génica consiste en la transferencia de material genético - ADN o ARN - a células somáticas del organismo con un fin terapéutico. Esta modalidad terapéutica está en auge en la actualidad, ya que fue impulsado por el proyecto genoma humano (2003), pudiéndose facilitar la identificación de genes responsables de diferentes enfermedades. Con ello fue posible el desarrollo de numerosos tratamientos génicos potencialmente curativos para enfermedades monogénicas desde hace ya varias décadas.

Entre las enfermedades que primero se consideraron para su tratamiento con terapia génica, destacan las inmunodeficiencias severas combinadas (SCID) asociadas a mutaciones en los genes adenosina deaminasa (ADA). La ausencia de ADA implica una acumulación del sustratos que resultan tóxicos para los linfocitos T. Ésta fue una de las primeras patologías en ser tratadas mediante terapia génica con vectores retrovirales, teniendo por objetivo la transferencia del gen ADA en las células madre hematopoyéticas que dan origen a los linfocitos T de los pacientes. Los mejores resultados se han obtenido extrayendo células de la médula ósea de los pacientes, purificando las células CD34+, a las que se les introdujo el gen ADA con los vectores terapéuticos correspondientes; finalmente teniendo las células corregidas genéticamente, fueron infundidas en los pacientes. En todos los casos se comprobó la presencia de células corregidas genéticamente en las células de la sangre de los pacientes. La gran mayoría de ellos mostraron beneficios clínicos incuestionables, sin que en ningún caso se produjeran efectos adversos graves. Este protocolo constituye uno de los ejemplos más significativos de la eficacia y la seguridad que la terapia génica puede ofrecer a pacientes con enfermedades monogénicas (3).

Otros ensayos de terapia génica exitosos fueron para el tratamiento de pacientes con deficiencia genética en la proteína Lipoprotein lipasa (LPL). En estos pacientes el gen que

codifica la LPL tiene mutaciones que hacen que la proteína no sea funcional, y las personas afectadas tienen hipertrigliceridemia, xantomias y pancreatitis a repetición.(4)

En noviembre del 2012, el medicamento Glybera recibió la aprobación en Europa para el tratamiento de la deficiencia de la lipoproteína lipasa (LPLD). Glybera es un medicamento de terapia génica que contiene el principio activo alipogén tiparvovec (una variante del gen de la lipoproteína lipasa (LPL) humana, LPLS447X) y el vector que transportará este gen a las células musculares está formado por una cubierta proteínica derivada del virus adenoasociado de serotipo 1 (AAV1), el promotor del citomegalovirus (CMV), un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota y repeticiones terminales invertidas derivadas del AAV2. Se inyecta en una sola serie en los músculos de las extremidades inferiores, desde donde pasa al interior de los miocitos. Los elementos del vector se eligieron de forma que se promoviera la expresión del gen LPLS447X; al apropiarse de la maquinaria de expresión de la célula y los miocitos elaboran el producto proteico LPLS447X sin que el vector tenga capacidad para reproducirse por sí mismo. Glybera se ha estudiado en 27 pacientes con deficiencia de lipoproteína lipasa que seguían una dieta baja en grasas. La mayoría de los pacientes tratados con Glybera también recibió tratamiento inmunosupresor. Solo debe emplearse en los pacientes cuya enfermedad ha sido confirmada mediante las pruebas genéticas pertinentes y que presentan concentraciones detectables de la enzima lipoproteína lipasa en sangre. (5)

Estos resultados son relevantes para inferir la utilización de terapia génica en la ACL. La amaurosis congénita de Leber fue descrita por primera vez por el oftalmólogo Theodore Leber en 1869 en pacientes jóvenes con disminución de la visión.(6) Esta revisión tiene el propósito de demostrar la importancia del uso de las terapias génicas en diferentes patologías hereditarias, puesto que gran parte de las mismas representan la única opción terapéutica. Más específicamente en este trabajo se realizará una búsqueda bibliográfica exhaustiva sobre el uso de terapias génicas dirigidas al tratamiento de la ACL.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Exponer la aplicabilidad de terapias génicas en el tratamiento de las enfermedades hereditarias, focalizándose en la ACL.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Definir la terapia génica, exponiendo los conceptos básicos para su comprensión.
- Describir patología y terapéutica paliativa actual de la ACL.
- Realizar una reseña sobre los ensayos preclínicos de terapia génica para el tratamiento de la ACL.
- Exhibir ensayos clínicos que actualmente se encuentran en curso sobre la terapia génica de la ACL.
- Aplicar los conocimientos interiorizados durante el curso de metodología científica I y II en la realización de esta monografía.
- Fomentar la práctica armónica del trabajo grupal en el desarrollo de este trabajo bibliográfico.

## **METODOLOGÍA**

Se realizará una revisión bibliográfica consultando distintas bases de datos como PubMed, Timbó, Scielo, Elsevier, Cochrane y se tendrán en cuenta principalmente los artículos encontrados desde el año 2009 hasta el año 2015. Las palabras claves que se utilizaran son: gene therapy, Leber Congenital Amaurosis, vectors, monogenic disease, RPE20/RPE65 mutation, pre-clinical and clinical trials.

La información recaudada será sometida a un análisis exhaustivo por parte de los integrantes del grupo, guiados por la tutora utilizando las herramientas adquiridas durante el desarrollo del curso.

## MARCO TEÓRICO

En la presente revisión se realizará una introducción a la terapia génica, continuando con una mención sobre los procesos fisiológicos generales del ciclo visual y todos los aspectos referentes a la amaurosis congénita de Leber, realizando hincapié en el tratamiento experimental mediante terapia génica.

### Terapia Génica: Generalidades

Se define como terapia génica a “*la introducción de material genético en las células del organismo, mediante el uso de diversos vectores para modificar el repertorio genético celular y curar enfermedades de origen hereditario o adquirido*” (7). Actualmente éste es un campo que se encuentra en pleno desarrollo, ya que cada vez son más sus posibles aplicaciones terapéuticas, sobre enfermedades antes sin tratamiento. Es importante comprender las modalidades de las terapias génicas para así poder razonar claramente la aplicabilidad de las mismas en patologías con escasas o nulas opciones terapéuticas.

Se puede distinguir dos situaciones de terapia génica según la célula diana del tratamiento. Una de ellas está dirigida a las células somáticas y es la más utilizada actualmente, y la otra está dirigida a las células germinales, lo que conlleva múltiples consideraciones bioéticas y por lo tanto la investigación está más acotada. Se consideran a su vez dos tipos de terapia génica, las llamadas *in-vivo* y *ex-vivo*. En la primera, el material genético se introduce directamente en las células diana del organismo, mientras que en las terapias *ex-vivo*, se extraen las células diana de un individuo, se cultivan y se le transfiere el gen, posteriormente. Si es posible se seleccionan las células modificadas y se las implanta nuevamente en el individuo, ya sea en el órgano o tejido afectado o en la circulación sanguínea. La principal desventaja de este método, es que algunos tejidos no crecen en medios de cultivo, y la gran manipulación que traen aparejadas estos procesos hace que las posibilidades de contaminación sean aún mayores. Sin embargo, para algunas situaciones clínicas, esta sería la única opción terapéutica efectiva.

