



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudio de las alteraciones retinianas en pacientes con síndrome de Usher de edad pediátrica

Olaia Subirà González

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

SJD Sant Joan de Déu
Barcelona · Hospital

ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES RETINIANAS EN PACIENTES CON SÍNDROME DE USHER DE EDAD PEDIÁTRICA

Memoria de tesis doctoral presentada por

Olaia Subirà González

para optar al grado de doctora por la Universidad de Barcelona

Dirigida por

Jaume Català Mora

Universitat Autònoma de Barcelona, Hospital Universitari de Bellvitge
i Hospital Sant Joan de Déu

Dirigida y tutorizada por

Josep Maria Caminal Mitjana

Universitat de Barcelona, Hospital Universitari de Bellvitge

Programa de doctorado Medicina e Investigación Traslacional
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Barcelona

Barcelona, julio 2024

*“Todo hombre puede ser, si se lo propone,
escultor de su propio cerebro”*

*“Observar sin pensar es tan peligroso
como pensar sin observar”*

Santiago Ramón y Cajal

AGRADECIMIENTOS

A menudo he comparado la realización de esta tesis doctoral con la construcción de la Sagrada Familia: un proyecto que parecía interminable e inalcanzable, y que se ha extendido en el tiempo más de lo previsto. Esta tesis me ha visto crecer, evolucionar profesionalmente de residente a adjunta, mudarme de hogar hasta en tres ocasiones y ha sido testigo del nacimiento de mis dos hijos. Sin embargo, finalmente ha llegado el momento de redactar este último apartado y poner fin a esta aventura.

En primer lugar, quisiera expresar mi gratitud al Dr Josep Maria Caminal y al Dr Jaume Català, directores de esta tesis, por su apoyo y confianza en mí, por alentarme en los momentos más complicados de esta andadura, por sus valiosas recomendaciones y su asesoramiento a lo largo de estos años.

En segundo lugar, quisiera reflejar de manera especial mi agradecimiento al Dr Garcia Arumí, por ser mi mentor e inspiración. Por su generosidad al compartir su experiencia conmigo y por cada consejo que he recibido, los cuales intento aplicar cada día en el quirófano.

Asimismo, quisiera dar las gracias a mis compañeros y amigos de mis dos casas de acogida: En primer lugar, los compañeros del Servicio del Hospital de Bellvitge donde me formé como residente. De esos cuatro años, solo guardo buenos recuerdos, gracias a mis compañeros de residencia y a los adjuntos que dejaron una marca indeleble en mi desarrollo profesional, marcando en mí “*el sello Bellvitge*” del que me siento muy orgullosa. Y en segundo lugar, a mis compañeros del Servicio de Valle de Hebrón, porque volver a la que fue mi casa, fue un sueño, y aunque los inicios no son fáciles y suponen un nuevo desafío, trabajar con compañeros a los que admiro y, que a la vez consiguen hacerme sentir parte imprescindible del equipo, hace que vaya a trabajar cada día ilusionada y con ganas de seguir aprendiendo.

Quisiera destacar que, en estas dos etapas, hay una persona que siempre ha estado a mi lado, mi *Co-R*, Helena. Ella, sin duda, ha sido un pilar fundamental en este camino.

También quisiera agradecer su ayuda a Cristina del Prado, quién desde el primer momento se mostró dispuesta a ayudarme con la recogida de datos y a Sol Balsells, por su gran trabajo en el análisis estadístico de este trabajo.

Por último, quisiera dar las gracias a mi familia, en especial a mi compañero de vida, Daniel, por su paciencia y apoyo incondicionales durante la realización de esta tesis y en todos los retos con los que nos desafía la vida. A mis hijos, Mateo y Abril, por ser mi mayor fuente de fortaleza y por llenar mi vida de alegría y motivación para superar cualquier obstáculo. Sin ellos, este logro no sería posible.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	XIII
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	1
ENUMERACIÓN DE ARTÍCULOS	5
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	13
4.1. Anatomía y fisiología de la retina	16
4.1.1. Anatomía funcional de la retina	16
4.1.2. Histología básica de la retina	17
4.1.3. Composición celular de la retina	19
4.1.3.1. Epitelio pigmentario de la retina (EPR)	20
4.1.3.2. Fotorreceptores: conos y bastones	22
4.1.3.3. Células bipolares	26
4.1.3.4. Células horizontales	28
4.1.3.5. Células amacrinas	28
4.1.3.6. Células ganglionares	29
4.1.3.7. Células gliales: células de Müller	30
4.2. Enfermedades hereditarias de la retina: distrofias retinianas	31
4.3. Retinosis pigmentaria	33
4.3.1. Síntomas de la retinosis pigmentaria	33
4.3.2. Signos clínicos de la retinosis pigmentaria	34
4.3.3. Criterios diagnósticos de la retinosis pigmentaria	37
4.4. Síndrome de Usher	39
4.4.1. Historia del Síndrome de Usher	39
4.4.2. Clasificación y presentación clínica	40
4.4.3. Genética del síndrome de Usher	42
4.4.3.1. Gen MYO7A en el Síndrome de Usher tipo 1	43
4.4.4. Diagnóstico del Síndrome de Usher	46
4.4.4.1. Pruebas de audición y función vestibular	46
4.4.4.2. Pruebas oftalmológicas	47
4.4.4.3. Diagnóstico genético	58
4.4.5. Tratamiento y pronóstico	60

HIPÓTESIS	61
OBJETIVOS	65
Objetivo principal.....	67
Objetivos secundarios	67
MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS.....	69
Artículo 1.....	71
Artículo 2	81
DISCUSIÓN	93
8.1. Análisis de las alteraciones retinianas detectadas mediante SS-OCT...	96
8.2. Correlación de las alteraciones anatómicas detectadas con la agudeza visual	101
8.3. Localización de MYO7A en la retina y teoría fisiopatológica.....	103
8.4. Indicadores de progresión de la enfermedad.....	106
8.5. Limitaciones	108
8.6. Fortalezas	109
8.7. Futuras líneas de investigación	110
8.7.1. Relación de los hallazgos de OCT con nuevas pruebas diagnósticas: micropertimetría y angiografía-OCT.....	110
8.7.2. Correlaciones genotipo-fenotipo.....	111
8.7.3. Utilidad de los resultados del estudio en la evaluación de futuros tratamientos	111
CONCLUSIONES	113
BIBLIOGRAFÍA	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del globo ocular.....	17
Figura 2. Corte histológico transversal de la retina que muestra las distintas capas y conexiones neuronales y su interpretación esquemática.	18
Figura 3. Esquema realizado por Santiago Ramón y Cajal en 1892, en el que se muestra la estructura de la retina de los vertebrados, ilustrando los principales tipos celulares.....	19
Figura 4. Interconexiones del epitelio pigmentario de la retina con los fotorreceptores y la coroides.....	20
Figura 5. Esquema representativo de las funciones principales del epitelio pigmentario de la retina.....	22
Figura 6. Gráfica de distribución de la densidad de conos (verde) y bastones (rojo) en la retina.....	23
Figura 7. Esquema de la estructura interna de los dos tipos de fotorreceptores.....	25
Figura 8. Esquema del relevo sináptico establecido en la vía visual.....	27
Figura 9. Retinografía de campo amplio de paciente con RP por USH1.....	36
Figura 10. Estructura de la proteína Myosina VIIa.....	44
Figura 11. Esquema de las localizaciones y posibles funciones de <i>MYO7A</i> en la retina.....	45
Figura 12. Campo visual en paciente con RP.....	48
Figura 13. ERG flash de paciente con RP.....	50
Figura 14. ERG multifocal alterado en paciente con RP.....	51
Figura 15. Autofluorescencia en paciente con RP a USH1.....	52
Figura 16. Correlación entre la imagen obtenida por OCT y los resultados del estudio inmunohistoquímico del área macular de la retina.....	55

Figura 17. Nomenclatura estandarizada para las diferentes capas de la retina y coroides de una imagen de OCT centrada en mácula, basada en la nomenclatura propuesta por <i>Starenghi y colaboradores</i>	56
Figura 18. Correlación de las capas de la retina externa con las distintas partes de los fotorreceptores.....	58
Figura 19. OCT, retinografía de campo amplio y autofluorescencia del ojo derecho de tres pacientes afectados de USH1 por <i>MYO7A</i> . (imágenes propias).....	98
Figura 20. Alteraciones en la MLI en imágenes de OCT macular de distintos pacientes con USH1 por <i>MYO7A</i>	99
Figura 21. OCTs maculares de pacientes con USH1 por <i>MYO7A</i> en las que observamos diferentes grados de opacidades vítreas. ...	100
Figura 22. Ilustración esquemática de las diferentes capas de la retina donde se refleja la hipótesis del daño inicial en los OS de fotorreceptores y su progresión centrífuga en la retinopatía por <i>MYO7A</i>	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las DHR según las manifestaciones clínicas y la afectación anatómica	32
Tabla 2. Resumen de los síntomas característicos de la RP	34
Tabla 3. Resumen de las posibles alteraciones retinianas observables en el examen fundoscópico de los pacientes con RP	35
Tabla 4. Resumen de la clasificación clínica del USH basada en la clasificación de Davenport y Smith	42
Tabla 5. Locus, localización cromosómica, genes identificados y proteínas expresadas para cada subtipo clínico de USH	43
Tabla 6. Resumen de las localizaciones y funciones descritas de <i>MYO7A</i> en la retina.	45
Tabla 7. Disminución de la capa elipsoidal (EZ) y la capa de interdigitación (IZ) a lo largo del seguimiento como medidas de progresión de la enfermedad.	107

1

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

1. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAV (*adeno-associated virus*): vectores del virus adenoasociado

ADN: ácido desoxirribonucleico

AOCT: Angiografía-tomografía por coherencia óptica

ATP: adenosín trifosfato

AV: Agudeza visual

BCVA (*Best corrected Visual Acuity*) **MAVC**: mejor agudeza visual corregida

CH: células horizontales

Cl: cloro

CV: campo visual

DHR: distrofias hereditarias retinianas

DMAE: degeneración macular asociada a la edad

EMQ: edema macular quístico

EPR: epitelio pigmentario de la retina

ERG: electroretinograma

EZ (*ellipsoid zone*): zona de elipsoides = **EPIS** (*ellipsoid portion of inner segments*): porción elipsoides de los segmentos internos = **ESI**: elipsoides de los segmentos internos = **IS/OS** (*inner segment/outer segment*): unión entre los segmentos internos y externos de los fotorreceptores.

FGF (*Fibroblast Growth Factor*): factor de crecimiento de fibroblastos

FR: fotorreceptor o fotorreceptores

GABA: ácido gamma-aminobutírico

H₂O: agua

IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor I*): factor de crecimiento similar a la insulina-1

IZ (*interdigitation zone*): zona o capa de interdigitación

LEDGF (*Lens Epithelium-Derived Growth Factor*): factor de crecimiento derivado del epitelio del cristalino

MER: membrana epirretiniana

MLE: membrana limitante externa

MLI: membrana limitante interna

MPC: micropseudoquistes = **MME** (*microcystic macular edema*): edema macular microquístico

MYO7A-IRD: (*MYO7A-inherited retinal dystrophies*): distrofias retinianas hereditarias asociadas a mutaciones del gen **MYO7A** = **USH1-MYO7A**: síndrome de Usher tipo 1 secundario a mutaciones del gen **MYO7A**

NGS (<i>Next Generation Sequencing</i>): secuenciación de nueva generación	coherencia óptica de Dominio Espectral	distrofias retinianas hereditarias asociadas a mutaciones del gen <i>MYO7A</i>
OCT : tomografía por coherencia óptica	SSCP (<i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i>): polimorfismo conformacional de cadena sencilla	USH2 : síndrome de Usher tipo 2
OS (<i>outer segments</i>): segmentos externos (de los fotorreceptores)	SS-OCT : tomografía por coherencia óptica Swept Source	USH3 : síndrome de Usher tipo 3
PDGF (<i>Platelet Derived Growth Factor</i>): factor de crecimiento derivado de plaquetas	TD-OCT (<i>Time Domain-OCT</i>): tomografía por coherencia óptica de Dominio Temporal	VEGF (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>): factor de crecimiento del endotelial vascular
PEDF (<i>Pigment Epithelium-Derived Factor</i>): factor derivado del epitelio pigmentario	USH : síndrome de Usher	Vit A : vitamina A
PEV : potenciales evocados visuales	USH1 : síndrome de Usher tipo 1	WES (<i>Whole Exome Sequencing</i>): secuenciación de exoma completo
RP : retinosis pigmentaria	USH1-MYO7A : síndrome de Usher tipo 1 secundario a mutaciones del gen <i>MYO7A</i> = MYO7A-IRD (<i>MYO7A-inherited retinal dystrophies</i>):	WGS (<i>Whole Genome Sequencing</i>): secuenciación de genoma completo
SNC : sistema nervioso central		XLRP (<i>X-linked retinitis pigmentosa</i>): retinosis pigmentaria ligada al cromosoma X
SD- OCT (<i>Spectral Domain-OCT</i>): tomografía por		

2

ENUMERACIÓN
DE ARTÍCULOS

2. ENUMERACIÓN DE ARTÍCULOS

Tesis en formato de compendio de publicaciones:

La tesis consta de **4 objetivos** y **2 artículos**.

1

Autores: **Olaia Subirà**, Jaume Català-Mora, Jesús Díaz-Cascajosa, Noel Padrón-Pérez, M. A. Claveria, Natalia Coll-Alsina, Crystel Bonnet, Christine Petit, J. M. Caminal, Joan Prat

Título: ***Retinal findings in pediatric patients with Usher syndrome Type 1 due to mutations in MYO7A gene***

Eye (Lond). 2020; 34(3):499-506

SCImago Journal Rank 2019: **1r cuartil en el área de oftalmología**, indicador SJR: 1,148

Factor de impacto de 2.455 (JCR 2019)

2

Autores: **Olaia Subirà**, Jaume Català-Mora, Cristina del Prado, Jesús Díaz-Cascajosa, Marina Barraso Rodrigo, Estefanía Cobos, Cinthia Aguilera, Anna Esteve-Garcia, José García-Arumí, Josep M Caminal

Título: ***Optical coherence tomography biomarkers in MYO7A-inherited retinal dystrophy: longitudinal study in pediatric patients***

Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology. 2024

SCImago Journal Rank 2023 (último año publicado): **1r cuartil en el área de oftalmología**, indicador SJR: 1,014

Factor de impacto de 2.4 (JCR 2023, último año publicado)

3

RESUMEN

3. RESUMEN

Título

Estudio de las alteraciones retinianas en pacientes con síndrome de Usher de edad pediátrica

Introducción

Las capas externas de la retina son las primeras en verse afectadas en pacientes con retinosis pigmentaria en el contexto de síndrome de Usher tipo 1 (USH1) secundario a mutaciones del gen *MYO7A*. Sin embargo, existe controversia con respecto a la ubicación exacta de *MYO7A* en la retina y si la enfermedad resultante de las mutaciones de este gen se produce primariamente a nivel del epitelio pigmentario de la retina o bien a nivel de los fotorreceptores.

Hipótesis

La retinopatía secundaria a mutaciones en *MYO7A* produce primariamente un daño a nivel de los fotorreceptores y la tomografía por coherencia óptica (OCT) es una herramienta diagnóstica útil para detectar los primeros signos de la enfermedad y monitorizar su evolución.

Objetivos

- **Principal:** establecer en que localización anatómica de la retina se producen los primeros daños secundarios a mutaciones del gen *MYO7A* en pacientes pediátricos diagnosticados de USH1.
- **Secundarios:** describir las alteraciones retinianas detectadas por OCT y comparar estos hallazgos con informes publicados previamente, así como, determinar qué parámetros de OCT proporcionan los datos más útiles para controlar la progresión de la enfermedad y estudiar la correlación entre las alteraciones estructurales detectadas y la mejor agudeza visual corregida (BCVA, de sus siglas en inglés).

Métodos

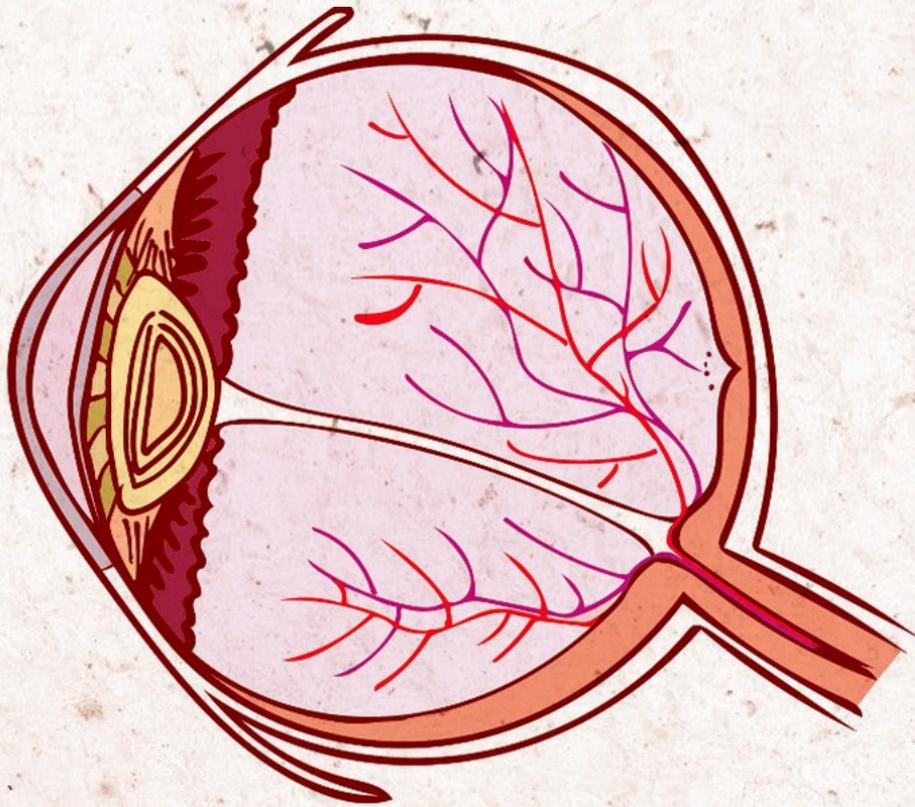
Un total de cincuenta y dos ojos de 26 pacientes con USH1 y diagnóstico genético de mutación *MYO7A* se sometieron al examen con SS-OCT. El área subfoveal y macular se analizó utilizando 12 barridos radiales de 12,0 mm. Se evaluaron las anomalías estructurales y se correlacionaron con el tiempo de seguimiento y la agudeza visual.