Una vez que la transferencia génica se lleva a cabo correctamente, el material genético introducido en la célula puede acoplarse correctamente al genoma celular, formando parte de los cromosomas, o puede quedar formando estructuras llamadas episomas. “*Un episoma es un elemento genético extracromosomal.*” (8). Los genes integrados al cromosoma tienen como ventaja que se pueden seguir segregando a las células hijas durante la replicación del ADN celular y mitosis. Sin embargo, si la integración de estos genes ocurre en la heterocromatina celular puede conllevar a su silenciamiento a corto plazo. Por otro lado, la integración de vectores en el genoma celular puede activar oncogenes específicos, causando así una división

celular desmedida y activando procesos neoplásicos. Este problema se podría anticipar y corregir en los experimentos *ex-vivo*, ya que las células que no cumplan con las condiciones apropiadas, podrían ser seleccionadas y eliminadas antes de ser administradas en el organismo.

Algunos sistemas de transferencia génica están diseñados para transferir genes en células donde pueden quedar como elementos extracromosómicos (episomas) y tener una expresión elevada. En el caso que las células se estén dividiendo activamente, como el gen introducido no se segrega a las células hijas, la expresión a largo plazo puede ir disminuyendo y harían falta tratamientos repetidos con sistema que porta el gen terapéutico.

Sin embargo, en algunos casos puede que no haga falta una expresión estable a largo plazo. Por ejemplo, las terapias génicas contra el cáncer suelen implicar la transferencia y expresión de genes a células cancerosas con la intención de eliminarlas, por lo que una vez eliminado el tumor, el gen terapéutico no sería necesario.

La transferencia del gen a la célula se puede llevar a cabo mediante los llamados métodos físico-químicos, o mediante los vectores virales. Los métodos de transferencia génica físico-químicos implica que el gen terapéutico se inserte en un plásmido (molécula de ADN que puede ser mantenida de manera episómica) y éste se transfiera a las células utilizando la microinyección, la electroporación, la utilización de micro partículas de oro recubiertas de ADN, los liposomas o estructuras lipo-proteicas, que se asocian al plásmido. Estos métodos presentan grandes ventajas: son sencillos de preparar, lo cual permite su producción de forma industrial, admiten la transferencia de cantidades suficientes de ADN, en general son poco tóxicos y poco inmunogénicos. Los inconvenientes incluyen su baja eficacia de transferencia (transfección) a las células diana, y al no integrarse en el genoma, no garantizan la expresión a largo plazo en células que tengan alta tasa de división.

Actualmente los virus constituyen la forma más eficaz de transferir genes terapéuticos al interior de las células diana y son los vectores más utilizados en ensayos clínicos de terapia génica. Los virus se componen de ácidos nucleicos (ADN o ARN) encapsulados en envolturas proteicas (y a veces también lipídicas) que los protegen y les permiten entrar en las células por endocitosis mediada por receptor u otros mecanismos. Es posible alterar el genoma de los virus para incorporar un gen terapéutico. Una vez en el interior de la célula, la información contenida en el gen terapéutico se expresa aprovechando el conjunto de enzimas celulares necesarias para la transcripción del gen y síntesis de proteínas. Para el tratamiento de enfermedades monogénicas, en general se utilizan vectores virales que no se replican en la célula y que pueden integrar su genoma al cromosoma celular. Estos vectores virales se obtienen por eliminación de genes responsables de su replicación y virulencia sustitución por el gen terapéutico, de esta forma el nuevo virus mantiene la capacidad de infectar las células pero es incapaz de multiplicarse en ellas. Así, un virus puede ser transformado mediante técnicas de ingeniería genética en un vector recombinante seguro. Los vectores virales constituyen los sistemas más

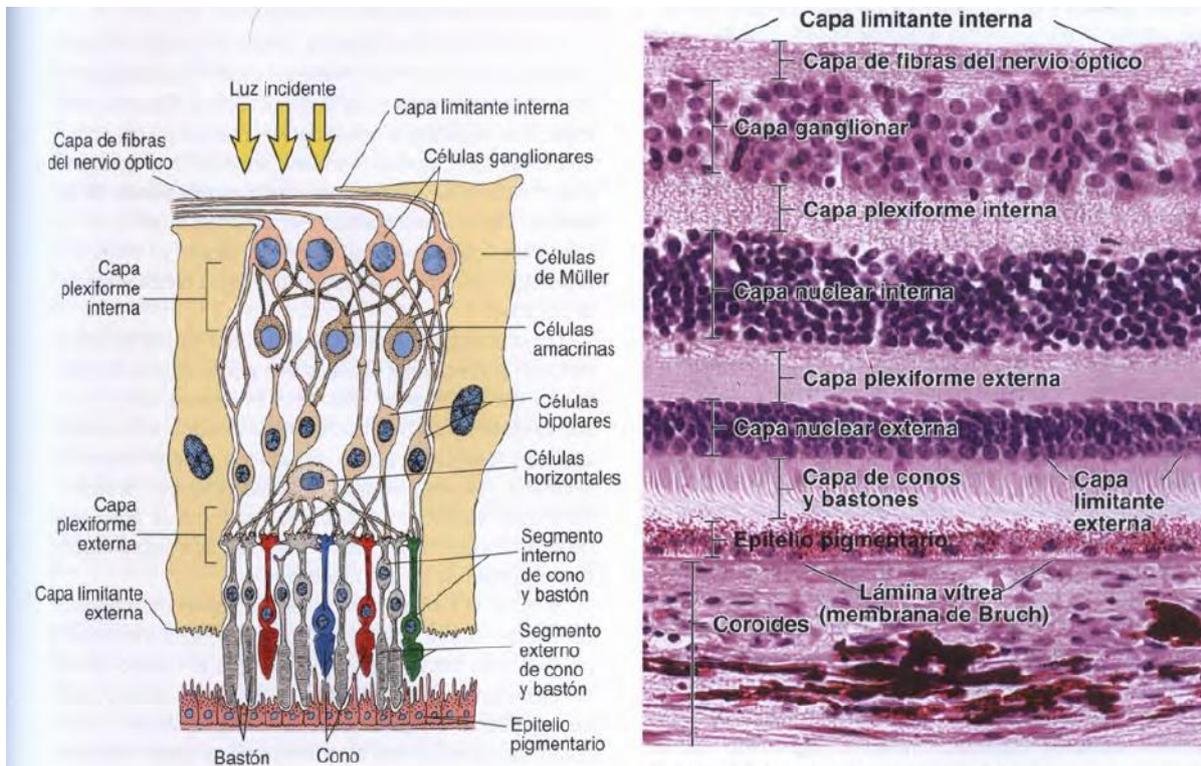
eficaces para transferir genes, ya que son capaces de infectar una elevada proporción de las células diana y poseen una elevada eficacia de transducción génica. De todas formas existen algunas limitaciones en el uso de los virus, derivado de la expresión de secuencias virales, por lo que la seguridad en el empleo de los vectores virales constituye una importante preocupación debido a que se puede producir una transferencia involuntaria del virus nativo patógeno, o bien porque pueda activarse un oncogén debido a la posibilidad de mutagénesis insercional al insertarse el genoma del virus en el genoma del huésped. Otro punto a destacar es que mediante el uso de éste tipo de terapia se pueden generar reacciones inflamatorias en el huésped, que pueden llevar a la destrucción de las células transducidas con el material genético. Para contrarrestar esta reacción inmune se intenta eliminar el mayor número posible de genes virales del vector con el fin de obtener una expresión más estable del gen terapéutico. Los virus más utilizados para generar vectores son el adenovirus, el virus adenoasociado, virus vaccinia, herpesvirus y retrovirus. Los adenovirus pueden transportar genes de gran tamaño, también tienen una gran eficacia en la transducción, incluso de células que no están proliferando. Además, se ha demostrado que es un virus que no potencia ningún oncogen. En cuanto a los virus adenoasociados, se utilizan mucho, porque a diferencia del primero genera una baja respuesta inmunitaria, sin embargo, sólo admite genes de pequeño tamaño en su genoma. En el caso del herpes virus, el mismo es portador de un genoma muy grande y por lo tanto permite su manipulación con genes de gran tamaño. Este vector es muy utilizado en las enfermedades neurológicas, ya que tiene tropismo por células neuronales y puede mantenerse de forma episómica en varios tipos celulares, haciéndolo ideal para terapias a largo plazo en células de baja tasa de división. En cuanto al retrovirus existen varios tipos, pero los más utilizados en terapia génica derivan del virus de la leucemia murina (Moloney Leukemia Virus, MLV, género Gammaretrovirus) y los derivados del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1, género Lentivirus). Los retrovirus son utilizados porque se integran en el genoma celular y así permiten la expresión de genes terapéuticos a largo plazo en células en división y además no inducen inmunidad. A diferencia de MLV, los lentivirus presentan la particularidad de no necesitar división celular para su integración y, por ello, resultan más útiles cuando la célula diana a modificar no se halla en un estado activo de división. En cuanto al virus vaccinia es un buen candidato para terapia génica debido a que infecta a una gran variedad de células y se pueden producir altos títulos virales con relativa facilidad. Este vector ha sido usado con éxito en experimentos para el tratamiento de melanomas y cáncer de colon.

Otro tipo de terapéutica a la cual se puede llegar mediante el uso de terapias génicas, es la terapia antisentido, en la cual se busca interferir con la síntesis de proteínas a nivel de la transcripción y/o de la traducción. Actualmente existen tres tipos de terapias antisentido: las secuencias de ADN antisentido, las secuencias de ARN interferente y las ribozimas. En las primeras, el pequeño oligonucleótido se une por complementariedad de bases al pre ARNm o

directamente al ARNm mediante puentes de hidrógenos. El ARN interferente se une a una secuencia complementaria del ARNm e induce su degradación mediado por RNAsas celulares. Por último, las ribozimas son secuencias de ARN catalíticos que hidrolizan al ARNm.(9)(10)

### **Anatomía y Fisiología de la Vía Visual**

La retina es la capa más interna del globo ocular encontrándose en íntima relación con el humor vítreo por su sector interno y con la coroides por su sector externo. Está compuesta por dos sectores independientes por su diferente origen embrionario, pero complementarios en el ciclo visual; estos sectores son el epitelio pigmentario y la *pars nervosa* retiniana. El epitelio pigmentario se encuentra apoyado sobre la coroides formando la capa número uno de la retina, encargada de absorber el excedente de luz, para así evitar el reflejo de los haces luminosos con el resto de las estructuras oculares, también tiene una función de fagocitosis de los segmentos externos de los conos y bastones entre otras(11)(12). Luego en dirección interna se encuentran las nueve capas restantes de la retina: la capa de conos y bastones, limitante externa, nuclear externa, plexiforme externa, nuclear interna, plexiforme interna, capa ganglionar, capa de las fibras del nervio óptico y plexiforme interna en contacto con el humor vítreo (Figura 1). El haz de luz entra por la pupila pasa por el cristalino y se dirige hacia el cuerpo vítreo y de allí atraviesa todo el espesor de la retina hasta el epitelio pigmentario en donde comienza la cascada de señales del ciclo visual. Los conos y bastones trabajan acoplados al epitelio pigmentario, ya que si no fuera así el potencial de acción no se podría generar en estas células y así pasar a las neuronas bipolares y seguir el camino de la vía visual. Los conos son las células que se encargan de la visión a color y los bastones de la visión en penumbras, por lo que se hará énfasis en éste último ya que aquí asienta la explicación de la enfermedad de Leber. Como se dijo anteriormente, los bastones son los responsables de mantener en la visión en la penumbra mediante un complejo sistema de señalización intracelular que se explicará a continuación: los bastones cuando están en penumbras se encuentran activados porque una gran concentración de GMP cíclico (GMPc) mantiene abierto los canales de sodio, lo cual despolariza la célula.

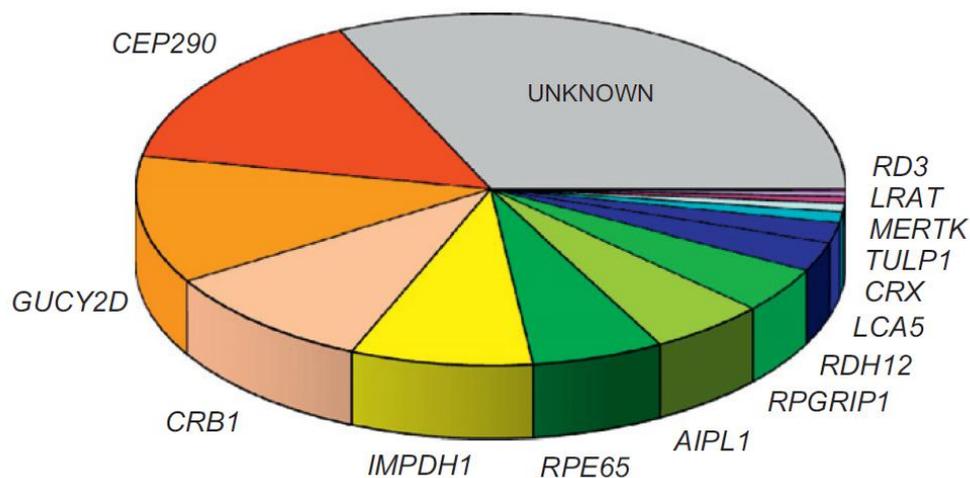


**Figura 1:** Estructura e histología de la retina. Imagen extraída de *Histología de Michael Ross*. Editorial Médica Panamericana. Página 907; 5ª edición. Año 2006