Resultados

La edad media de los pacientes fue de $9,92 \pm 4,1$ años. El tiempo medio de seguimiento fue de $43 (\pm 3,2)$ meses. Las anomalías cualitativas más comunes en el área subfoveal fueron alteraciones en los segmentos externos de los fotorreceptores (76,9% de los ojos) y en la zona de interdigitación (IZ) (80,8%). La presencia de edema macular quístico (EMQ) al inicio del estudio se asoció de forma independiente con una menor agudeza visual en la evaluación final (estimación = 0,142; $t(45,00) = 2,78$, p-valor = 0,009). La anchura media de las capas elipsoide (EZ) e IZ disminuyó significativamente a lo largo del seguimiento (en $668 \mu\text{m}$ y $278 \mu\text{m}$, respectivamente; ambas $p < 0,001$).

Conclusiones

Los hallazgos de este estudio sugieren que la base fisiopatológica del síndrome de Usher en etapa temprana pueden ser cambios en las capas externas de la retina, concretamente en el punto de unión entre los fotorreceptores y las microvellosidades del epitelio pigmentario de la retina (EPR). Nuestros datos ponen de manifiesto el valor potencial de la medición del elipsoide y la anchura de la IZ durante el seguimiento para evaluar la progresión de la enfermedad, y el valor de la monitorización de la aparición de lesiones quísticas como biomarcador de peor pronóstico visual en pacientes con USH1 secundario a mutaciones del gen *MYO7A*.



4

INTRODUCCIÓN

4. INTRODUCCIÓN

La visión es el sentido por el que percibimos el entorno a través los ojos. A menudo se equipara el ojo a una cámara fotográfica, pero este símil es sumamente simplista, ya el ojo es un órgano mucho más complejo que cualquier artilugio construido por el ser humano. Todas las partes del ojo humano son importantes para percibir correctamente el entorno, pero sin duda, la parte más importante para este proceso es la retina. La retina destaca como un tejido celular fotosensible, responsable de convertir las señales luminosas en mensajes bioquímicos y éstos en impulsos eléctricos, para posteriormente, transmitir estos impulsos hasta el cerebro a través de las células ganglionares. (1) Este proceso nos permite establecer las características (geometría, movimiento, color, textura o brillo) de todos los elementos que nos rodean.

En los últimos años, la comunidad científica se ha volcado en intentar comprender la estructura y funcionamiento de la retina, interpretando que la retina no es más que una prolongación del cerebro y, por lo tanto, un modelo relativamente simplificado y abordable del sistema nervioso central (SNC), de manera que, comprender el funcionamiento de la retina, nos ayudará a abordar el complejo funcionamiento del resto de SNC. Por este motivo, en las últimas décadas se han ido definiendo una gran cantidad de conceptos sobre la retina, tanto anatómicos, fisiológicos como bioquímicos, entre los que destacan las descripciones anatómicas de Santiago Ramón y Cajal (1892) de los distintos tipos celulares que conforman la retina de los vertebrados. (2)

Tomando como base estos conocimientos, recientemente, se han producido grandes avances en el campo de la genética aplicada en el sistema visual. Comprender mejor cuáles son los mecanismos moleculares subyacentes a cualquier proceso biológico y qué mecanismos fallan en las distintas enfermedades retinianas, nos conducirá a encontrar un tratamiento eficaz a las mismas, ya sea a través de fármacos, implante de dispositivos electrónicos o terapia génica.

Con este trabajo pretendemos aportar nuestro pequeño grano de arena al conocimiento de la fisiopatología del síndrome de Usher, centrándonos en los primeros hallazgos patológicos de la retina de pacientes de edad pediátrica, con la finalidad de ayudar a asentar las bases que permitan establecer posibles vías de tratamiento en el futuro.

4.1. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DE LA RETINA

El objetivo de este capítulo es brindar una visión general acerca de la anatomía y fisiología de la retina, que nos ayude a comprender la fisiopatología de la retinosis pigmentaria en el síndrome de Usher. Para ello, centraremos nuestra atención en las estructuras anatómicas y procesos fisiológicos involucrados en esta enfermedad, como son los fotorreceptores y el proceso de fotorrecepción, pero también trataremos de profundizar en el análisis de otras estructuras celulares que, aunque menos reportadas, podrían estar involucradas en la fisiopatología de la retinosis pigmentaria (RP) como son las células del epitelio pigmentario.

4.1.1. Anatomía funcional de la retina

Dentro de las 3 capas que revisten el globo ocular de los animales vertebrados (esclera, coroides y retina), la retina es la más interna de las tres. (3) Podemos diferenciar dos regiones anatómicas retinianas: la retina anterior o ciega que reviste la cara posterior del cuerpo ciliar, los procesos ciliares y el iris y la retina posterior o sensitiva encargada de la percepción visual, gracias a su sensibilidad a la luz. (figura 1) Esta región posterior, no solo tiene función receptora, sino que también se encarga de integrar y codificar una respuesta eléctrica compleja que contiene la información sobre los elementos del entorno (forma, luminosidad, color y movimiento) que es transmitida al cerebro a través del nervio óptico. Como estructuras bien diferenciadas de la retina sensitiva o posterior, encontramos la papila del nervio óptico, que corresponde al punto ciego de la retina, mediante el cual los axones de las células ganglionares abandonan la retina para formar el nervio óptico, y la mácula, el área de la retina que se sitúa en la parte final del eje visual y mide unos 5 mm de diámetro. En el centro de la mácula, encontramos la fovea, que mide aproximadamente 1,5 milímetros de diámetro y posee la mayor concentración de conos y, por lo tanto, es la región de la retina que se encarga de la visión de mayor precisión y nitidez.

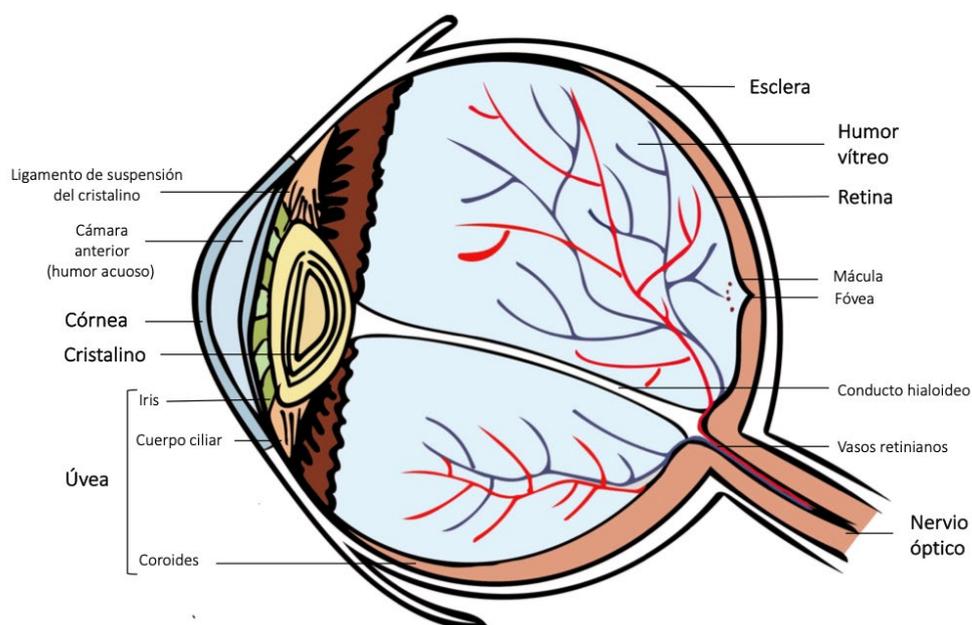


Figura 1. Estructura del globo ocular. (figura original)

4.1.2. Histología básica de la retina

De forma simplificada, la retina fotosensible se puede diferenciar en distintas capas identificables mediante microscopía: el epitelio pigmentario de la retina, las capas neuronales de la retina y las membranas limitantes externa e interna.

Si observamos un corte transversal de la retina humana, encontramos una estructura estratificada compleja, que no deja de ser una sucesión de relevos neuronales interconectados. (figura 2)

1. **Fotorreceptor (FR):** constituye la **primera neurona** de la vía visual. Se diferencia en capa de conos y bastones y juntos configuran la capa nuclear externa. Los FR transducen la señal lumínica y establecen sinapsis en la capa plexiforme externa con la siguiente neurona: la célula bipolar.
2. **Célula bipolar:** constituye la **segunda neurona** y se encuentran en la capa nuclear interna. Se encargan de recibir la información, enviada por la primera neurona, y emitirla a través de sus axones a la capa plexiforme interna, estableciendo contacto con la tercera neurona: la célula ganglionar.
3. **Célula ganglionar:** constituye la **tercera neurona** y se encuentra en la capa de células ganglionares. Los axones de estas células se dirigen hacia la papila del nervio óptico formando la capa de fibras del nervio óptico.

El espesor medio de la retina en un ojo normal es de unas 300 micras excepto en la fóvea que forma una depresión en la retina cuyo espesor es de unas 185 micras y difiere estructuralmente al resto de la retina: histológicamente, la depresión que la configura provoca que las capas más internas de la retina -células bipolares y ganglionares- estén muy aplanadas y próximas entre sí, lo que permite que la luz alcance directamente a los conos, que se encuentran a mucha mayor concentración que en el resto de la retina y son la única célula fotosensible de la mácula. Para iniciar el proceso de fototransducción en el FR, es decir, para convertir el estímulo luminoso en una señal electroquímica o impulso nervioso, la luz debe de atravesar todas las capas de la retina, por lo que, esta diferencia estructural de la fóvea se traduce en una mejora de la nitidez y el detalle en la percepción y en la imagen que se forma en la mácula.

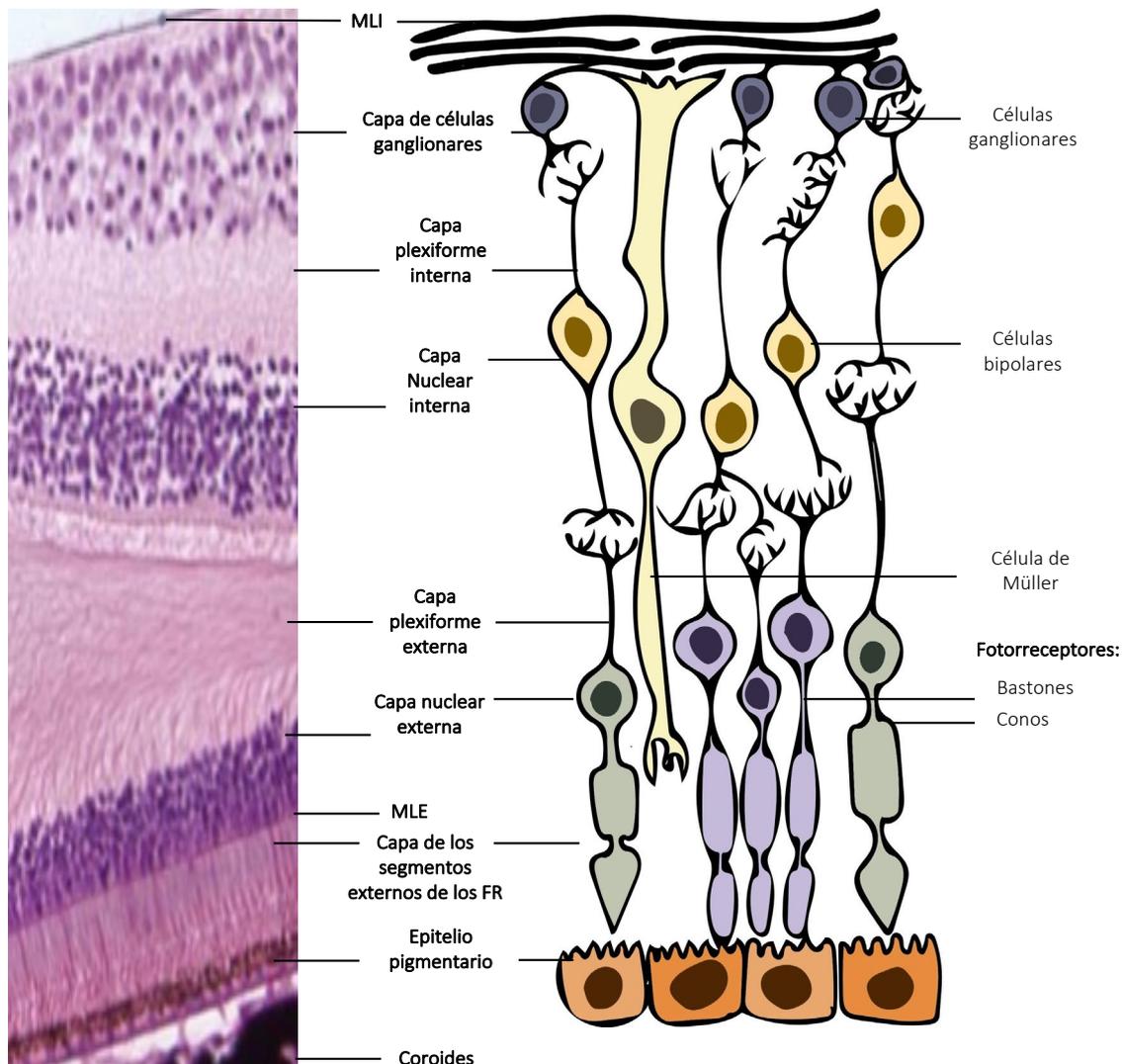


Figura 2. Corte histológico transversal de la retina que muestra las distintas capas y conexiones neuronales y su interpretación esquemática. (figura modificada de *Vecino y colaboradores*)(4)

4.1.3. Composición celular de la retina

En 1892, Ramón y Cajal describió detalladamente la estructura celular de la retina en los animales vertebrados. (2) (figura 3) A pesar de haber pasado más de un siglo desde entonces, hoy en día sus esquemas anatómicos y algunas de sus interpretaciones funcionales siguen vigentes. No obstante, mediante el empleo de técnicas más sofisticadas como la microscopía electrónica, las tinciones de inmunohistoquímica o el uso de la tomografía por coherencia óptica (OCT) de alta resolución, se ha conseguido definir con exactitud los tipos celulares en las diferentes capas de la retina y sus funciones concretas, a la vez que se han ido describiendo las distintas vías neuronales que codifican toda la información del sistema visual, así como, las vías metabólicas imprescindibles en la funcionalidad de la retina como es la cascada de fototransducción.

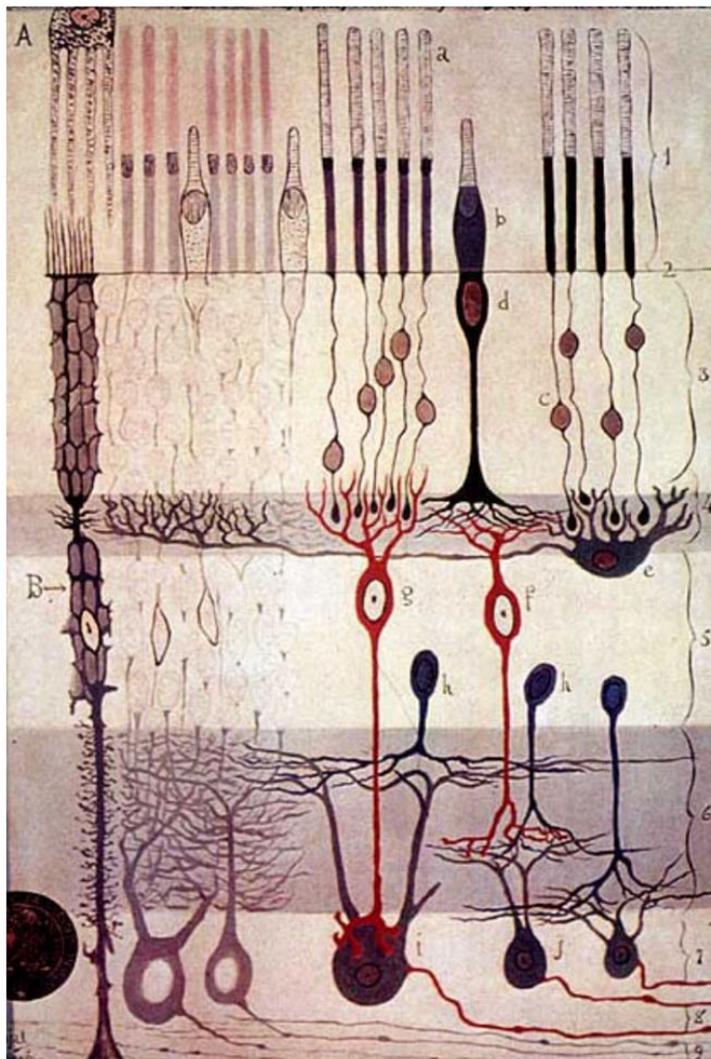


Figura 3. Esquema realizado por Santiago Ramón y Cajal en 1892, en el que se muestra la estructura de la retina de los vertebrados, ilustrando los principales tipos celulares.