Una vez que un haz de luz incide sobre estas células el pigmento visual llamado rodopsina se activa y actúa sobre una proteína G que a su vez activa una GMPc fosfodiesteras que cataliza la degradación del GMPc, lo cual produce un cierre de los canales de sodio provocando una hiperpolarización de la célula. A este nivel el pigmento visual rodopsina tiene un rol fundamental en el ciclo interno fotorreceptores-epitelio pigmentario. La rodopsina consta de dos partes, la porción proteica u opsina y la porción derivada de la vitamina A llamada retinol, la cual absorbe la luz adoptando diferentes configuraciones. En la forma inactiva la rodopsina contiene el isómero 11-cis retinol que se encuentra unido a la opsina. La activación de la rodopsina se inicia por absorción de la luz en la región 11-cis retinol, cambiando su configuración a una molécula mucho más inestable llamada metarrodopsina II, que en cuestión de minutos se libera de la porción proteica de la rodopsina y se transforma en holo-trans retinol, el cual necesariamente debe viajar al epitelio pigmentario para sufrir la isomerización a 11-cis retinol por la proteína específica del epitelio pigmentario de la retina (RPE 65) y así regresar al bastón para que el ciclo visual se pueda dar con normalidad. (13) (14)

## Amaurosis Congénita de Leber: Generalidades

Se define la amaurosis congénita de Leber como una retinopatía de origen genético, de herencia autosómica recesiva, que lleva a la ceguera temprana en individuos que la padecen. Implica distrofia retiniana, con la ausencia de conos y bastones, siendo la forma más severa de distrofia retiniana congénita. Representa 2 a 5% de los casos de ceguera infantil en el mundo desarrollado, en donde se han identificado varios genes asociados (Figura 2). Estos, en conjunto, sólo explican alrededor del 70% de los casos de amaurosis retiniana congénita. Durante el desarrollo de ésta revisión se hará énfasis en el gen RPE65 ya que las terapias génicas actuales se enfocan directamente sobre este gen y su producto proteico; siendo el mismo un gen que se localiza en el brazo corto “p” del cromosoma 1 en la posición 31 desde el par de bases 68.428.823 al 68.449.958. Actualmente no existe forma de conocer la condición de portador asintomático de un individuo, hasta asociarlo con progeñie que exprese la enfermedad de Leber clínicamente.



**Figura 2:** Prevalencia de genes asociados con la ACL: CEP290 (15%), GUCY2D (12%), CRB1 (10%) RPE 65 (6%)son los genes que se encuentran mutados con mayor frecuencia. Faltan ser identificados aproximadamente un 30% de genes en esta patología. Extraído de Leber congenital amaurosis: Genes, proteins and disease mechanisms /2009.

Clínicamente se manifiesta por disminución de la visión ya en los primeros meses de vida, que se traduce en falta de respuesta al estímulo externo. En la mayoría de los casos, el trastorno es progresivo y permanente, y la visión de estos pacientes se limita a la distinción de formas, luz y oscuridad. Otros síntomas incluyen estrabismo, movimientos involuntario e incontrolable de los ojos (nistagmus) reflejo pupilar alterado, fotofobia, leucocoria, coloboma y queratocono. Ciertos pacientes pueden asociar síntomas extraoculares, como pérdida de la audición, retraso psicomotor, crisis epilépticas o hipoplasia de la línea medifacial, niños autistas y pacientes con albinismo. Se ha descrito también que todos los pacientes con ACL

expresan el signo oculodigital de Franceschetti, el cual consiste en un desplazamiento posterior de el globo ocular (enofthalmos) por compresión de los globos oculares con los puños.

Una evaluación clínica adecuada y la historia oftalmológica, así como la determinación de las alteraciones de la retina sugerentes hacen un diagnóstico correcto de la aparición temprana de distrofias retinianas en la infancia. La utilización de nuevas herramientas de diagnóstico como la tomografía de coherencia óptica (OCT), se unen con el electroretinograma de potenciales evocados (ERG) para apoyar el diagnóstico. El fondo de ojo en estos pacientes es normal en principio; a medida que los pacientes entran en la adolescencia temprana, el fondo de ojo comienza a evidenciar alteraciones, como atrofia de los vasos sanguíneos oculares, alteraciones maculares, y deterioro del epitelio pigmentario retiniano y tejido conectivo subyacente. El estudio de la variante genética asociada al desarrollo de la enfermedad en cada paciente se realiza a partir de la extracción de una muestra de ADN (procedente de células de la sangre) y la amplificación por PCR (polymerase chain reaction) y secuenciación de la región codificante alterada.

Actualmente se están describiendo ciertas características que deben ser patognomónicas a la mutación del RPE65; dichas características son la pérdida de los fotorreceptores, la disminución en la concentración de 11-cis retinol y el aumento de la activación térmica de la cascada de fototransducción por los cromóforos libres. Por lo tanto, la terapia génica con el gen sano de RPE65 puede aumentar la cantidad del cromóforo incrementando así la captura de fotones lo que lleva a una disminución en la actividad térmica de la cascada de fototransducción. De esta manera se evitaría la apoptosis de los conos y bastones, aunque no se puedan recuperar las células que ya se perdieron (6).

### **Ensayos pre-clínicos de terapia génica para LCA**

#### **Modelos murinos**

Se ha progresado ampliamente en las últimas dos décadas en la identificación genética de enfermedades retinianas congénitas y adquiridas a partir de modelos animales, mejorando el conocimiento existente respecto a la patogenia de las mismas. En enfermedades donde no existen modelos animales naturales, éstos se han generado artificialmente mediante ingeniería genética o transferencia genética somática.(15) Tres modelos murinos de deficiencia de RPE65 fueron reportados. Un modelo RPE65 *-/- knockout* fue creado por recombinación homóloga reemplazando los primeros tres exones e intrones que intervienen en el gen RPE65 del ratón. Estos ratones desarrollan una degeneración retiniana lentamente progresiva, que se mide por el espesor de la capa nuclear externa de la retina, donde se ubican los núcleos de los

fotorreceptores. En el ratón, esta porción de la retina sólo representa los bastones, que forman aproximadamente 97% de la población de fotorreceptores. Entre los meses 1 y 2 de vida, estos ratones tienen una capa nuclear externa de espesor normal, pero existen anomalías visibles. A los 6-7 meses, la pérdida de fotorreceptores genera una capa nuclear externa 70% de su espesor original. A los 12-18 meses, esta capa está reducida al 50%, y al 30% de su espesor a los 24 meses de edad. La distribución espacial de la degeneración del receptor no ha sido determinada hasta la fecha.