4.1.3.1. Epitelio pigmentario de la retina (EPR)

El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es la capa más externa de la retina, está en contacto con otras dos capas: la coroides, mediante su zona basal (el EPR se encuentra fuertemente adherido a la membrana de Bruch de la coroides) y con los FR, mediante su zona apical. (figura 4) Debe su nombre a su aspecto macroscópico de color negro, el cual es debido al gran número de gránulos de pigmento, que se localizan principalmente en el citoplasma apical. Microscópicamente, está formado por células columnares que contienen melanina. Estas células poseen microvellosidades y vainas cilíndricas en el polo apical de su membrana plasmática, las cuales envuelven a los segmentos externos de los FR. (5)

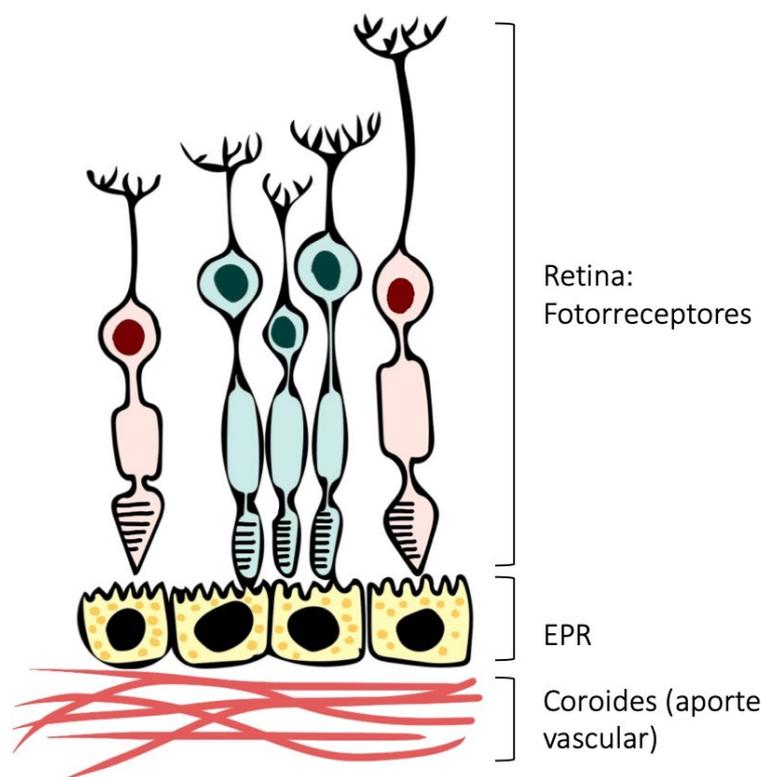


Figura 4. Interconexiones del epitelio pigmentario de la retina con los fotorreceptores y la coroides. (figura original)

Las funciones del EPR son básicas para el proceso visual y la supervivencia de los FR y los capilares coroides, ya que la destrucción mecánica o química del EPR, conduce a la atrofia de FR y vasos coroides. (6) Entre las funciones específicas del EPR destacan: (7)(8)(9)(figura 5)

- 1. Barrera hematorretiniana externa y privilegio inmunológico:** el EPR es en sí mismo una barrera entre la circulación coroidea y las capas externas de la retina. Esta característica se consigue mediante las uniones estrechas entre las superficies laterales del epitelio, que confiere a la retina interna un aislamiento de las influencias sistémicas, otorgándole un privilegio inmunológico.
- 2. Fagocitosis de los discos y segmentos externos de los fotorreceptores:** los segmentos externos de los FR están expuestos a un estrés fotooxidativo, por lo que sufren una destrucción constante. Este hecho hace que los FR se renueven continuamente al desprenderse de su extremo, que es fagocitado y digerido por el EPR.
- 3. Transporte epitelial:** un transporte altamente selectivo de sustancias para un entorno estrictamente controlado. El EPR suministra nutrientes a los FR, controla la homeostasis de iones y elimina agua y metabolitos desde el espacio subretiniano.
- 4. Absorción de la luz:** esta acción mejora la calidad del sistema óptico. La alta perfusión de la retina comporta un ambiente de alta tensión de oxígeno, de manera que, la combinación de luz y oxígeno genera estrés oxidativo. Mediante la síntesis de melanina en los melanosomas se absorbe la luz excedente que no es capturada por los FR, reduciendo así el estrés fotooxidativo.
- 5. Ciclo visual:** contribuye de manera fundamental al ciclo visual, manteniendo la excitabilidad de los conos y bastones al ser un reservorio de vitamina A que cede periódicamente a los FR en el proceso de la fototransducción. La visión con intensidades de luz bajas requiere una tasa de rotación más baja del ciclo visual, mientras que, durante la exposición a la luz, la tasa de rotación es mucho mayor.
- 6. Amortiguación espacial iónica:** los cambios en el espacio subretiniano son rápidos y precisan una compensación por parte del EPR, ya que el transporte transepitelial usual de iones sería demasiado lento para compensar con la suficiente rapidez estos cambios. (10) El proceso de fototransducción implica la participación de varias células, si éstas no se compensaran, ya no serían excitables y la transducción no sería posible. (11)
- 7. Secreción:** el EPR interactúa estrechamente con los FR, pero también con el endotelio de la coriocapilar. Para poder comunicarse con los tejidos adyacentes, el EPR es capaz de secretar una gran variedad de factores crecimiento y moléculas de señalización como los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF-1, FGF-2 y FGF-5), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento del endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento

similar a la insulina-1 (IGF-1), factor de crecimiento derivado del epitelio del cristalino (LEDGF), interleucinas o factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), entre otros.

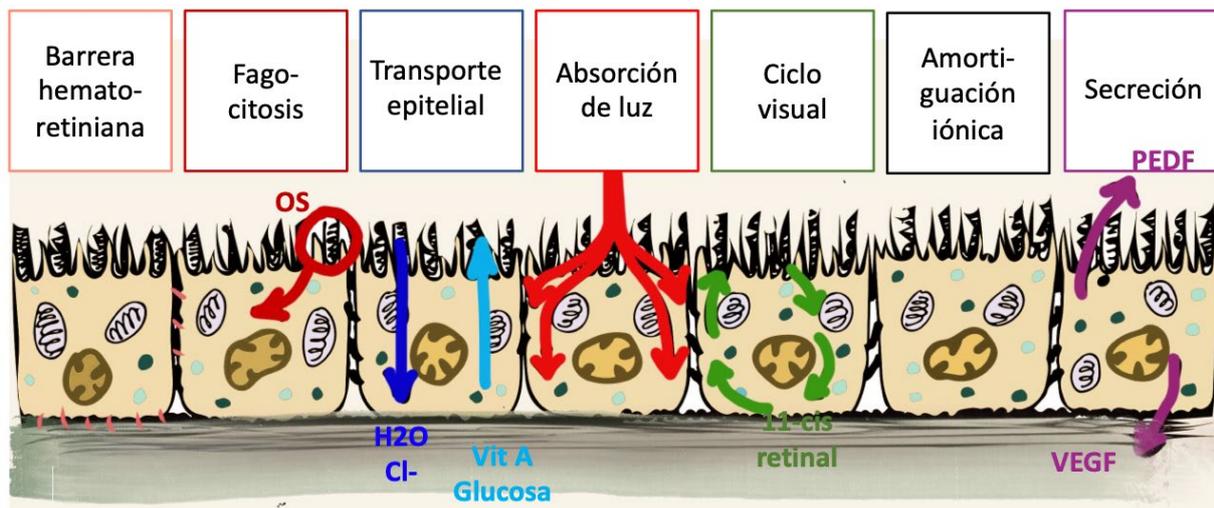


Figura 5. Esquema representativo de las funciones principales del epitelio pigmentario de la retina. OS: segmentos externos ; H₂O: agua; Cl⁻: Cloro; Vit A: vitamina A; PEDF: factor derivado del epitelio pigmentario; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular. (figura modificada de *Olaff Strauss*)(9)

Así como es bien conocida la disfunción del EPR en el albinismo, hasta hace relativamente poco no se conocía ningún gen relacionado con una función concreta del EPR que hubiera aparecido alterado en procesos degenerativos de retina. No obstante, en las últimas décadas, han surgido estudios que respaldan la hipótesis de que las funciones específicas de las células del EPR podrían estar alteradas en algunas formas de distrofias retinianas como la retinosis pigmentaria (RP). (12) En este sentido, destaca el descubrimiento en el año 1997 de tres grupos de investigación independientes que encontraron mutaciones relacionadas con la RP y la amaurosis congénita de Leber en dos genes expresados en el EPR y relacionados con el ciclo de la vitamina A (RPE65 y CRALBP). (13)(14)(15)

4.1.3.2. Fotorreceptores: conos y bastones

Los FR son neuronas especializadas sensibles a la luz, localizadas en la retina externa de los vertebrados. Se trata de las células más abundantes de la retina y unas de las células más especializadas y complejas de nuestro organismo, responsables del proceso de fototransducción. Se dividen en conos y bastones:

- **Conos:** encargados de la visión diurna y en color; su fotopigmento es la opsina. A su vez, los conos se pueden subdividir, de acuerdo con el fotopigmento que contienen en: rojos, verdes y azules.
- **Bastones:** encargados de la visión nocturna y en blanco y negro; su pigmento es la rodopsina.

La distribución y tipología de los FR varía enormemente dependiendo de la región de la retina en la que se encuentren. Así, la fovea es la región que contiene mayor densidad de FR y los subtipos más frecuentes en esta localización son los conos verdes y rojos. (16) La densidad de FR desciende progresivamente cuanto más nos alejamos de la fovea, reduciéndose el porcentaje de conos rápidamente y, en consecuencia, disminuye también la agudeza visual. Por consiguiente, mientras que en la fovea, encontramos conos verdes y rojos de forma casi exclusiva, en la retina periférica, los bastones son los FR predominantes. (17) (figura 6)

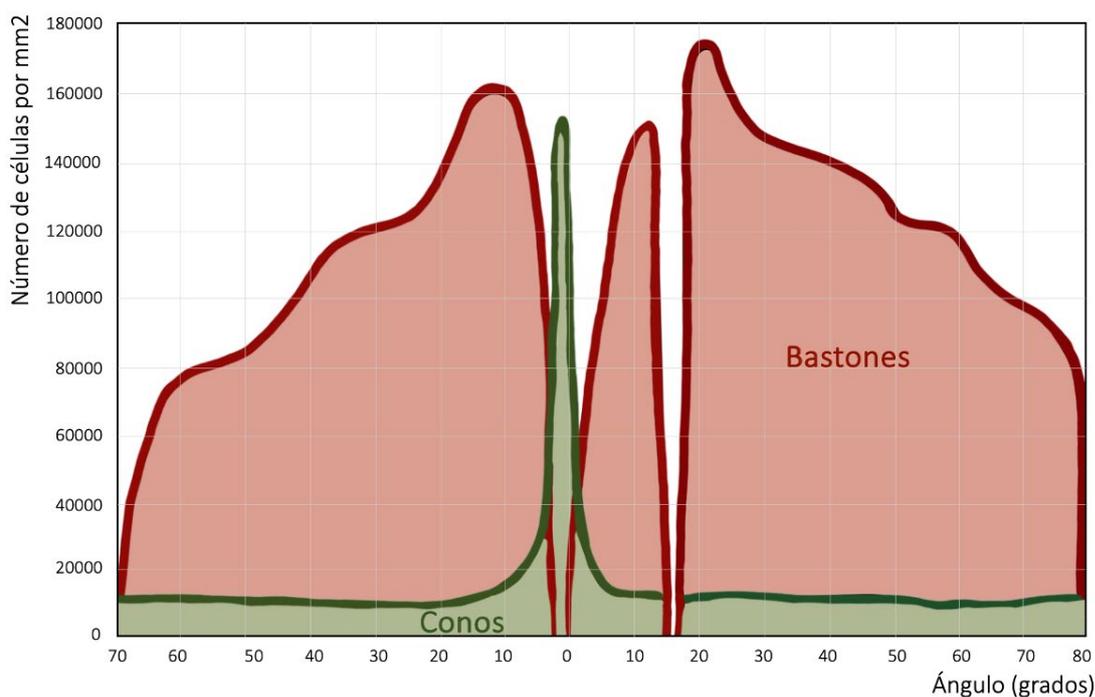


Figura 6. Gráfica de distribución de la densidad de conos (verde) y bastones (rojo) en la retina. (figura modificada de Osterberg, 1935)(17)

Podemos definir los FR como células nerviosas alargadas, con una función específica: la fototransducción. Neuroanatómicamente, deben considerarse como la primera neurona de la vía visual. Los conos y bastones tienen una morfología común, contienen varias regiones en las cuales se realizan funciones específicas: un segmento externo, un segmento interno, un cuerpo celular y un terminal sináptico. (figura 7)

Segmento externo de los FR

El segmento externo de los FR es una prolongación celular que adopta la forma de cono o bastón, de modo que esta porción es la encargada de diferenciar a los dos tipos de FR. Además, los segmentos externos de los FR constituyen la región sensorial de la célula y están estrechamente vinculados al EPR tanto en términos anatómicos como funcionales. Alrededor del 40% del segmento externo contiene el pigmento que se activa con la luz (fotoactivación) y desencadena la cascada bioquímica de la fototransducción. (18) En este proceso participan segundos mensajeros y numerosas proteínas que, mediante complejas reacciones bioquímicas, regulan la apertura y cierre de canales en la membrana del FR, permitiendo el flujo de iones de sodio y calcio. Esta circulación de iones determina la polarización o despolarización de la célula, lo que a su vez controla la liberación o retención de neurotransmisores en el terminal sináptico, localizado en el extremo opuesto de la célula.

Ultraestructuralmente, los segmentos externos de los FR están constituidos por microvesículas que forman discos. En los bastones estos discos se encuentran apilados y rodeados de la membrana plasmática, mientras que en los conos, los discos están formados por repliegues de la propia membrana. Es en este nivel donde podemos localizar el pigmento fotosensible (opsina en el caso de los conos y rodopsina en el caso de los bastones) responsable de iniciar el proceso de fototransducción. (19) Tal y como se ha mencionado anteriormente, estas estructuras no son estáticas, sino que parecen estar sujetas a un proceso de reciclaje continuo, migrando hacia el extremo del FR de manera progresiva y siendo fagocitadas y digeridas por el EPR.

Segmento interno de los FR

Separando el segmento externo del segmento interno se encuentra un cilio conector que tiene una estructura similar a los cilios o flagelos presentes en otras células. Este cilio actúa como un conducto para el transporte de vesículas entre los dos segmentos de los FR.

Ultraestructuralmente, esta estructura se divide en dos partes: elipsoide y mioide; en la primera se encuentran numerosas mitocondrias, mientras que en la segunda, reside la maquinaria de síntesis de macromoléculas y se encarga de aportar la energía requerida para el proceso de fototransducción. De hecho, los FR son las células de nuestro cuerpo que más oxígeno consumen y más energía generan. Debido a la alta actividad metabólica de los FR, son las únicas células que tienen una región rica en mitocondrias, como es la elipsoide. (figura 7)

La parte más interna del segmento interno de los FR está compuesta por el núcleo y el cuerpo sináptico, donde se produce el primer relevo de la vía visual, al establecerse la sinapsis con las células bipolares y horizontales, mediante la liberación de neurotransmisores (glutamato). El polo sináptico presenta una estructura compleja que varía entre conos y bastones. Aparte de las sinapsis químicas establecidas por los FR con las células bipolares y las células horizontales, la microscopía electrónica ha permitido identificar uniones tipo gap entre los conos y bastones, las cuales podrían ser cruciales durante los procesos de adaptación a la luz y a la oscuridad. (20)

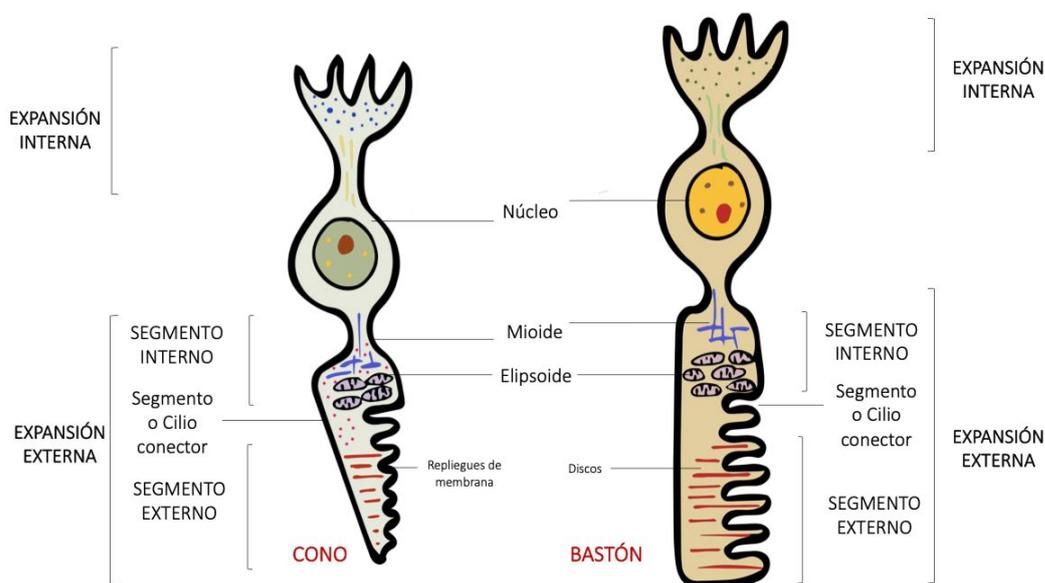


Figura 7. Esquema de la estructura interna de los dos tipos de fotorreceptores (imagen propia)

Como se mencionó previamente, la conversión de la luz en señales visuales se ejecuta en los discos del segmento externo de los FR (figura 7). De manera sintetizada, podemos decir que el fotorreceptor funciona como un sensor de luz, cambiando su potencial de membrana en respuesta al estímulo luminoso, lo cual desemboca a la liberación de glutamato al espacio sináptico en la capa plexiforme externa.

Hasta hace poco tiempo, los FR eran las únicas células sobre las que habían sido claramente reconocidas alteraciones genéticas como causa directa de la RP. En este sentido, se han descrito mutaciones en proteínas involucradas en la cascada bioquímica de la fototransducción(21), alteraciones en proteínas estructurales del segmento externo del FR(22), así como alteraciones en el metabolismo de la vitamina E(23) y apoptosis celular.

4.1.3.3. Células bipolares

Las células bipolares representan la segunda neurona de la vía visual: establecen sinapsis principalmente con los FR, pero también con las células horizontales, en la capa plexiforme externa y emiten sus axones a la capa plexiforme interna, donde se produce el tercer relevo sináptico, conectando con las dendritas de dos células diferentes: la célula ganglionar y la célula amacrina. (24)

Existen diversas clasificaciones de las células bipolares en función de su anatomía, número de conexiones sinápticas, estructura de las conexiones, patrón de respuesta a la luz, etc.

En 1892, Ramón y Cajal ya describió dos tipos fundamentales de células bipolares: unas que se relacionaban únicamente con conos y otras exclusivamente con bastones, de forma que se denominan células bipolares de bastones o bipolares de conos. (2) Por otro lado, histológicamente, las células bipolares se dividen en dos tipos: las monosinápticas, que se conectan con un solo FR (siempre un cono) y las difusas, que pueden establecer contacto con dos o más FR (conos o bastones).

Según la forma en que se conectan con los conos a nivel de la capa plexiforme externa, las células bipolares de los conos se clasifican en tres tipos: invaginada (con una invaginación en su conexión con el cono para formar la clásica triada, y conectan lateralmente con las células horizontales), plana (realizan una sinapsis plana con el pedículo sináptico del cono) y semiinvaginada (establecen un tipo intermedio de conexión entre las dos anteriores). (25) (figura 8)

En cuanto a su patrón de respuesta ante la luz, se han descrito células bipolares de conos “On” y “Off”. Estos términos, así como “centro-periferia”, se refieren al mismo principio. Las células ganglionares de centro o “On” se activan cuando la parte central de su campo receptivo recibe luz y la periferia no, mientras que en las células “Off” o de periferia ocurre lo contrario. Las células “On” parecen estar especializadas en detectar aumentos de la intensidad luminosa, mientras que células ganglionares “Off” responden ante la disminución de la intensidad de la luz. Sin embargo, el antagonismo centro-periferia es relativo, ya que lo que realmente determina la respuesta de una célula ganglionar “On” o “Off” no es la intensidad absoluta de la luz, sino la diferencia entre la luz que incide en el centro y la que llega a la periferia de su campo visual. De manera que esta diferenciación a nivel de las células bipolares es esencial para que el sistema visual detecte contrastes sutiles y pequeñas variaciones en la intensidad de la luz, con independencia de la luz global. (26)(27)

Llegado este punto, es relevante mencionar que la respuesta dicotómica generada por las células bipolares se debe a la expresión diferencial de varios receptores de glutamato que se encuentran en sus dendritas, en la capa plexiforme externa.

El papel que la célula bipolar puede jugar en la fisiopatología de la RP se desconoce hoy en día. Sin embargo, hay indicios que sugieren una posible conexión, como son:

1. La observación de cambios degenerativos en la retina de ratones cuando se bloquean los segundos mensajeros de los receptores de glutamato. (28)
2. La identificación del receptor de glutamato GRM8 en el mismo locus que el gen *RP10* en el genoma humano, lo que lo posiciona como un candidato plausible para la RP. (29)

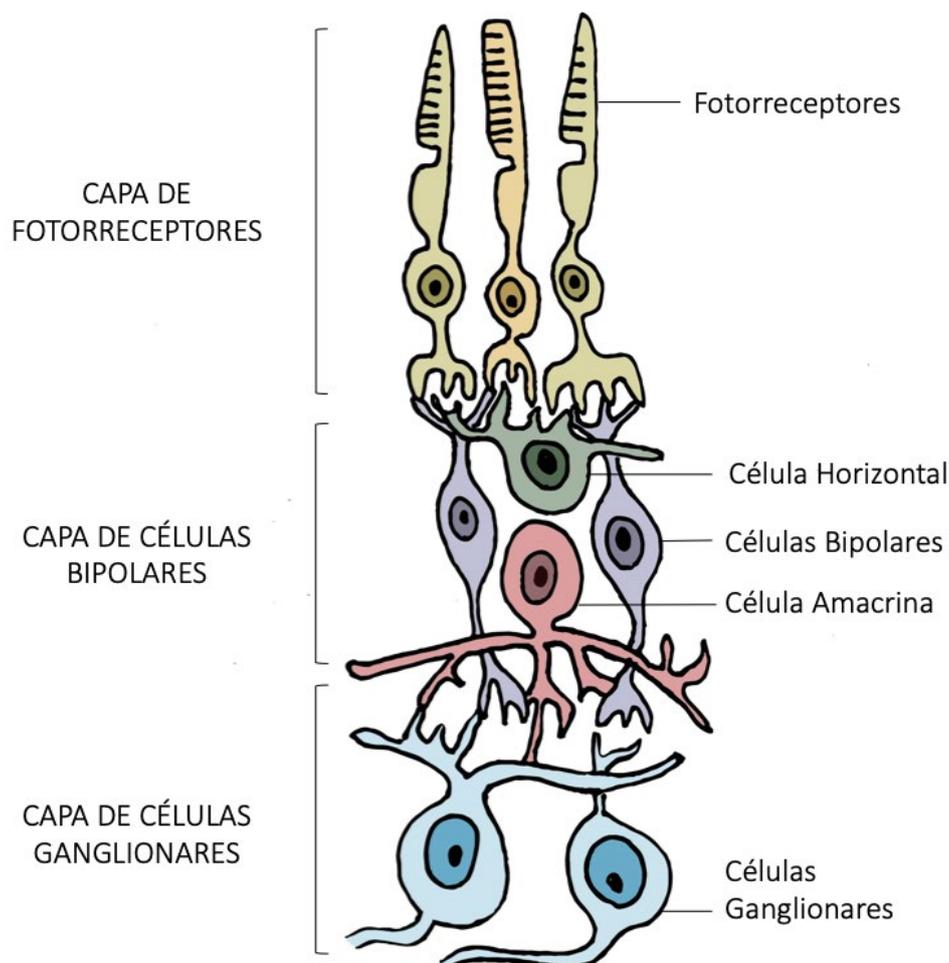


Figura 8. Esquema del relevo sináptico establecido en la vía visual. (imagen propia)

4.1.3.4. Células horizontales

Las células horizontales (CH) son neuronas que se interconectan lateralmente en la retina de los animales vertebrados. Sus cuerpos celulares se localizan en la capa nuclear interna, mientras que sus amplios árboles dendríticos y axones se encuentran en la capa plexiforme externa.

La comprensión sobre estas neuronas se inició con los estudios de Ramón y Cajal en 1892. (2) Durante años, se cuestionó si estas células poseían características propias de células gliales debido a su estructura y función. Sin embargo, el uso de microscopía electrónica para examinar sus conexiones sinápticas confirmó su naturaleza neuronal. (30)

Las terminaciones dendríticas de las CH establecen sinapsis con los FR y las células bipolares. Se estima que una sola célula horizontal puede conectar con miles de bastones. Según sus patrones de conexión, se han identificado tres tipos de células horizontales: H1, H2 y H3. Las CH H1 se conectan tanto con circuitos de conos como de bastones, mientras que las H2 y H3 están exclusivamente asociadas a los circuitos de conos. (31)

Se han postulado múltiples funciones de las CH, aunque lo cierto es que, hoy en día, las funciones específicas de estas células no se conocen con exactitud. Dado que son neuronas gabaérgica (utilizan el neurotransmisor inhibitorio ácido gamma-aminobutírico o GABA) se supone que participan en la retroalimentación y modulación de las distintas vías visuales descritas, incluyendo la inhibición lateral. Concretamente, se cree que envían señales inhibitorias hacia los FR, (32) (33) integrando información de sus campos receptivos en la capa plexiforme externa. A su vez, estos pequeños circuitos locales, generados en la capa plexiforme externa, proporcionan a las células bipolares información sobre un campo receptivo antagonista, lo que sugiere que las CH desempeñan un papel clave en la percepción del contraste y la adaptación a la luz. (34)

4.1.3.5. Células amacrinas

Ramón y Cajal acuñó el término “amacrina” para describir células que carecen de axón. Estas células son interneuronas que se encuentran predominantemente en la capa plexiforme interna, la cual constituye la segunda capa sináptica de la retina, donde las células bipolares y ganglionares establecen conexiones sinápticas. (1)

Se sabe relativamente poco sobre las funciones de las células amacrinas. La complejidad de sus funciones se evidencia en la existencia de más de 40 tipos diferentes de neuronas amacrinas. Se cree que, al igual que las CH, las células amacrinas transmiten señales lateralmente en la retina a través de sus extensos árboles dendríticos, contribuyendo así a la inhibición de la retroalimentación de las células bipolares y ganglionares.

Cada tipo de célula amacrina se conecta con un tipo específico de célula bipolar y generalmente utiliza un neurotransmisor particular. De hecho, otro dato que consolida la teoría de la diversidad funcional de estas células es que se han identificado múltiples neurotransmisores reactivos para algún subtipo de célula amacrina (GABA, Acetilcolina, Glicina, Dopamina, Somatostatina, etc). Este dato ha sido interpretado por diversos autores con la idea de que la retina ha desarrollado un sistema sofisticado de modulación dependiente de la luz para ajustar su respuesta de manera precisa. Es importante destacar que la retina tiene una capacidad significativa de autorregulación, ya que recibe escasas influencias externas que modulen su actividad. (16)

4.1.3.6. Células ganglionares

Las células ganglionares representan la última conexión sináptica para la información visual en la retina antes de ser enviada al cerebro. Tal y como se ha mencionado anteriormente, éstas reciben la información de los FR a través de dos tipos de interneuronas: las células bipolares y las células amacrinas.

Sus somas se encuentran en la capa de células ganglionares y envían sus largos axones para formar el nervio óptico, que sale de la retina por el punto ciego y hace relevo sináptico en el núcleo geniculado lateral del cerebro.

La función principal de estas células consiste en extraer la información de las diferentes características de la imagen (como el contraste, el color, el movimiento, la textura o el nivel de luz absoluto) y enviarla al SNC. (35)(36)

Actualmente se cree que existen al menos 18 tipos diferentes de células ganglionares en la retina humana, todas ellas funcional y morfológicamente distintas. La ubicación, tipo celular y la extensión de sus ramificaciones dendríticas determinan los diferentes circuitos presentes en la retina. (37)

4.1.3.7. Células gliales: células de Müller

Las células gliales, también conocidas como glía, son componentes del tejido nervioso que proporcionan soporte a las neuronas, las cuales son cruciales para la función nerviosa. Estas células forman una matriz interneural, compuesta por una gran variedad de células estrelladas y fusiformes, que se distinguen de las neuronas principalmente porque no establecen conexiones sinápticas. Las membranas de las células gliales contienen canales iónicos y receptores que les permiten detectar cambios en el entorno. Además, desempeñan un papel activo en la regulación de la composición iónica, los niveles de neurotransmisores, así como de factores de crecimiento o citoquinas.

Los cortes histológicos de la retina revelan la presencia tanto de células gliales tipo astrocitos como de microgliales, siendo la célula de Müller la más destacada entre todas las células gliales.

Las células de Müller fueron descritas por primera vez por Heinrich Müller. (38) Estas células están dispuestas verticalmente en relación a las capas de la retina y son de gran tamaño, ya que se extienden a lo largo de todas ellas: sus núcleos se encuentran en la capa nuclear interna y sus prolongaciones se extienden desde la limitante externa (donde forman uniones adherentes con los segmentos internos de los FR) hasta la limitante interna (donde terminan como elementos aplanados -pies terminales- rodeando vasos sanguíneos y manteniendo contacto con el humor vitreo). A medida que atraviesa las diferentes capas, la célula de Müller cubre los cuerpos y dendritas de los diversos tipos celulares mencionados anteriormente. (39)

La célula de Müller expresa numerosos canales iónicos, así como receptores para neurotransmisores; esto le permite regular del entorno extracelular y, en consiguiente, modular la actividad neuronal. Por tanto, podemos decir que la célula de Müller desempeña un papel fundamental en el control de la homeostasis de las células de la retina. (1)(40)

4.2. ENFERMEDADES HEREDITARIAS DE LA RETINA: DISTROFIAS RETINIANAS

Las distrofias hereditarias retinianas (DHR) son enfermedades genéticas poco comunes y variadas que afectan crónicamente la retina, causando gran diversidad de manifestaciones clínicas, entre las que destaca la pérdida progresiva y severa de visión, a causa de alteraciones anatómicas y/o funcionales de la retina. Generalmente, se produce una disfunción de los FR y/o del EPR, pero también puede deberse a alteraciones en la coriocapilar. El deterioro de la visión puede variar desde una mala visión periférica o nocturna hasta la ceguera total, y la gravedad suele aumentar con la edad.

Como se ha indicado anteriormente, las distrofias retinianas tienen un origen genético que puede transmitirse de generación en generación mediante diferentes patrones: herencia autosómica recesiva, herencia autosómica dominante y herencia ligada al cromosoma X. Además, aunque menos frecuentemente, también se han descrito casos esporádicos por aberraciones cromosómicas. (41)

Debido a su baja prevalencia en la población, las distrofias retinianas son consideradas enfermedades minoritarias o “raras”. Se calcula que afectan a 1 de cada 3000-5000 personas en Europa y Estados Unidos, mientras que, en España, se ha estimado que existen más de 15.000 personas afectadas según el estudio PREVARET. (41)

Estas patologías se pueden clasificar en distintos grupos según el tipo de fotorreceptor afectado y las manifestaciones clínicas. Tal y como hemos visto en el capítulo anterior, podemos decir, *grosso modo*, que los conos son los responsables de la visión del color y en detalle, mientras que los bastones se encargan de la visión en la oscuridad y periférica. De esta manera, si tenemos en cuenta la afectación predominante de un tipo de fotorreceptor u otro, podemos clasificar las distrofias en 3 categorías: aquellas dominadas por daño en los bastones, las dominadas por afectación en los conos y las degeneraciones retinianas generalizadas que involucran a ambos tipos de fotorreceptores simultáneamente. De entre todas las DHR, las más comunes son la RP y la enfermedad de Stargardt/fundus flavimaculatus. (41)

Basándonos en las manifestaciones clínicas y la región anatómica afectada, podemos clasificar la mayor parte de DHR según se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1. Clasificación de las DHR según las manifestaciones clínicas y la afectación anatómica (tabla modificada de la *Guía de la Sociedad Española de Retina y Vítreo*)(41)

A. DISTROFIAS CON CEGUERA NOCTURNA
A.1.- Retinosis Pigmentaria (RP) o Distrofia de Bastones y Conos
A.1.a.- Formas aisladas de RP: típicas, atípicas y localizadas o segmentarias.
A.1.b.- Formas sindrómicas de RP: síndrome de Usher
A.2.- Coroideremia
A.3.- Atrofia Girata
A.4.- Ceguera Nocturna Congénita Estacionaria
B. DISTROFIAS CON AFECTACIÓN PRIMARIA DE CONOS
B.1.- Distrofias progresivas de conos y distrofias progresivas de conos y bastones
B.2.- Disgenesias no progresivas de fotorreceptores
B.2.a.- Monocromatismo congénito de bastones o Acromatopsia congénita
B.2.b.- Monocromatismo de conos
B.2.b.1.- Monocromatismo de conos rojos y verdes
B.2.b.2.- Monocromatismo de conos azules ligado a X
C. DISTROFIAS MACULARES
C.1.- Mutaciones en ABCA4: Enfermedad de Stargardt y Fundus Flavimaculatus
C.2.- Mutaciones en ELOVL4: Distrofia macular autosómica dominante Stargardt-like
C.3.- Distrofia Coroidea Areolar Central
C.4.- Distrofias maculares que cursan con drusas
C.4.a.- Drusas Dominantes
C.4.b.- Distrofia Pseudoinflamatoria de Sorsby
C.4.c.- Distrofia macular North Carolina
C.5.- Distrofia Macular Anular Concéntrica Benigna
C.6.- Distrofia Macular Oculta
C.7.- Distrofia Viteliforme Macular de Best
C.8.- Distrofias en patrón del Epitelio Pigmentario de la Retina
C.8.a.- Distrofia en patrón en Alas de Mariposa
C.8.b.- Distrofia Viteliforme del adulto
D. DISTROFIAS VITREORRETINIANAS
D.1.- Síndrome de Wagner-Stickler
D.2.- Retinosquisis Juvenil ligada a X
D.3.- Enfermedad de Goldman-Favre
D.4.- Vitreorretinopatía Exudativa Familiar

La mayoría de las distrofias retinianas son patologías localizadas, que afectan al ojo de forma exclusiva, aunque ocasionalmente pueden asociarse a manifestaciones extraoculares, como el síndrome de Usher. Cuando esto ocurre, se las denomina distrofias retinianas sindrómicas.