La tasa de degeneración de los fotorreceptores en este modelo puede depender de variables del medio y genéticas. La degeneración de los conos es mucho más rápida en estos ratones que la de los bastones. En el área central de la retina murina, se observa degeneración masiva de los conos al mes de vida. Esta pérdida inicial afecta preferencialmente los conos sensibles a longitudes de onda cortas, localizados en la retina ventral. A su vez, se encontró que las vías apoptóticas en los conos son distintas a aquellas en los bastones.

Estos ratones *knockout* acumulan a su vez grandes cantidades de ésteres trans-retinol, que se acumulan en forma de gotículas lipídicas en las células de la retina. En contraste, las células del epitelio pigmentario (16) muestran a su vez ausencia de gránulos de lipofuscina, apoyando la hipótesis de que el ciclo all-trans y 11-cis-retinal es necesario para la acumulación de dicho pigmento.

Los primeros resultados alentadores se obtuvieron inyectando un vector derivado de AAV 2 con el gen RPE-65 en la región subretiniana de ratones *knockout*. Los mismos, de forma general mostraron una mejora del 80% en el electroretinograma de ratones adultos. Dos semanas después de la inyección se detectó una expresión robusta del gen RPE 65 y altos niveles de 11 cis retinol, junto con una reconstitución de la actividad isomerasa y además se observó que la terapia impidió una masiva degeneración de los conos (16). Resultados similares se han obtenido utilizando como vector un AAV 5, puesto que luego de seis meses se detectaron altos niveles de rodopsina, una disminución en la acumulación del trans retinol, se produjo el rescate de los fotorreceptores por la inclusión lipídica y se restauró la función visual, comprobado por los resultados del electroretinograma. En este mismo estudio, se comprobó que mientras más temprano se realiza el tratamiento, las vías visuales se conservaban con mayor integridad, ya que aquellos animales tratados luego de los seis meses de vida mostraron una degeneración más avanzada (16)

Los ratones con una mutación natural, por otro lado, muestran un espesor de la capa casi normal hacia las 8 semanas de edad, mientras aumenta el número de espacios vacíos de bastones en los segmentos externos. Estos ratones, al igual que los ratones *knockout*, también muestran una rápida tasa de degeneración de los conos en el primer mes de vida (16)

En adición a estos modelos, se creó un modelo adicional *knockin* para Rpe65R91W con el fin de reproducir la enfermedad causada por una de las mutaciones más comunes observadas

en los pacientes con ACL. Estos ratones expresan parcialmente la proteína mutante RPE65 y la generación de 11-cis-retinal y rodopsina, llegando a niveles 10% de lo normal. En términos de grosor de la capa nuclear externa, ambos grupos de ratones *knockout* y *knockin* mostraron resultados similares. Estos resultados sugieren que la producción mínima de rodopsina no es suficiente para detener la progresión de la degeneración de los bastones. Sin embargo, los ratones *knockin* parecen mostrar mejor preservación de la capa externa que ratones *knockout* de la misma edad. La degeneración de los conos en el grupo *knockin* es más lenta que en el *knockout*. En ambos modelos, los conos sensibles a longitudes de onda cortas de la retina ventral mostraron ser los más afectados, si bien hay más degeneración en los ratones *knockout*.(16)

En estudios realizados recientemente se observó que ratones que padecían ACL recuperaron totalmente la función de los conos, la actividad de la guanilato ciclasa (proteína esencial para la fotoexcitación), y preservaron los conos a largo plazo. Estos resultados se obtuvieron utilizando AAV 5 como vector para el remplazo de los genes *Gucy2e* y *Nrl*, los cuales son los responsables de la producción de una proteína adenilato ciclasa (ret GC1) esencial en el ciclo de los retinoides. (17)

### Modelos caninos

La raza Briard es afectada por una retinopatía de herencia recesiva caracterizada por provocar ceguera nocturna, y distintos grados de ceguera diurna, pudiendo llegar a ser total.. La degeneración retiniana en este modelo es tan paulatina que no hay evidencia de pérdida de fotorreceptores hasta los 1.5 años de vida. Si bien no disminuye la cantidad de fotorreceptores hasta el año y medio de vida, sí existen cambios moleculares dentro de los mismos, así como en las células bipolares y amácrinas. La etapa final de degeneración en la retina periférica sucede en promedio a los 5-7 años de vida.

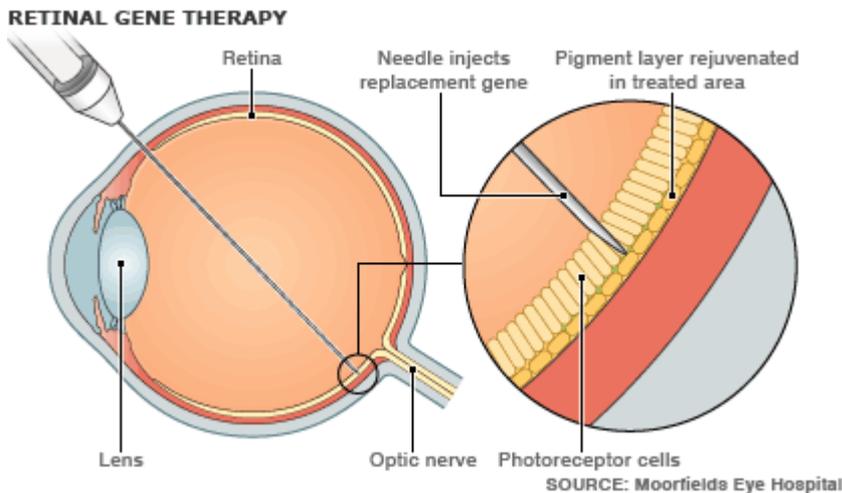
En estudios realizados en once perros tratados con AAV, se vio que diez mostraron una restauración casi normal de los conos y bastones. Además se demostró que mientras más tarde se comience el tratamiento, en la retina y en el resto de la vía visual se producen desafereciaciones irreversibles, lo cual apoya a que los animales con tratamiento tardío tengan una leve mejoría de su enfermedad. En estos perros para evaluar la función subcortical luego de la terapia se utilizó el reflejo pupilar, que mostro grandes mejoras, lo que habla de ausencia de desafereciaciones en las vías nerviosas.(16)

### Etapa clínica.

La utilización de terapia génica para ACL ha mejorado los bajos niveles de la proteína RPE-65 en el epitelio pigmentario, llevando a una mejora en la visión y en la degeneración de los fotorreceptores, lo que da como resultado una conservación, sobre todo, de los conos.

En esta terapia se apunta a la transferencia del gen RPE-65 a un pequeño pool localizado de células. Este método disminuye la probabilidad de toxicidad sistémica desencadenada por el agente inyectado, de eventos adversos y de desencadenamiento de la respuesta humoral. El vector fue administrado en principio de forma unilateral, aunque luego se suma tratamiento contralateral, con buenos resultados. Se decidió utilizar como vector el AAV 2 dentro de una cápside de AAV 1, ya que demostró una eficaz transducción en el epitelio pigmentario, un aumento en los valores de rodopsina y una pobre respuesta inflamatoria, lo cual se ve favorecido por la presencia de la barrera hemato-retiniana a nivel ocular (18)

Los vectores virales disponibles en la terapia génica retiniana tienen habilidad de difusión transtisular muy limitada. En ciertos casos, particularmente vectores que actúen a nivel de las capas internas de la retina y el tracto uveal, la administración intravítrea por inyección puede ser suficiente. Sin embargo, este método no es efectivo para las células de las capas externas. Éstas deben entrar en contacto directo con el vector viral para una transducción exitosa, como ha sido comprobado desde etapas preclínicas con animales. En estos casos, los agentes terapéuticos deben ser puestos en el espacio subretinal. (Figura 3)



**Figura 3:** Inyección subretinal. Extraído de [www.qvision.es](http://www.qvision.es).

Los procedimientos ensayados para la localización subretiniana del vector han sido varios, como la simple difusión, o una inyección transcoroidal. Estos métodos han probado ser poco eficaces. De todos los procedimientos investigados para llegar al espacio subretinal, la gran mayoría de los investigadores han empleado un abordaje transvítreo, transretiniano. Este abordaje tiene varias ventajas prácticas y teóricas. En primer lugar es un procedimiento similar a

otras cirugías oftalmológicas para las que existen oftalmólogos entrenados; permite visualización directa de la retina a lo largo de todo el procedimiento, y monitorización en tiempo real de la inyección. No se requiere el diseño de nuevo instrumental para llevarlo a cabo, y permite la realización de maniobras adicionales en el caso de surgir complicaciones intraoperatorias.

La inyección subretiniana del vector produce un pequeño desprendimiento o “bleb”. Casi todo o todo el volumen de material inyectado está atrapado en este espacio, con muy poco escape del material al humor vítreo. El volumen de distribución es limitado, lo que permite una mayor eficacia del vector inyectado, y un menor índice de toxicidad local y sistémica. Poco tiempo luego de la inyección, el bleb se vuelve indetectable en la retina humana. Dado que no debe penetrar en las estructuras vasculares aledañas, esto también protege contra la exposición sistémica a la droga, y la integridad de la barrera óculo-vascular permanece intacta (18).

A su vez, existe compartimentalización inmunológica cuando el material antigénico se coloca en el espacio subretinal. Limitar la exposición a esta área puede resultar en reacciones inmunitarias características y evidentes, pero cuando la colocación queda confinada al espacio subretinal, puede inducirse tolerancia antigénica. Esta propiedad, única del espacio subretinal, es de gran importancia para la terapia génica, dado que el desarrollo de respuesta inmune específica limitará la eficacia del tratamiento.

El contacto de la droga con otras áreas de la retina más que la seleccionada debe evitarse a toda costa también con el fin de evitar toxicidad. El correcto posicionamiento y compartimentalización de la misma se realiza mediante intercambio de aire.

Los procedimientos efectuados con estos fines difieren en detalles. El protocolo quirúrgico para la terapia génica en LCA2 del Hospital Infantil de Filadelfia agrega, por ejemplo, la exéresis de la membrana hialoidea posterior (19). En muchos casos, el desprendimiento vítreo posterior completo ya está presente en los pacientes, a pesar de su temprana edad, dado que las anomalías vítreas son características de estas patologías. Las complicaciones del procedimiento, como ser el desprendimiento de retina post inyección, son poco frecuentes. La creación de un orificio macular, por otro lado, parece ser una complicación única de la inyección subretiniana, generalmente desarrollándose varios días después de la intervención en el postoperatorio. En estos casos particulares, no existe edema intraretiniano o macular en ningún momento de la evolución.(19)

En 2007 se comenzaron tres ensayos clínicos con 18 pacientes, los cuales mostraron los máximos resultados hasta la fecha. Esto fue en un seguimiento de 90 días a 1,5 años. Utilizando AAV 2 se vio que se podría generar una toxicidad elevada junto con una mayor respuesta inmune, pero junto con esto se demostró una mejoría en la función visual en días, la cual fue aumentando hasta los 1,5 años posteriores, junto con una elevada concentración de producto genético (15). Mediante la realización de este estudio se pudo enfatizar en el concepto de que la

terapia no puede recuperar los fotorreceptores perdidos, pero sí puede aumentar la cantidad de cromoforo isomerizado incrementando así la captura de fotones. Todo esto llevo a que los pacientes tratados presentaran una mayor sensibilidad a la luz en penumbras. En cuanto a la agudeza visual dos de los grupos seguidos no mostraron ningún cambio satisfactorio, mientras que el tercer grupo mostró una mejora importante en la agudeza visual junto con la corrección del nistagmo en ambos ojos. La utilización del electroretinograma en estos pacientes fue controvertida, ya que solo un paciente de 11 años mostró mejoras en las señales eléctricas de las células maculares, utilizando un electroretinograma multifocal.

El reflejo pupilar a la luz (PLR) también fue utilizado como un método no invasivo para demostrar la función de los fotorreceptores y de las vías nerviosas (16). Antes del tratamiento, la mayoría de los ojos de los pacientes tenían una pérdida de la sensibilidad mayor a cuatro unidades logarítmicas, y después del tratamiento todos los pacientes mostraron mejoras significativas en la sensibilidad PLR (16). El efecto de la terapia fue muy lento en la visión de los pacientes, ya que los resultados mostraron una mejora en los primeros 30 días luego del tratamiento y posteriormente en los 11 meses siguientes no se obtuvo cambio alguno.

Pero a pesar de esto hubo un caso especial en que un paciente luego de transcurrido un año de la terapia comenzó a visualizar letras y números (16).

En otro estudio realizado en humanos se utilizó la terapia génica para reemplazar el gen RPE65 utilizándose como vectores virus adenoasociados, para tratar 3 pacientes adultos que padecían ACL y los cuales aún conservaban una fina capa fotorreceptora. Se midió la visión previo y luego de realizado el tratamiento. Los tres pacientes mostraron un aumento estadísticamente significativo en la sensibilidad visual. Se pudo demostrar, en las áreas de la retina tratadas, la funcionalidad de conos en 2 de los 3 pacientes y de los bastones en los 3 pacientes, pero la cinética de éstos últimos era notablemente más lenta en comparación con la del un ojo normal.(20)(21)

La mejoría observada en la visión dependiente de los bastones no fue igual en los tres pacientes; en aquellos cuya capa fotorreceptora se encontraba mejor conservada en el área tratada, mostraron aumentos superiores en la visión por bastones.