4.3. RETINOSIS PIGMENTARIA

El primer reporte de la retinopatía familiar asociada al hallazgo de pigmento en el fondo de ojo fue realizado por Donders en 1855. (42) El término “retinosis pigmentaria” (también conocida como retinitis pigmentaria, ceguera nocturna o hemeralopía congénita) es algo impreciso, ya que no hace referencia a una única enfermedad, sino que abarca un grupo de enfermedades hereditarias causadas por mutaciones en diversos genes (hasta ahora se han identificado más de 100 genes diferentes involucrados en esta enfermedad). Estas mutaciones provocan una degeneración progresiva de la retina que resulta en una pérdida gradual de la visión, especialmente en condiciones de poca luz, como la visión nocturna. (43)(44)(45)

La RP representa la principal causa de ceguera genética en adultos y afecta aproximadamente a 1 de cada 4000 personas, (46) aunque esta cifra puede variar según la ubicación geográfica, por lo que se considera una enfermedad minoritaria. Es más común en hombres, siendo el 60% de los afectados varones y el 40% mujeres. Se estima que hay alrededor de 25.000 personas afectadas en España. (47)

Tal y como ya se ha mencionado, se trata de una enfermedad congénita, no obstante, los síntomas generalmente no aparecen hasta la segunda década de la vida, y en muchos casos, los pacientes no notan ningún síntoma hasta estadios avanzados de la enfermedad.

Aunque durante años se ha dicho que, en las fases tempranas de la enfermedad, se produce un daño únicamente en los bastones, actualmente, numerosos estudios apuntan a que en realidad se afectan tantos bastones como conos, en mayor o menor grado, desde el principio. Esto sugiere la existencia de dos formas clínicas distintas, dependiendo de qué tipo de fotorreceptor presente disfunción en primer lugar. La forma más común es la que afecta tanto a bastones como a conos, donde las alteraciones funcionales de los bastones preceden a las de los conos (distrofia de bastones-conos). Esto se manifiesta con la pérdida de la visión nocturna (nictalopía) y la afectación del campo visual periférico. (1)

4.3.1. Síntomas de la retinosis pigmentaria

En la siguiente tabla se describen los síntomas que pueden manifestar los pacientes afectados de RP, siendo los más característicos la nictalopía y la afectación campimétrica.

Tabla 2. Resumen de los síntomas característicos de la RP

Nictalopía	Es generalmente el primer síntoma de debut de la enfermedad: los enfermos presentan dificultad en la adaptación a la oscuridad.
Disminución del campo visual	Suele aparecer después de la nictalopía. Es consecuencia de la afectación inicial de los bastones y se presenta como una disminución del campo visual periférico, conocida como “visión en túnel”. Clásicamente, al inicio se presenta una afectación anular de la periferia media y conforme avanza, afecta a la retina periférica y finalmente el campo central.
Fotofobia	La sensibilidad a la luz aumentada es frecuente. Suele aparecer en fases avanzadas de la enfermedad.
Fotopsias	Suelen presentarse entre la región central y periférica del campo visual.
Disminución de la agudeza visual	Típicamente, la agudeza visual permanece preservada hasta fases avanzadas de la enfermedad, conforme aparece el daño en los conos y el compromiso del área macular.
Discromatopsia	La capacidad para percibir colores se mantiene sin cambios hasta que los conos comienzan a deteriorarse, especialmente en el espectro de tonalidades que van desde el azul al amarillo.

4.3.2. Signos clínicos de la retinosis pigmentaria

- **Biomicroscopía:**

Si bien la opacidad del cristalino en forma de catarata subcapsular posterior es el hallazgo más frecuente en la edad adulta, la exploración del segmento anterior en niños con RP suele ser anodina.

La fisiopatología de la conformación de cataratas en la RP, así como el motivo de su organización típica en forma de subcapsular posterior, sigue hoy en día sin conocerse. Algunos autores han propuesto que la peroxidación lipídica puede ser la causante del desarrollo de la opacidad lenticular. (48)

- **Examen fundoscópico:**

En la exploración fundoscópica son característicos la palidez papilar, la constricción del diámetro vascular y el acúmulo de pigmento en la periferia media de la retina, denominados espículas óseas, como consecuencia de la degeneración precoz de los FR. Además, conforme avanza la enfermedad, se pueden observar

distintos grados de atrofia retiniana, que empieza presentándose en la periferia media y avanza hacia la retina más periférica y no afecta a la retina central hasta las fases más avanzadas. Estos cambios ocurren simultáneamente en los dos ojos, aunque en ocasiones el progreso de la enfermedad puede ser desigual entre ellos. (tabla 3) (figura 9)

Tabla 3. Resumen de las posibles alteraciones retinianas observables en el examen fundoscópico de los pacientes con RP

Estructura	Principales hallazgos patológicos
Papila óptica	Típicamente se describe como “pálida”, aunque puede presentarse sin alteraciones o incluso hiperémica. La palidez papilar parece estar relacionada con la presencia de una membrana previa al disco óptico, formada por un crecimiento excesivo de células astrogliales. En consecuencia, en esta situación, la palidez no indica necesariamente una atrofia papilar, ya que las células ganglionares y la capa de fibras nerviosas permanecen preservadas hasta etapas avanzadas de la enfermedad. (49)
Vasos retinianos	Característicamente, encontramos una reducción del diámetro vascular. Es un signo muy frecuente, pudiendo llegar a encontrar arterias filiformes, que recuerdan a las retinopatías hipertensivas.
Retina	Es muy variable según el estadio, por lo que en niños con RP en fases muy iniciales podemos encontrar retinas de aspecto normal, aunque encontremos ya alteraciones en el campo visual (CV), la OCT o el electroretinograma (ERG). En los casos más evolucionados podemos observar acúmulos de pigmento en forma de espículas óseas distribuidos de forma difusa, pero con predominio a nivel paravascular y en periferia media. La pigmentación retiniana en pacientes con retinosis pigmentaria puede mostrar un patrón moteado y, ocasionalmente, signos de atrofia.
Mácula	Inicialmente, puede ser normal, pero con el tiempo, se vuelve deslustrada y de tono grisáceo. A veces, estos cambios destacan más cuando se compara con la evidente alteración en el EPR que la rodea. En estadios avanzados, aparece una afectación macular franca, mostrando signos de atrofia retiniana o depósitos de pigmento similares a los encontrados en el resto de áreas de la retina.
Coroides	Es frecuente encontrar una atrofia de la coriocapilar en estadios finales de la enfermedad.



Figura 9. Retinografía de campo amplio de paciente con RP por USH1 (imagen superior: ojo derecho; imagen inferior: ojo izquierdo). Se observan la atrofia retiniana, junto a los depósitos de pigmento en periferia media y el estrechamiento vascular característico (imagen propia)

4.3.3. Criterios diagnósticos de la retinosis pigmentaria

En 1982 Marmor y colaboradores establecieron los siguientes criterios diagnósticos, que siguen vigentes a día de hoy: (50)

1. Bilateralidad

Aunque puede presentar cierta asimetría, muy raramente encontramos casos de RP en un solo ojo. De hecho, muchos diagnósticos de “RP unilateral” son en realidad secuelas de cuadros inflamatorios, traumáticos, o de oclusiones vasculares mal diagnosticados, en los que se produce una movilización del pigmento retiniano que recuerda a la RP. (51)(52)

2. Constricción del campo visual

La pérdida de visión en el campo visual periférico indica principalmente un deterioro de los bastones, ya que éstos se encuentran en mayor concentración en la retina periférica media.

3. Disfunción de los bastones (alteraciones electrofisiológicas)

El electroretinograma (ERG) proporciona información sobre la función de los FR y permite distinguir entre la respuesta de los bastones y la de los conos, lo que ayuda a evaluar el avance de la enfermedad. En la RP la disfunción de los bastones se identifica por:

- Un umbral elevado de la adaptometría en el segmento de bastones.
- Alteración en la respuesta aislada de bastones del ERG.

4. Pérdida progresiva de la función de los fotorreceptores

La progresión observable de la enfermedad es un marcador distintivo que la diferencia de otras condiciones similares pero estables, como la Ceguera Congénita Estacionaria Nocturna. Además, indica la afectación tanto de los bastones como de los conos, y no solo de uno de los tipos de FR.

Aunque el diagnóstico genético de la Retinosis Pigmentaria (RP) se está volviendo más común, todavía existen numerosos casos en los que solo se puede establecer un diagnóstico clínico. La identificación clínica de los pacientes con síntomas proporciona información para trazar el árbol genealógico y dirigir la búsqueda de la mutación genética.

La variabilidad en la presentación clínica tanto entre familias como dentro de una misma familia, junto con la falta de correlación absoluta entre el fenotipo (manifestaciones clínicas) y el genotipo (cambios genéticos), subraya la necesidad de un enfoque multidisciplinario. Al evaluar a un paciente con sospecha de RP o a sus familiares, es crucial tener en cuenta los siguientes puntos:

- Existen casos de RP con presentación atípica.
- En las etapas iniciales, pueden faltar o ser muy sutiles algunos síntomas y signos.
- Cada tipo genético (autosómica dominante, autosómica recesiva y ligada al sexo) tiene algunas características típicas.
- Un porcentaje significativo (alrededor del 15-20%) de casos de RP son formas sindrómicas, como el síndrome de Usher o el síndrome de Bardet-Biedl. (53) (54)
- Algunas mutaciones genéticas se asocian con un fenotipo clínico específico y viceversa, lo que implica una correlación genotipo-fenotipo.

4.4. SÍNDROME DE USHER

El síndrome de Usher (USH) es una condición genética hereditaria que sigue un patrón de transmisión autosómica recesiva. Se caracteriza por la combinación de retinosis pigmentaria (RP), pérdida auditiva neurosensorial y, a veces, problemas en la función vestibular.

El USH es considerado la causa más común de sordo-ceguera de origen genético en la población humana, siendo responsable del diagnóstico de más del 50% de los casos de sordo-ceguera. (55) Tal y como se ha mencionado anteriormente, este síndrome representa el 15-20% de todos los casos de RP. (53)(54)

La prevalencia de esta enfermedad varía según la fuente consultada, pero se calcula en un rango de 3,2 a 6,2 por cada 100.000 nacidos vivos en Europa. (56) Concretamente, en España, se calcula una prevalencia de 4,2 casos por cada 100.000 personas. (57)

4.4.1. Historia del Síndrome de Usher

En 1858, el oftalmólogo alemán Albrecht von Graefe reportó por primera vez la combinación de sordera congénita y retinosis pigmentaria (RP) en tres hermanos. (58) Sin embargo, fue el oftalmólogo escocés Charles Howard Usher quien, en 1935, destacó la naturaleza familiar de los hallazgos y sugirió que se trataba de un síndrome específico. (59)

Cabe destacar que, antes de que el síndrome obtuviese nombre propio, en 1922, la genetista británica Julia Bell observó diferencias en el grado de sordera entre varios pacientes sordo-ciegos, lo que indicaba la variabilidad fenotípica de la enfermedad. (60) Este hecho sentó las bases para la posterior clasificación del síndrome de Usher realizada por Davenport y Omenn en 1977. (61)(62) Finalmente, en 1994, Smith y colaboradores dividieron el síndrome en los tres subtipos clínicos que conocemos en la actualidad, según la progresión, la gravedad y la edad de inicio de los síntomas. (63) Un año después, Weil y colaboradores identificaron el primer gen responsable de la enfermedad: *MYO7A*. (64)

Hoy en día, se sabe con certeza que el USH es un síndrome clínico y genéticamente heterogéneo, como lo demuestra la gran cantidad de genes asociados a la enfermedad (once en total, siendo los genes mutados con mayor frecuencia *USH2A* y *MYO7A*). No obstante, a pesar de los numerosos avances en la investigación de este trastorno, todavía queda mucho por descubrir sobre su fisiopatología.

4.4.2. Clasificación y presentación clínica

Tal y como se ha mencionado en el apartado anterior, clínicamente podemos dividir el USH en tres tipos según la gravedad y progresión de la pérdida auditiva, la edad de inicio de la RP, y la presencia o ausencia de trastornos vestibulares. (62) (63) Sin embargo, hay casos en los que las manifestaciones clínicas no coinciden exactamente con las características de estos tres grupos, siendo clasificados como USH atípico.

Síndrome de Usher tipo 1 (USH1)

Esta forma del síndrome es la más severa y se caracteriza por una pérdida auditiva neurosensorial congénita de severa a profunda, la cual tiende a ser estable en su progresión, con cierta capacidad auditiva residual solo en bajas frecuencias. Los individuos con USH Tipo 1 generalmente pierden completamente su audición durante su primer año de vida, lo que les dificulta el desarrollo del habla a menos que se sometan a un implante coclear.

Además, el USH Tipo 1 se caracteriza por una deficiencia vestibular que se manifiesta en el primer año de vida, causando retrasos en el desarrollo motor. La mayoría de los pacientes no logran sentarse sin apoyo hasta los 6 meses de edad y no son capaces de caminar sin ayuda hasta después de los 18 meses. (63)

Como consecuencia de la RP, los pacientes con USH1 suelen presentar como primer síntoma visual la nictalopía, que con frecuencia se manifiesta en la primera década de vida, mientras que el diagnóstico de RP no suele establecerse hasta a mediados de la segunda. Sin embargo, ante sospecha diagnóstica por la existencia de antecedentes familiares, los cambios en la retina pueden ser detectados mediante electroretinografía (ERG) alrededor de los 2-3 años, incluso antes de que se observen signos en el examen del fondo de ojo.

Síndrome de Usher tipo 2 (USH2)

El Síndrome de Usher Tipo 2 (USH2) es el más frecuente y es menos grave en comparación con el USH1. La pérdida auditiva varía desde moderada en frecuencias bajas hasta severa en frecuencias más altas, y tiende a mantenerse estable con el tiempo. Aunque la hipoacusia es congénita, a menudo se diagnostica más tarde cuando los niños comienzan a experimentar dificultades en el desarrollo del lenguaje. Sin embargo, debido al grado de pérdida auditiva que experimentan, aún pueden desarrollar habilidades lingüísticas y comunicarse

efectivamente. Además, el uso de audífonos puede mejorar significativamente su capacidad auditiva.

La función vestibular es normal en el USH2, lo que significa que los niños no enfrentan dificultades en su desarrollo motor.

Los síntomas de la RP suelen aparecer más tarde en comparación con el USH1, típicamente durante la segunda década de vida. La gravedad y el ritmo de la pérdida visual pueden variar ampliamente entre familias y dentro de la misma familia, pero generalmente tiende a progresar de manera más lenta que en el caso del USH1.

Síndrome de Usher tipo 3 (USH3)

Los individuos con Síndrome de Usher Tipo 3 (USH3) por lo general mantienen niveles auditivos normales durante su infancia, lo que les permite adquirir el lenguaje sin dificultades. Sin embargo, experimentan una pérdida auditiva neurosensorial después de haber desarrollado el lenguaje (sordera postlingual), la cual progresa de manera no lineal y puede comenzar desde la primera hasta la tercera década de vida. En las etapas iniciales, la pérdida auditiva se asemeja a la del USH2, pero con un mayor impacto en las frecuencias altas y una progresión que varía ampliamente, llegando en la mayoría de los casos a la sordera profunda.

La presencia de alteraciones en la función vestibular también varía, afectando aproximadamente a la mitad de los pacientes. Sin embargo, es raro observar una completa ausencia de función vestibular, y no se ha determinado con certeza si esta alteración es progresiva o no. (65)

De la misma manera, el inicio de los síntomas de la RP puede variar, pero suele manifestarse entre la primera y segunda década de la vida.

Los síntomas y signos típicos de la RP se describen en el capítulo 1.1, siendo indistinguibles los hallazgos en la RP no sindrómica con respecto a la RP sindrómica en contexto de USH.

Tabla 4. Resumen de la clasificación clínica del USH basada en la clasificación de Davenport y Smith (62) (63)

	Visión (aparición de la RP)	Audición (pérdida de audición)	Equilibrio (función vestibular)
USHER tipo 1	Antes de la pubertad	Congénita, de severa a profunda. Estable	Arreflexia vestibular
USHER tipo 2	Después de la pubertad	Congénita, de moderada a severa. Estable	Normal
USHER tipo 3	Variable tanto en edad de aparición como en gravedad	Variable, postlingual. Progresiva	Variable: se observa un equilibrio que es normal o casi normal en la infancia. Sin embargo, existe la posibilidad de que se presenten problemas en etapas posteriores.