Otro estudio en el cual tres pacientes recibieron tratamiento monocular ha aportado evidencia de que la administración subretinal de vectores virales adenoasociados codificados con el gen RPE65 en pacientes que padecen la enfermedad de leber debido a mutaciones en este gen, es segura y que además en algunos casos el resultado es beneficioso. Se ha evaluado este procedimiento y se ha constatado que la seguridad y eficacia terapéutica persiste por lo menos hasta 1,5 años luego de ser administrada la inyección, y que la mejoría en la función visual comienza a ser evidente al mes de realizado el procedimiento.(22)

Esta mejoría de la función visual fue objetivada mediante una evaluación objetiva y otra subjetiva. El análisis objetivo se realizó mediante el análisis del reflejo fotomotor y movilidad

ocular; el subjetivo fue evaluado mediante la agudeza visual, test del campo visual de Goldmann y pruebas de movilidad.

Con respecto al reflejo fotomotor, en personas cuya visión no se encuentra afectada por la enfermedad de Leber, un estímulo luminoso a cualquiera de los ojos tiene como consecuencia la contracción pupilar de ambos ojos. En cambio en paciente con ésta enfermedad, el reflejo fotomotor se encuentra significativamente afectado. De modo que una vez inyectado el vector, mediante la realización de esta prueba, se observó una mejoría tanto en velocidad como amplitud en el reflejo fotomotor únicamente en el ojo inyectado, no observándose este resultado en el ojo no tratado. Esta prueba comprueba que los estímulos captados en la retina son transmitidos a centro nerviosos superiores, y además objetiva la mejoría a la sensibilidad a la luz. En cuanto a la movilidad ocular, previo a la realización del procedimiento los pacientes presentaban exotropía, nistagmo y otros movimientos oculares de baja frecuencia. Luego de realizado el procedimiento, en los 3 sujetos los movimientos oculares eran constantes, simétricos y con una oscilación de frecuencia que aumentaba de intensidad en la mirada excéntrica y con cubierta monocular. Además se observó una disminución en la frecuencia de nistagmo en posición primaria de la mirada, no sólo en el ojo tratado sino también en el no tratado.

Se constató una mejoría en la agudeza visual en los tres pacientes, y en dos de los tres pacientes el ojo inyectado, que era el de peor función previo a la inyección, se convirtió en el ojo con mejor agudeza visual. Además en uno de los pacientes, aunque no fue una mejoría estadísticamente significativa, se observó una mejoría en la agudeza visual en el ojo no inyectado. El test del campo visual de Goldmann también mostró mejoras después de la inyección, pero no se observaron mejoras mayores a los 1,5 años postinyección. Las pruebas de movilidad, evaluadas mediante la habilidad para navegar una pista de obstáculos, revelaron una ligera mejoría continua hasta los 1,5 años postratamiento tanto en términos del tiempo necesario para completar la prueba como en el número de obstáculos evitados.

A pesar de que se observó un aumento transitorio del número de anticuerpos contra la cápside del AAV en 2 de los 3 pacientes, no se observó respuesta humoral con respecto a la proteína RPE65. Esto último queda constatado debido a la persistencia en la mejoría funcional lograda con el procedimiento.

En tres ensayos clínicos realizados en humanos, no se encontraron evidencia de eventos adversos severos, diseminación sistémica del vector ni respuesta inmunológica frente al vector o al transgen. (23)(24)

A continuación a modo de resumen se realiza una tabla comparativa entre los diferentes trabajos efectuados y las conclusiones que se han llegado en los mismos.

<p><b><u>PRECLINICOS</u></b></p> <p>Evaluado en general la estabilidad y seguridad de los genes promotores</p> <p><b><u>MURINO</u></b></p> <p>Modelo RPE65 +/- knockout . La degeneración de los conos es mucho más rápida en estos ratones que la de los bastones. Acumulan a su vez grandes cantidades de ésteres trans-retinyl.</p> <p>Ratones con una mutación natural al igual que los ratones knockout, muestran una rápida tasa de degeneración de los conos en el primer mes de vida. La acumulación de trans-retinyl no parece mostrar diferencias significativas con el de los ratones knockout.</p> <p>Modelo knockin para Rpe65R91W con el fin de reproducir la enfermedad causada por una de las mutaciones más comunes observadas en los pacientes con ACL mejor preservación de la capa externa que ratones knockout. La degeneración de los conos en el grupo knockin es más lenta que en el knockout. En ambos modelos, los conos mostraron ser los más afectados, si bien hay más degeneración en los ratones knockout.</p> <p>Últimos modelos knockout Nrl +/- , Gucy2e +/- mostraron con el uso de AAV una restauración completa de la función de los conos, preservando los mismos a largo plazo. (15;16;17)</p> <p><b><u>CANINO</u></b></p> <p>La retinopatía conocida en la raza Briard de herencia recesiva es causada por la misma delección de 4 PB de la secuencia RPE65. Actualmente la utilización de las terapias génicas en esta enfermedad ha mejorado los bajos niveles de la proteína RPE-65 en el epitelio pigmentario, llevando a una mejora en la visión y en la degeneración de los fotorreceptores, lo que da como resultado una conservación, sobretodo de los conos. (16)</p>	<p><b><u>CLINICOS</u></b></p> <p>En un estudio realizado en humanos se utilizó la terapia génica para reemplazar el gen RPE65 utilizándose como vectores virus adenoasociados, para tratar 3 pacientes adultos que padecían ACL y los cuales aún conservaban una fina capa fotorreceptora.</p> <p>Se pudo demostrar, en las áreas de la retina tratadas, la funcionalidad de conos en 2 de los 3 pacientes y de los bastones en los 3 pacientes una mejoría tanto en velocidad como amplitud en el reflejo fotomotor únicamente en el ojo inyectado, no observándose este resultado en el ojo no tratado.</p> <p>Se observó una disminución en la frecuencia de nistagmo en posición primaria de la mirada, no sólo en el ojo tratado sino también en el no tratado.</p> <p>Otro estudio en el cual tres pacientes recibieron tratamiento monocular se constató una mejoría en la agudeza visual en los tres pacientes, y en dos de los tres pacientes el ojo inyectado, que era el de peor función previo a la inyección, se convirtió en el ojo con mejor agudeza visual. Este tipo de intervención mejoraría el bloqueo funcional pero no reemplazaría las células perdidas como resultado de la degeneración.</p> <p>Se concluyó que si bien existe una mejoría de la visión a largo plazo, la placa de células fotorreceptoras se continúa deteriorando y que la terapia génica no modifica los procesos degenerativos. (16;18;19;20;21;22;23;24)</p>
--	--

## CONCLUSIÓN

Con el análisis de la información recabada, se constata la ausencia de un tratamiento curativo para la ACL en la actualidad. Por lo tanto se enfatiza la importancia de los avances en la terapia génica para esta enfermedad, postulándola como el único tratamiento posiblemente curativo.