4.4.3. Genética del síndrome de Usher

Como se ha mencionado previamente, el USH es altamente variable tanto en su presentación clínica como en sus bases genéticas, ya que cada uno de los tres tipos clínicos puede a su vez corresponderse con distintos subtipos genéticos.

Hasta la fecha, se han identificado un total de 11 genes responsables del USH: 10 de ellos como causa independiente y un gen modificador. (tabla 3) Aunque en un principio se consideraron tres locus adicionales (USH1A, USH1J y USH2B), estudios recientes han descartado su participación en el síndrome de Usher. (66) (67)(68)

En 2010, Ebermann y colaboradores identificaron el gen *PDZD7*. Este gen parece contribuir a la conformación del fenotipo de los pacientes USH2A a través de interacciones con la proteína Usherina, pero por sí solo no es causa del síndrome de Usher. (69)

La mayoría de estos genes son responsables también de patologías auditivas o visuales no sindrómicas. (70)

Tabla 5. Locus, localización cromosómica, genes identificados y proteínas expresadas para cada subtipo clínico de USH (Tabla modificada de *Whatley et al* y *Castiglione et al*) (68)(70)

TIPO CLÍNICO	LOCUS	LOCALIZACIÓN	GEN	PROTEÍNA	GRADO DE EVIDENCIA
USH1	USH1B	11q13.5	<i>MYO7A</i>	Miosina VIIa	Confirmado
	USH1C	11p15.1	<i>USH1C</i>	Harmonina	Confirmado
	USH1D	10q22.1	<i>CDH23</i>	Cadherina 23	Confirmado
	USH1F	10q21.1	<i>PCDH15</i>	Protocadherina 15	Confirmado
	USH1G	17q25.1	<i>USH1G</i>	SANS	Confirmado
USH2	USH2A	1q41	<i>USH2A</i>	Usherina	Confirmado
	USH2C	5q14.3	<i>GPR98</i> o <i>ADGRV1</i>	Proteína G de adhesión-receptor acoplado-V1	Confirmado
	USH2D	9q32	<i>WHRN</i> o <i>DFNB31</i>	Whirlina	Confirmado
USH3	USH3A	3q25.1	<i>CLRN1</i>	Clarina I	Confirmado
	USH3B	5q31.3	<i>HARS1</i>	Histidino-tRNA ligasa	Rol pendiente de confirmación
Modificador de USH	PDZD7	10q24.31	<i>PDZD7</i>	Proteína 7 con dominio PDZ	Rol pendiente de confirmación

4.4.3.1. Gen *MYO7A* en el Síndrome de Usher tipo 1

El locus USH1B en el cromosoma 11q13.5 fue reportado por primera vez en 1992. (71) Unos años después, en 1995, Weil y colaboradores identificaron el gen relacionado con este subtipo de USH: el gen *MYO7A*. (64) Además de ser responsable del USH1B, se ha vinculado el gen *MYO7A* con trastornos de audición no sindrómicos, tanto de herencia autosómica dominante (DFNA11), como autosómico recesivo (DFNB2). (72)(73)

El gen *MYO7A* está formado por 49 exones, de los cuales 48 son codificantes. Hoy en día, solo se ha identificado una isoforma proteica como proteína codificada por el *MYO7A*, la cual está constituida por 2215 aminoácidos. Esta proteína presenta una estructura distintiva que incluye un dominio motor en el extremo N-terminal, seguido de un cuello en la región intermedia y una cola en la parte final. (74)(75) (figura 10)

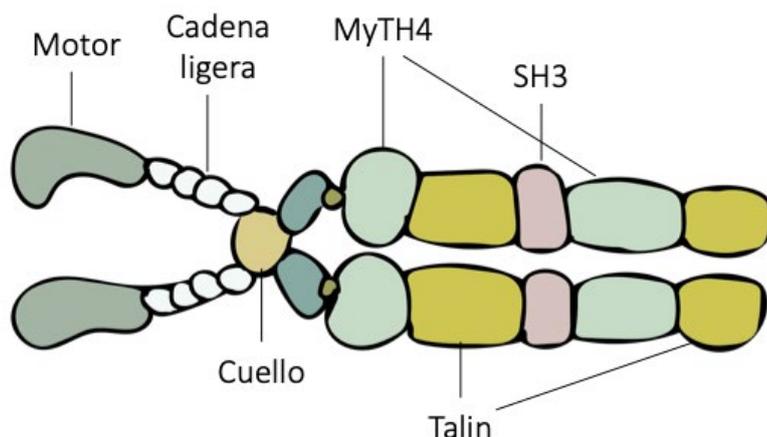


Figura 10. Estructura de la proteína Miosina VIIa. Imagen modificada de Hasson, *Current Biology*, 1999. (75)

La Miosina VIIa es una proteína motora que tiene la capacidad de desplazarse a lo largo de los filamentos de actina. Su dominio de la cabeza contiene sitios de unión tanto para la actina como para el ATP, siendo la hidrólisis de este ATP, la que le proporciona la energía necesaria para este movimiento.

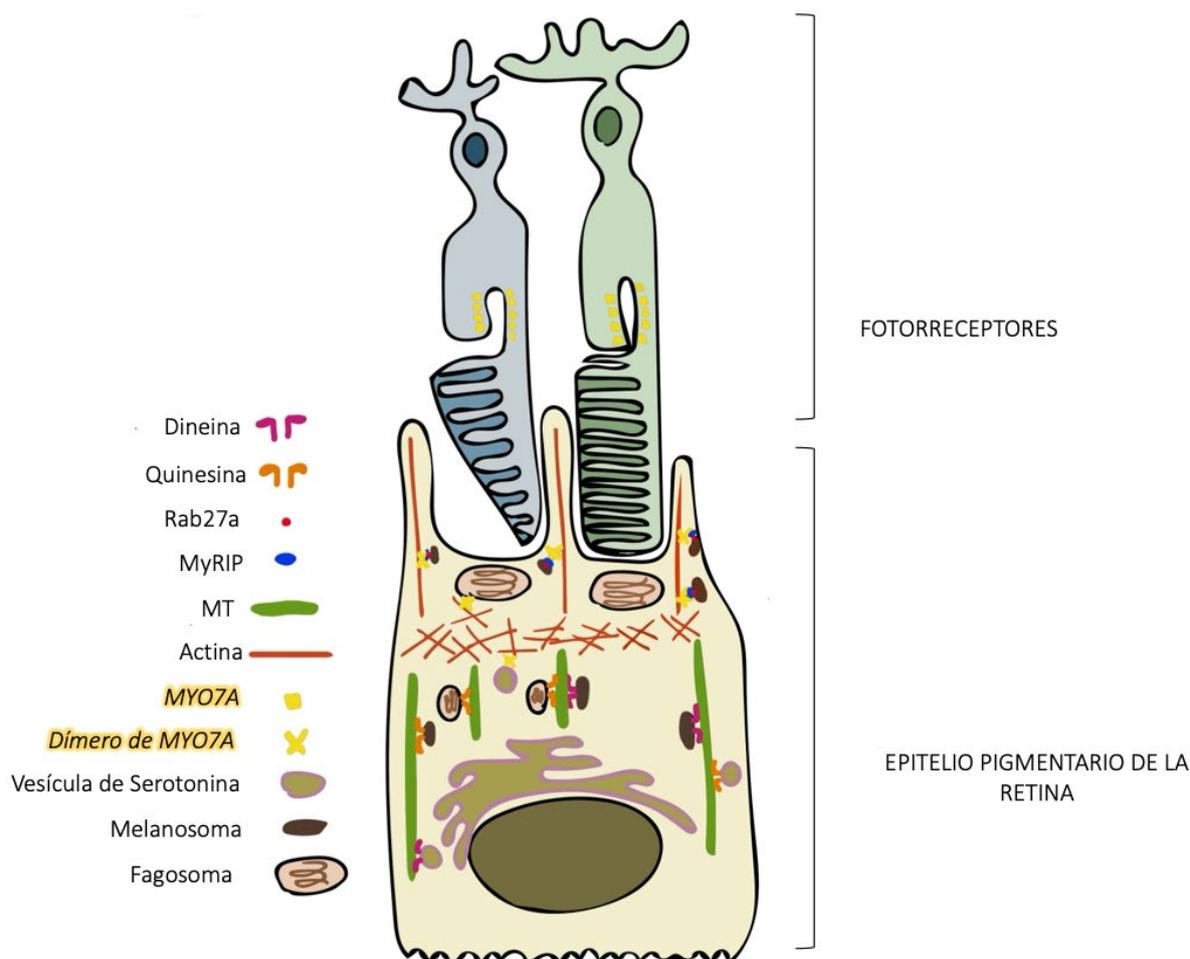
Numerosos investigadores han dirigido su atención hacia el papel que desempeña la miosina VIIa en el oído interno y en la retina. En la cóclea, se ha observado que esta proteína se localiza en las células ciliadas, donde su actividad motora contribuye a procesos como la diferenciación y organización de los estereocilios.

En cuanto a la retina, hay cierta controversia respecto a la ubicación exacta de la miosina VIIa. Algunos autores como Jacobson y colaboradores han reportado que los fotorreceptores son el primer sitio detectable de la enfermedad *MYO7A* en individuos jóvenes o en etapas tempranas de la enfermedad. (76) Por otro lado, Hasson et al. (77) y Williams et al. (78) han postulado que la mayor parte del *MYO7A* en la retina está presente en el EPR, y una pequeña cantidad estaría asociada a los FR.

Los estudios con ratones deficientes en *MYO7A* han demostrado que *MYO7A* se localiza en la región apical de los melanosomas del EPR y puede estar involucrado en la eliminación de fagosomas del EPR apical para su entrega a los lisosomas en el EPR basal. En los FR que carecen de *MYO7A*, la opsina se acumula de manera anormal en la zona de transición del cilio, lo que sugiere que *MYO7A* funciona como una barrera selectiva para las proteínas de membrana en el extremo distal de los FR y desempeñaría un papel clave en el mantenimiento de la estructura periciliar. (78) (tabla 6) (figura 11)

Tabla 6. Resumen de las localizaciones y funciones descritas de *MYO7A* en la retina. (77)(78)

LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN
EPR	Disposición y desplazamiento de melanosomas y fagosomas en el EPR
	Transporte de las moléculas residuales generadas durante la renovación de los discos del segmento externo de los fotorreceptores
	Requisito para la translocación dependiente de la luz de la enzima del ciclo visual RPE65
FR	Control del transporte de opsinas hacia el segmento externo de los FR
	Barrera selectiva de proteínas de membrana en los FR
	Conservación de la integridad de la estructura ciliar mediante su interacción con las proteínas Usherina y GPR98

**Figura 11.** Esquema de las localizaciones y posibles funciones de *MYO7A* en la retina (Imagen modificada de Williams et al) (78)

4.4.4. Diagnóstico del Síndrome de Usher

En cuanto al diagnóstico del USH es imprescindible un enfoque multidisciplinar que incluya un estudio de la audición y el equilibrio por parte de otorrinolaringología, la retinosis pigmentaria a nivel oftalmológico y finalmente la confirmación genética.

En la mayoría de los países con altos recursos, el diagnóstico clínico es seguido por una confirmación genética, pero esto probablemente cambiará en un futuro próximo, dando paso al uso de la secuenciación de próxima generación con paneles de genes ampliados tras el diagnóstico neonatal de la discapacidad auditiva.

4.4.4.1. Pruebas de audición y función vestibular

Con el objetivo de determinar el grado de pérdida auditiva y descartar neuropatía auditiva, el estudio audiológico neonatal debe incluir:

- Estudio de la emisión otoacústica
- Estudio de la respuesta auditiva del tronco encefálico con mediciones de umbral
- La respuesta auditiva de estado estacionario
- Los reflejos estapediales

Más adelante en la infancia y durante el curso de la vida, se deberá incluir una audiometría de tonos puros y una audiometría del habla.

Cabe recordar que la localización del daño a nivel auditivo en el USH es coclear, a causa de la pérdida de células ciliadas internas y externas y aunque la hipoacusia es bilateral, simétrica y neurosensorial en todos los pacientes con USH, debemos tener presentes las características diferenciales en los distintos subtipos clínicos de USH: (68)

- USH1: Sordera bilateral profunda congénita.
- USH2: Pérdida auditiva bilateral congénita de moderada a severa. En la mayor parte de los casos, la pérdida auditiva estable ocurre durante las primeras 3 a 4 décadas. La pérdida auditiva tiene frecuentemente un patrón inclinado: de leve a moderada en las frecuencias bajas y de severa a profunda en las frecuencias más elevadas.

- USH3: Hipoacusia congénita, que suele ser leve durante la infancia con un patrón típico de pendiente. La pérdida auditiva es más variable, lo que difiere de la del USH2.

En cuanto al estudio de la función vestibular, debe considerarse una parte esencial del diagnóstico clínico del USH:

Mientras que en los pacientes con USH2, la función vestibular y la consecución de hitos motores son normales, en los niños con USH1, una prueba de rotación en una silla de oficina usando gafas de Frenzel de video revelará un nistagmo horizontal ausente durante la rotación. A su vez, en estos pacientes, la evaluación del desarrollo de los hitos motores mostrará un desarrollo motor grueso retrasado con hipotonía en los recién nacidos; mientras que en los niños se observará un retraso para sentarse y gatear y, por lo general, un retraso en la edad de deambulación (>18 meses). Por otro lado, en pacientes con USH3, la función del equilibrio suele ser normal durante la infancia y la edad adulta temprana y disminuye más adelante.

4.4.4.2. Pruebas oftalmológicas

Realizar una exploración oftalmológica completa es imprescindible para establecer el diagnóstico de USH. Para ello, el primer paso será realizar una exploración meticulosa que incluya la toma de agudeza visual en cada visita, así como la exploración en la lámpara de hendidura y la realización del examen fundoscópico.

Durante la edad pediátrica, la mayoría de pacientes con USH presentan signos precoces de RP, aunque en un rango variable, pudiendo observar desde fondos de ojo prácticamente normales a signos evidentes de RP como la atrofia retiniana y los depósitos de pigmento. Debemos tener en cuenta que una misma mutación puede tener varias expresiones fenotípicas, con signos fundoscópicos muy diversos.

Anteriormente, en el capítulo 2, se han comentado detalladamente los signos clínicos de la retinosis pigmentaria, por lo que, en este capítulo, centraremos la atención en el resto de pruebas complementarias necesarias para establecer el diagnóstico de USH en pacientes de edad pediátrica.

Campimetría

Tal y como hemos mencionado en capítulos anteriores, los cambios en el campo visual comienzan con una disminución generalizada y difusa de la sensibilidad.

Posteriormente, surgen áreas de pérdida absoluta de visión (escotomas) formando un anillo alrededor del campo central. Este defecto en forma de anillo es el resultado de la afectación inicial de los bastones, que se encuentran en mayor densidad en la periferia media de la retina. Este defecto anular se expande hacia fuera de forma centrífuga, provocando una restricción periférica del campo visual. Con el tiempo, la parte central del campo visual se verá comprometida, aunque un pequeño islote central permanecerá preservado incluso en etapas avanzadas de la enfermedad, lo que se conoce como campo visual en “cañón de escopeta” o en “túnel”. (figura 12) Por lo general, los defectos en el campo visual coinciden con las áreas alteradas en el fondo de ojo; sin embargo, en algunos casos, pueden observarse áreas de campo visual más afectadas de lo esperado.

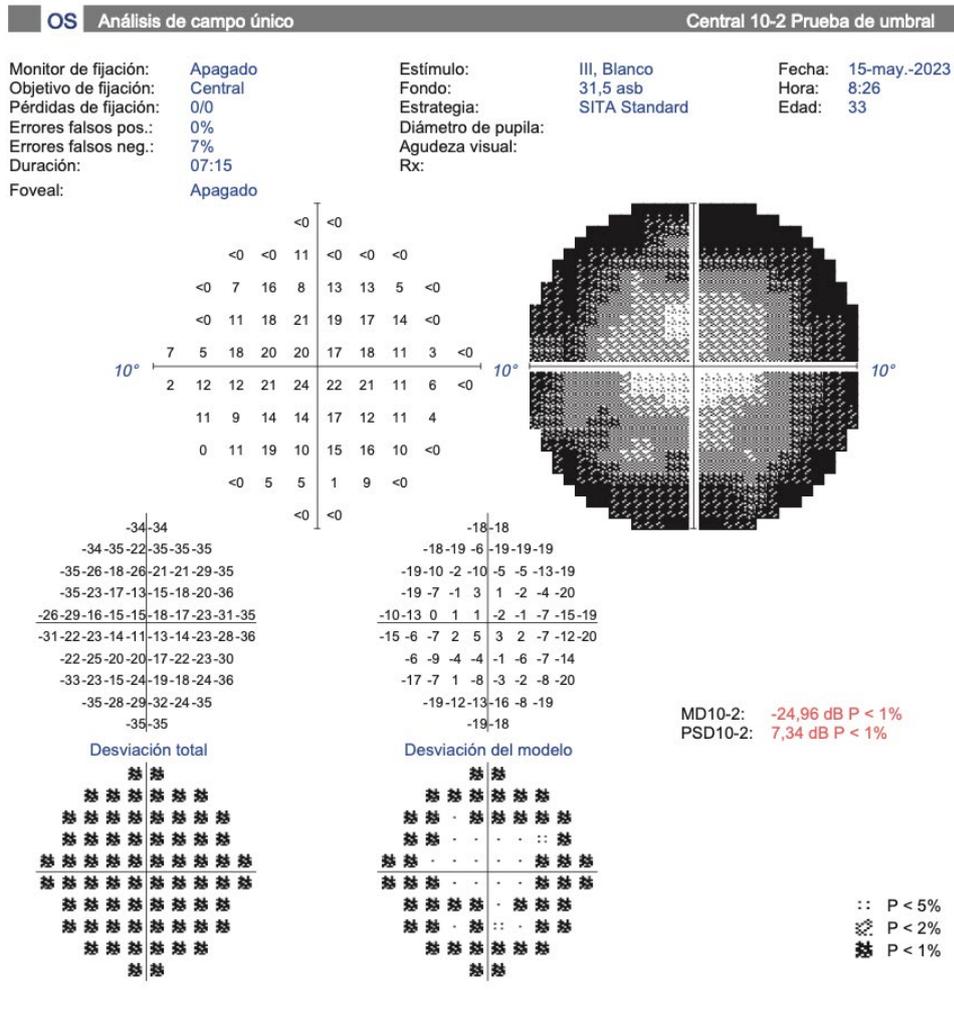


Figura 12. Campo visual en paciente con RP : observamos un defecto periférico en túnel o cañón de escopeta (imagen propia, cortesía de la Dra. E.Cobos)

Adaptometría

Desde etapas tempranas de la RP, las pruebas de adaptación a la oscuridad muestran resultados anormales. Estas pruebas evalúan cómo la sensibilidad de la retina aumenta cuando el ojo se adapta a la oscuridad. Se registra el umbral visual a lo largo del tiempo, generando una curva con dos fases distintas: una correspondiente a los conos y otra a los bastones. Los bastones alcanzan umbrales mucho más bajos que los conos.