Se destacan los resultados de los últimos ensayos, en particular el ensayo pre clínico más reciente publicado en el año 2015, donde se ve una completa restauración de la visión de los ratones utilizados.

Respecto a los ensayos clínicos, a partir de esta revisión se puede concluir que se han logrado mejoras en la visión en penumbras, observándose visión luz y visión bulto.

Estos estudios permitieron deducir que la expresión del transgen es estable en el tiempo, lo que excluye la posibilidad de que las mejoras observadas en la función visual son resultado de un efecto neurotrófico transitorio inducido por el procedimiento quirúrgico. Además, a pesar de que se necesita un estudio más prolongado en el tiempo, la eficacia de la transferencia de genes parece no verse afectada por la evolución natural de la enfermedad.

El uso de terapia génica para reemplazo del gen mutado demostró que en la ACL se da una degeneración más lenta de los fotorreceptores. Este tipo de intervención mejoraría el bloqueo funcional pero no reemplazaría las células perdidas como resultado de la degeneración.

Actualmente es un gran trecho el recorrido en el ámbito de la terapia génica para la ACL, estando sus resultados cada vez más cercanos a la cura de la enfermedad. Así mismo, muchas enfermedades ya han encontrado su cura con este tipo de terapia. Por todo esto, luego de elaborar esta revisión, tenemos la convicción de que el futuro de la práctica médica está en la terapia génica.

## ABREVIACIONES

ACL	Amaurosis congenita de leber
SCID	Inmunodeficiencia severa combinada
ADA	Adenosina deaminasa
LPL	Lipoprotein lipasa
LPLD	Deficiencia de lipoprotein lipasa
CMV	Citomegalovirus
AAV	Virus adenoasociado
MLV	Moloney Leukemia Virus
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
OCT	Tomografía de coherencia óptica
ERG	Electroretinograma
PCR	Polymerase chain reaction
EPR	Epitelio pigmentario
PLR	Reflejo pupilar a la luz

## BIBLIOGRAFÍA.

1. *Leber A De, De R. Amaurosis congénita de Leber. Reporte de caso. 2014;18:38–42.*
2. *La S, Fundaluce II, De F. “FARPE y Fundaluce siguen apostando por la investigación aún en tiempos de crisis.” 2010;*
3. *Bueren J. Avances de la terapia génica en el tratamiento de enfermedades monogénicas. 9ª edición del curso Biotecnol Apl a la Salud Humana. 2010;*
4. *Bryant LM, Christopher DM, Giles AR, Hinderer C, Rodriguez JL, Smith JB, et al. Lessons learned from the clinical development and market authorization of Glybera. Hum Gene Ther Clin Dev [Internet]. 2013 Jun [cited 2015 Jul 17];24(2):55–64. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3992977&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>*
5. *Ferreira V, Petry H, Salmon F. Immune Responses to AAV-Vectors, the Glybera Example from Bench to Bedside. Front Immunol [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Aug 5];5(March):82. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3939780&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>*
6. *Den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, Cremers FPM. Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. Prog Retin Eye Res [Internet]. 2008 Jul [cited 2015 Jul 27];27(4):391–419. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18632300>*
7. *Cuajimalpa U, Naturales C. La Nanotecnología y la Terapia Génica La Nanotecnología y la Terapia Génica. :1–8.*
8. *James Watson. Biología Molecular del Gen. 5º ed. Panamericana EM, editor. 2008.*
9. *Boudes PF. Gene therapy as a new treatment option for inherited monogenic diseases. Eur J Intern Med [Internet]. European Federation of Internal Medicine.; 2014 Jan [cited 2015 Aug 12];25(1):31–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24129166>*
10. *Del A, La TDE, Gen E, Enfermedades T. Tratamiento de la enfermedad genética. :389–414.*
11. *Finn Geneser. Histología. 3º ed. Panamericana EM, editor. Buenos Aires; 2009. 687–721 p.*
12. *Name L, Name F, Training O, Training P, Darin C, Training RO, et al. Atlas de Histología. Igarss 2014. 2014.*
13. *Erik Kandel. Principio de Neurociencia. 3º ed. España I de, editor. 2001.*

- 14 *Horacio Cingolani ABH. Fisiologia Houssay.pdf. Buenos Aires; 2009.*
- 15 *Surace EM, Auricchio A. Versatility of AAV vectors for retinal gene transfer. Vision Res [Internet]. 2008 Feb [cited 2015 Aug 23];48(3):353–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17923143>*
16. *Cideciyan A V. Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy. Prog Retin Eye Res [Internet]. Elsevier Ltd; 2010 Sep [cited 2015 Aug 23];29(5):398–427. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2903652&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>*
- 17 *Boye Sanford L., Peterson James J., Choudhury Shreyasi, Min Seok Hong, Ruan Qing, McCullough K. Tyler, Zhang Zhonghong, Olshevskaya Elena V., Peshenko Igor V., Hauswirth William W., Ding Xi-Qin, Dizhoor Alexander M. and BSE. Gene Therapy Fully Restores Vision to the All-Cone Nrl<sup>-/-</sup>Gucy2e<sup>-/-</sup> Mouse Model of Leber Congenital Amaurosis-1. 2015;575–92.*
18. *Bennett J, Maguire AM, Gene BP. Chapter 34 - Gene Therapy for Retinal Disease [Internet]. Fifth Edit. Retina. Elsevier Inc.; 652-668 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4557-0737-9.00034-5>*
19. *Konishi M, Kawamoto K, Izumikawa M, Kuriyama H, Yamashita T. Gene transfer into guinea pig cochlea using adeno-associated virus vectors. J Gene Med. 2008;10(6):610–*
20. *Ashtari M, Cyckowski LL, Monroe JF, Marshall KA, Chung DC, Auricchio A, et al. The human visual cortex responds to gene therapy – mediated recovery of retinal function. 2011;121(6).*
21. *Simonelli F, Maguire AM, Testa F, Pierce E a, Mingozzi F, Bencicelli JL, et al. Gene therapy for Leber’s congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. Mol Ther [Internet]. Nature Publishing Group; 2010 Mar [cited 2015 Aug 23];18(3):643–50. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2839440&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>*
22. *Jacobson SG, Cideciyan A V, Ratnakaram R, Heon E, Schwartz SB, Roman AJ, et al. NIH Public Access. 2013;130(1):9–24.*
23. *Bennett J, Ashtari M, Wellman J, Marshall KA, Laura L, Chung DC, et al. NIH Public Access. 2014;4(120):1–24.*
24. *Cideciyan A V, Aleman TS, Boye SL, Schwartz SB, Kaushal S, Roman AJ, et al. Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. 2008;*