Pruebas electrofisiológicas

Entre las distintas pruebas electrofisiológicas oculares disponibles hoy en día (potenciales evocados, electro-oculograma, electrorretinograma, etc.), la más estandarizada para el diagnóstico de la RP es el ERG.

El ERG es una prueba imprescindible para diagnosticar las distrofias en general. Su importancia diagnóstica reside en que permite detectar una alteración funcional de la retina de forma precoz, incluso en ausencia síntomas o signos clínicos: dado que en la retinosis pigmentaria (RP) se afectan los fotorreceptores, las respuestas eléctricas se ven alteradas desde fases muy tempranas.

Entre los distintos tipos de ERG, el realizado mediante flash (ERG-Flash) constituye la prueba neurofisiológica más estandarizada en el diagnóstico de la RP. Esta prueba consiste en estimular la retina mediante destellos de luz de cierta intensidad y duración, administrados por un estimulador o electrorretinógrafo, mientras una lente de contacto corneal actúa como electrodo de registro para recoger las respuestas. Dado que los conos y los bastones responden de manera diferente, es necesario registrar las respuestas en condiciones distintas para distinguir entre ambos tipos de fotorreceptores.

En el ERG-flash, se observa típicamente una reducción en la respuesta a baja intensidad, inicialmente durante la evaluación escotópica, la cual empeora a medida que avanza el proceso. (79) (figura 13) Es importante tener en cuenta que el ERG-flash es de campo completo y utiliza un estímulo difuso, lo que significa que recoge la señal de toda la retina en conjunto. Esto implica que las lesiones focales, que pueden afectar a una pequeña cantidad de fotorreceptores, pueden no reflejarse en el resultado, que podría considerarse normal. Por ello, es posible encontrar pacientes con enfermedades maculares como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y una visión reducida a menos de 0.1, pero con un ERG-flash completamente normal. En contraste, el ERG multifocal genera un mapa de la respuesta retiniana, permitiendo distinguir entre diferentes áreas de

la retina central. (41) (figura 14) Según algunos expertos, se podría descartar el diagnóstico de RP en individuos con sospecha clínica pero con ERGs normales después de los seis años de edad. (80)

Por otro lado, los potenciales evocados visuales (PEV) evalúan la vía visual hasta el córtex occipital. La respuesta proviene de las fibras de la retina central, por lo que se altera precozmente en las afecciones maculares, pero en la RP solo se afecta en etapas avanzadas.

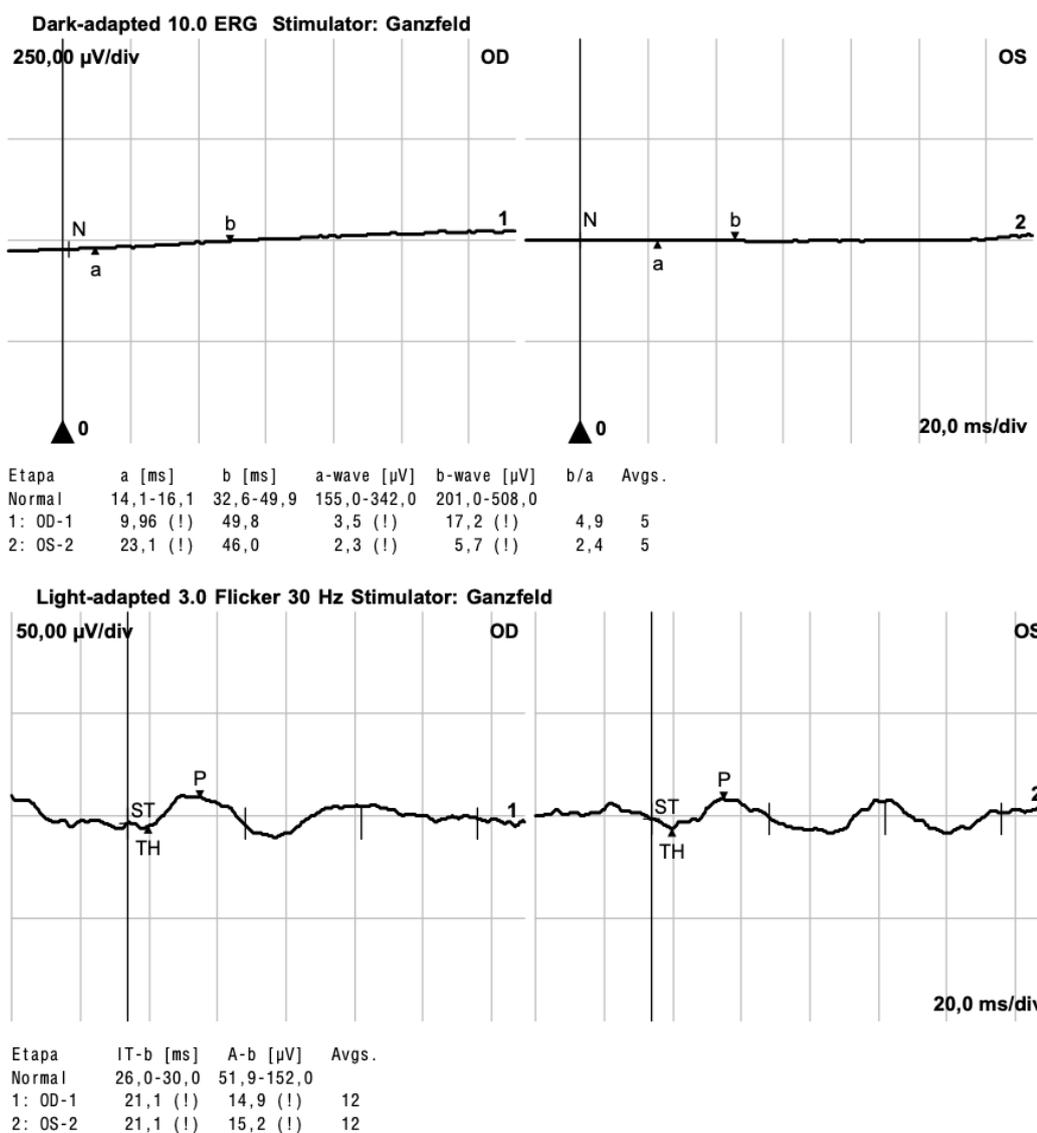


Figura 13. ERG flash de paciente con RP: en la parte superior observamos una respuesta abolida en condiciones escotópicas (ya que no hay respuesta por parte de los bastones), mientras que en la parte inferior, observamos el *flicker* fotópico que valora la respuesta de los conos y muestra una respuesta parcialmente conservada con disminución de la amplitud (imagen propia, cortesía de la Dra. E.Cobos)

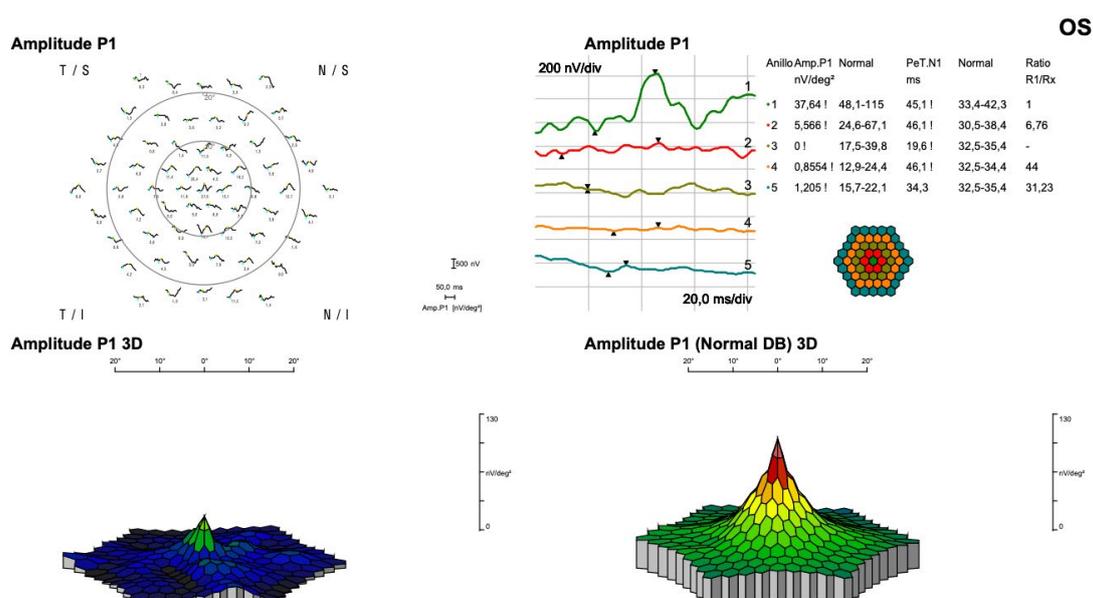


Figura 14. ERG multifocal alterado en paciente con RP: en la parte superior se observan las respuestas sectoriales y en la parte inferior, la representación en 3 dimensiones. Se identifica una onda P1 con amplitud preservada en el primer anillo (anillo foveal) y aplanamiento en el resto de los anillos más periféricos (imagen propia, cortesía de la Dra E. Cobos)

Sensibilidad al contraste

En ocasiones, antes de que los pacientes con RP experimenten una disminución de la agudeza visual, pueden manifestar una reducción en la capacidad para la percepción del contraste.

Autofluorescencia

De manera característica, se puede identificar un anillo hiperautofluorescente alrededor de la fovea, donde el área del interior de este anillo muestra una función fotópica preservada. Esto sugiere que las anomalías en la autofluorescencia poseen un significado funcional y pueden servir como herramienta para la identificación de pacientes. (figura 15)

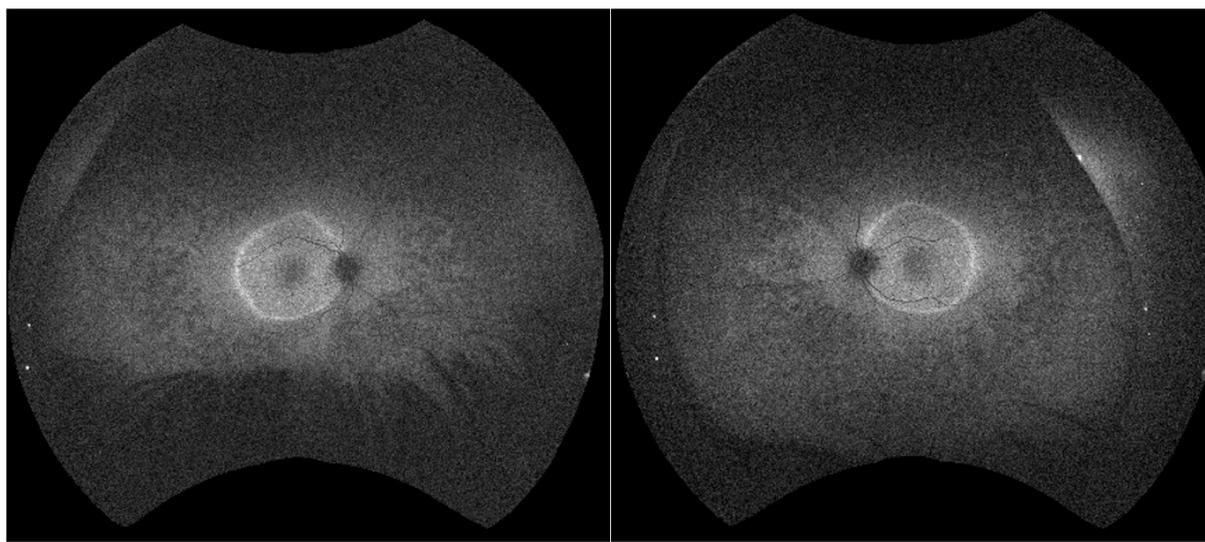


Figura 15. Autofluorescencia en paciente con RP a USH1. (imagen propia)

Tomografía por coherencia óptica

La tomografía de coherencia óptica (OCT) es una prueba diagnóstica basada en el uso de haces de luz de baja coherencia que permite obtener exploraciones tisulares multinivel especialmente precisas y fiables, con la gran ventaja de que se trata de una prueba no invasiva, rápida e inocua para el paciente.

La primera generación de OCT era de baja resolución y no nos permitía distinguir las estructuras microscópicas de la retina. Paulatinamente, se ha ido produciendo una mejora significativa en la resolución de la OCT, hasta el día de hoy, en que disponemos de distintos OCTs de alta resolución que se diferencian entre ellos por el sistema que utilizan a la hora de adquirir la información del tejido y por la imagen bidimensional obtenida. De esta manera, podemos diferenciar entre: OCT de dominio temporal (Time Domain o TD-OCT), los OCT de dominio espectral (Spectral Domain o SD-OCT) y los OCT Swept Source (SS-OCT).

Hoy en día, los más utilizados en la consulta rutinaria son los SD-OCT y los SS-OCT. Cabe destacar que el SS-OCT posee una longitud de onda superior que el resto, lo que le confiere una mayor penetración del tejido. Gracias a la luz de longitud de onda larga (1050 nm), la penetración en los tejidos oculares se ha optimizado, esto nos brinda la oportunidad de observar *in vivo* todas las capas retinianas, con una correlación directa con los estudios histológicos: el resultado es comparable a una biopsia en imágenes de todas las capas retinianas e, incluso de la coroides y la esclera. De modo, que es posible detectar lesiones tanto cuantitativas (por ejemplo, una disminución o aumento del grosor retiniano

o corioideo) como cualitativas (aparición de edema macular cistoide, tracción vítreo-macular, membrana epirretiniana, etc).

El análisis de la integridad de los FR y su relación con el EPR es de gran importancia para comprender la patogenia de las enfermedades degenerativas de la retina como la RP en el USH.

De la misma manera que el ERG, la OCT permite también detectar alteraciones precoces en el diagnóstico de la RP, pero además tiene la ventaja de poder medir estos cambios objetivamente, lo cual es de especial utilidad en el seguimiento de enfermedades crónicas y progresivas como la RP en el USH. Por consiguiente, la OCT resulta crucial para diagnosticar la enfermedad, monitorear su progresión y evaluar la eficacia de los tratamientos que actualmente se están investigando en ensayos clínicos.

Algunos autores como Cuenca y colaboradores han realizado valiosos estudios que correlacionan de manera precisa las imágenes obtenidas por OCT con las estructuras histológicas mediante técnicas de inmunohistoquímica sobre cortes de retina humana a nivel de fovea. (81) (figura 16)

No obstante, la nomenclatura más extendida y vigente hoy en día sobre para la clasificación de las capas y bandas retinianas y corioideas visibles en imágenes de SD-OCT de un ojo normal, sigue siendo la propuesta en 2014 por Staurenghi y colaboradores. (figura 17)(82)

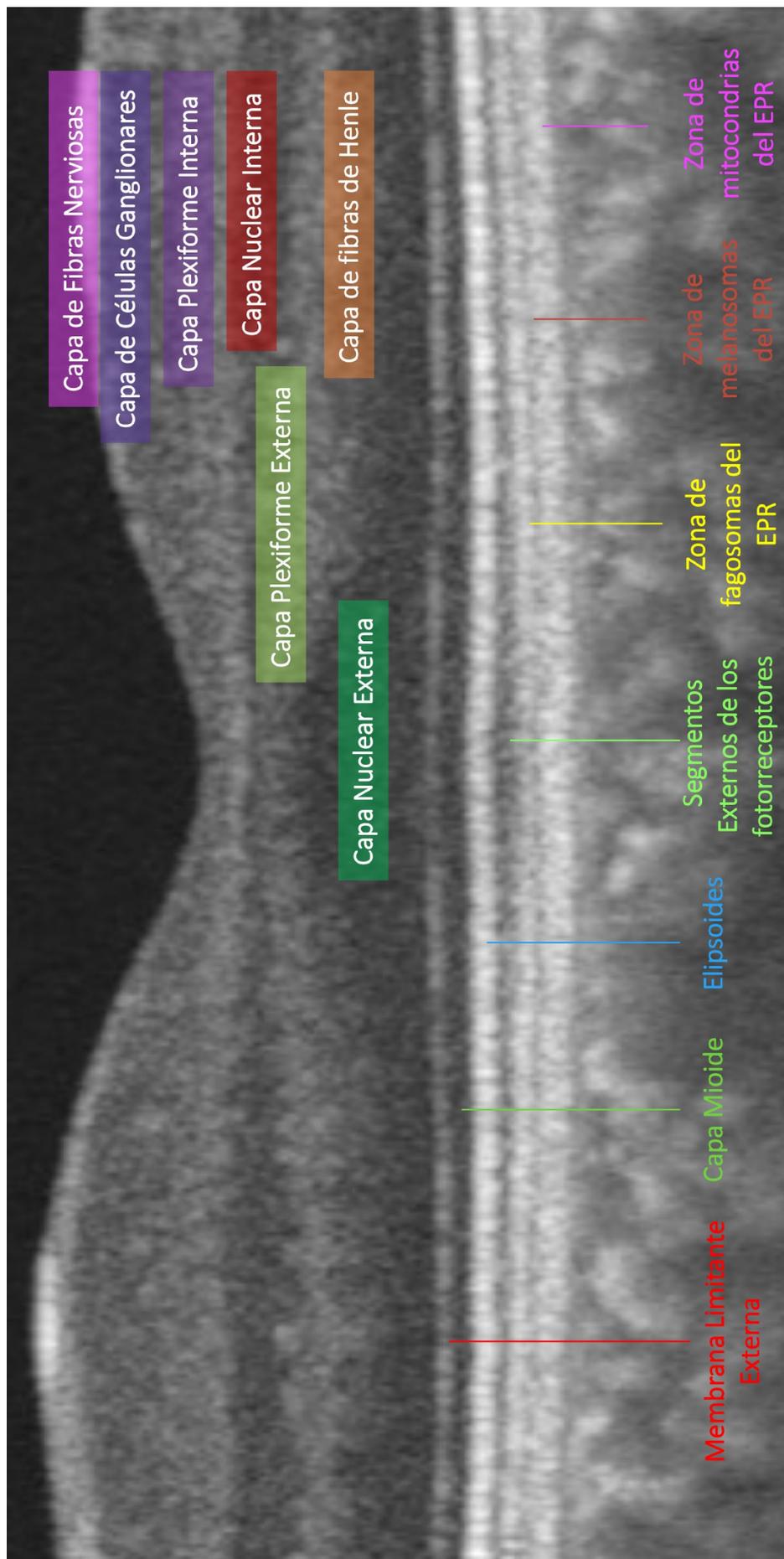


Figura 16. Correlación entre la imagen obtenida por OCT y los resultados del estudio inmunohistoquímico del área macular de la retina. (figura modificada de Cuenca et al, *Ophthalmology*; 2017)

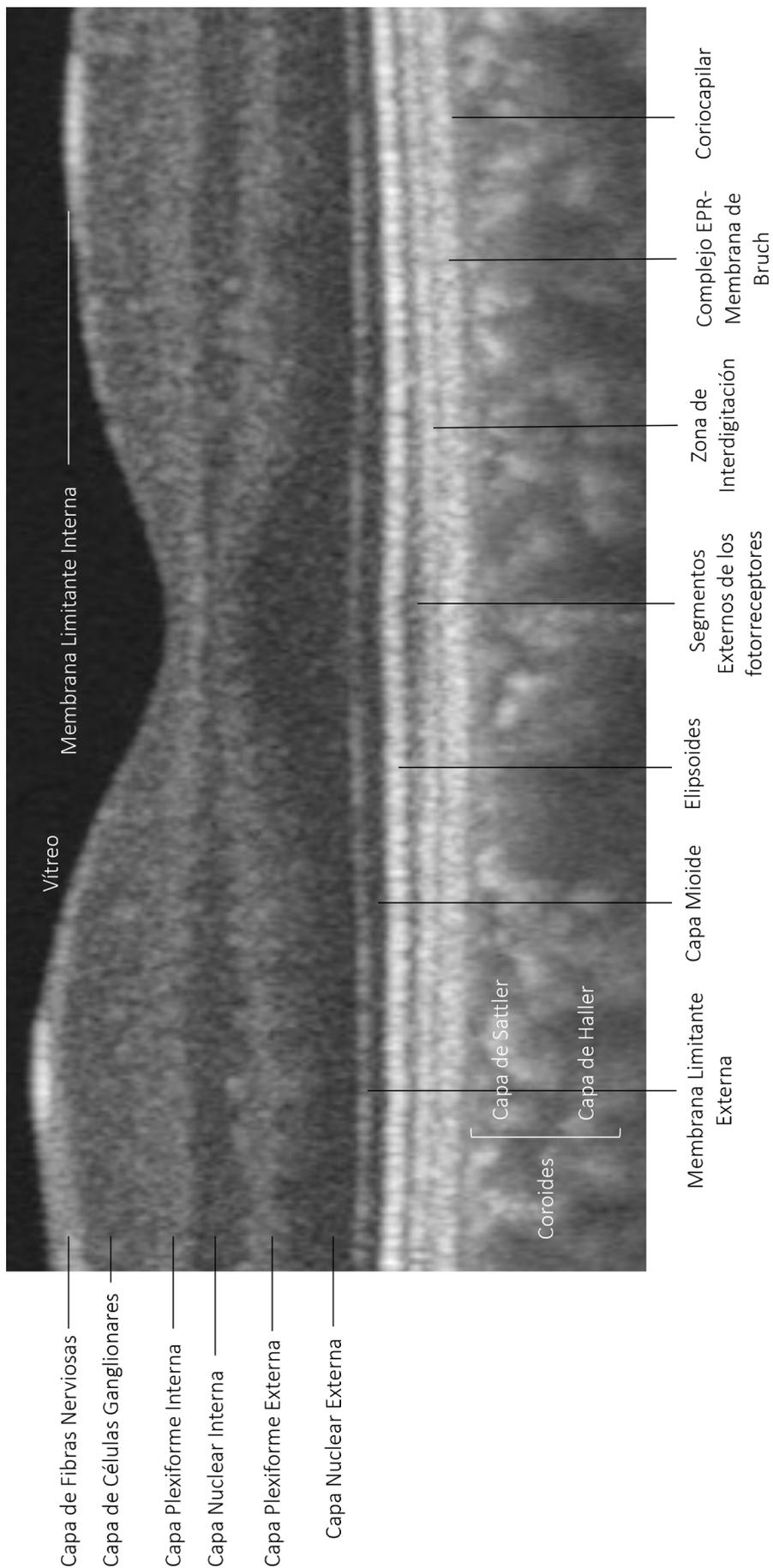


Figura 17. Nomenclatura estandarizada para las diferentes capas de la retina y coroides de una imagen de OCT centrada en mácula, basada en la nomenclatura propuesta por *Staurenghi* y colaboradores. (imagen propia)

En cuanto a la valoración de los FR mediante OCT, ésta aporta una valiosa información, que en ocasiones resulta incluso superior a la que aportaría un corte histológico, ya que estamos valorando un tejido “in vivo” a tiempo real. Cuando se menciona la capa de los FR, en realidad se hace referencia a la expansión externa de los mismos, ya que los FR forman las capas más externas de la retina, extendiéndose desde la capa plexiforme externa hasta el EPR, por lo tanto, para una correcta valoración del estado de los FR, debemos valorar las 6 capas en las que se encuentran (de más interna a más externa): (figura 18)

1. **Plexiforme externa:** lugar de sinapsis de los FR con las células bipolares, horizontales y amacrinas.
2. **Nuclear externa:** formada por los núcleos de conos y bastones. Se corresponde con la capa hiporreflectante más gruesa de la retina.
3. **Membrana limitante externa (MLE):** capa fina hiperreflectante por donde pasan las fibras de los FR, formada por expansiones de las células de Müller.
4. **Mioide:** franja hiporreflectiva, entre la MLE y la elipsoides, que contiene el aparato de Golgi, ribosomas y un extenso retículo endoplásmico donde se sintetizan las proteínas necesarias para fabricar las membranas y otros componentes de los FR.
5. **Elipsoide:** también conocida como zona de elipsoides (ZE), porción elipsoides de los segmentos internos (EPIS), elipsoides de los segmentos internos (ESI) o unión entre los segmento internos y externos (“inner segment/outer segment” o “IS/OS”). Es una franja hiperreflectiva muy bien definida dado que por su estructura membranosa refleja casi toda la luz que le alcanza. Está formada por la acumulación de mitocondrias que suministran la energía requerida para llevar a cabo los elaborados procesos visuales, como la fototransducción.
6. **Segmentos externos de los FR:** franja hiporreflectiva, que corresponde a la franja más externa de los FR, donde se encuentran los discos o repliegues de membrana.
7. **Interdigitación del EPR o línea de Verhoeff:** línea hiperreflectiva, no siempre visible, que se corresponde con el lugar donde los FR son rodeados por los procesos filiformes de la zona apical del EPR.

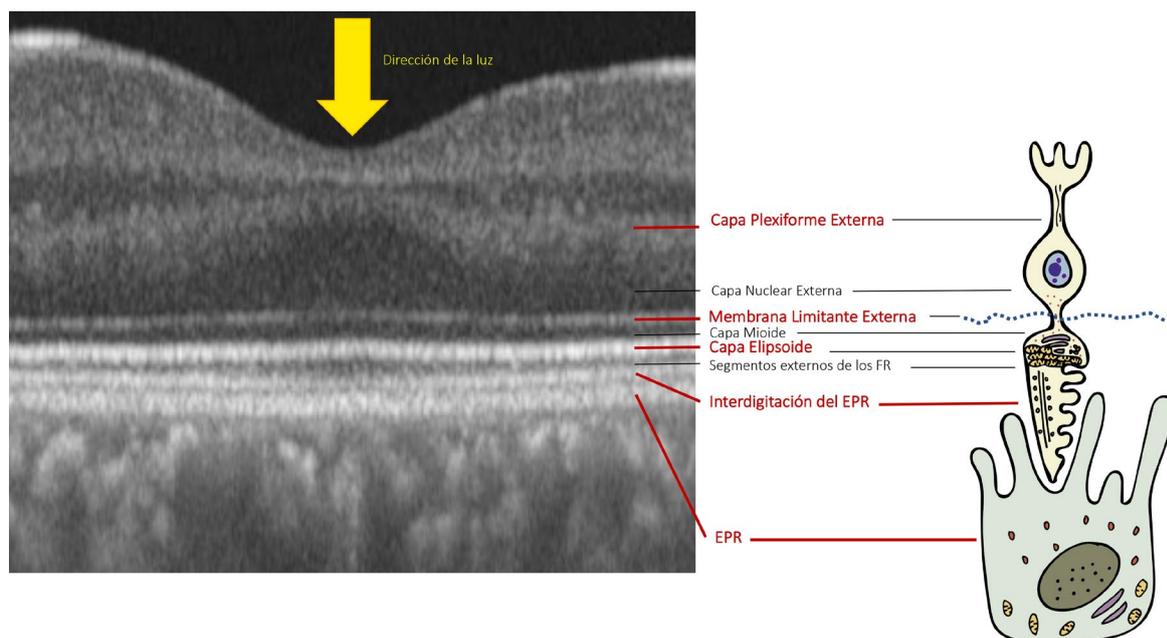


Figura 18. Correlación de las capas de la retina externa con las distintas partes de los fotorreceptores. Con letras rojas se representan las capas hiperreflectivas. (imagen propia)

4.4.4.3. Diagnóstico genético

El diagnóstico molecular del síndrome de Usher se ve dificultado considerablemente a causa de la amplia diversidad genética y el gran tamaño de algunos de los genes involucrados. A continuación, se exponen de manera generalizada las distintas tecnologías utilizadas para abordar su diagnóstico molecular, según su evolución:

Secuenciación Sanger

El diagnóstico genético más antiguo y usado ha sido la secuenciación genética, que consiste en un análisis completo gen a gen, empezando por los más implicados dentro de cada subtipo clínico. A lo largo del tiempo, se han empleado diversos métodos para identificar las mutaciones causantes de la enfermedad. Inicialmente, estos estudios combinaban el polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) y la secuenciación de Sanger. El SSCP permitía detectar variaciones en la secuencia según el plegamiento diferencial de las cadenas simples de ADN. Si se observaba un patrón electroforético anómalo, se procedía a la secuenciación automática mediante Sanger. Sin embargo, debido a su menor sensibilidad en comparación con la secuenciación directa, rápidamente se adoptó la secuenciación completa de los genes. A pesar de que esta técnica es altamente sensible, en el caso del USH, el gran tamaño de los

genes involucrados, como *USH2A* o *MYO7A*, junto con la presencia de casos atípicos o sin clasificar, hacen que la secuenciación completa de genes sea un proceso lento y costoso. (83)

Microarrays de genotipado

Los *microarrays* de genotipado tienen como objetivo simplificar los análisis genéticos. Estos dispositivos consisten en múltiples sondas de ADN adheridas a una superficie sólida, sobre la cual se hibridan muestras de ADN de los pacientes, lo que facilita la identificación de mutaciones. No obstante, es importante tener en cuenta que un *microarray* solo puede detectar mutaciones que hayan sido previamente descritas, y se requieren actualizaciones constantes para mantener su eficacia (la última versión en el diagnóstico de USH incluye 651 mutaciones). (84)

Ésta es una técnica bajo coste, por lo que puede ser útil a la hora de priorizar el gen a estudiar, como en los casos con historia familiar confirmada.

Secuenciación de nueva generación

En el año 2005, surgió la primera plataforma de secuenciación de nueva generación, también conocida como NGS (de las siglas en inglés: *next generation sequencing*), marcando un hito en el ámbito del diagnóstico de enfermedades genéticas. El término NGS engloba tecnologías diseñadas para analizar grandes cantidades de ADN de manera masiva y paralela. Esta técnica ha transformado la investigación genómica al permitir la secuenciación de millones de bases de manera más rápida y económica. La interpretación de los resultados es compleja y requiere un exhaustivo proceso bioinformático y clínico.

Actualmente, existen diversas plataformas de secuenciación disponibles, todas basadas en una amplificación inicial del ADN seguida de la secuenciación. Estas son conocidas como secuenciadores de segunda generación, aunque ya se están desarrollando los de tercera generación, que prescindirán de la amplificación inicial. Además, existen diversas aplicaciones, como la secuenciación completa del genoma (WGS, por sus siglas en inglés, *Whole Genome Sequencing*) o la secuenciación completa del exoma (WES, por sus siglas en inglés, *Whole Exome Sequencing*), que posibilitan el almacenamiento, procesamiento y gestión de la información obtenida de las diferentes plataformas.

Por otro lado, se han creado secuenciadores de bancada, llamados *bench-top*, que son sistemas NGS más pequeños con protocolos y análisis de datos más simples

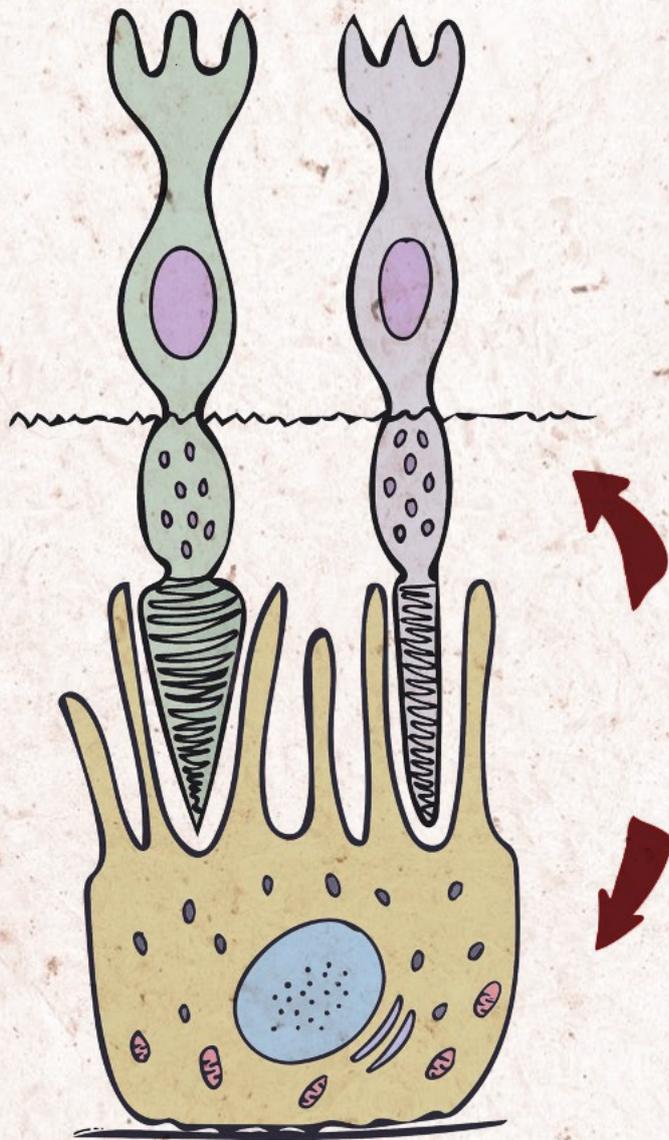
y económicos. (83) Tres de las principales plataformas que han desarrollado estos secuenciadores de bancada son *MiSeq*, *Ion Torrent PGM* y *454 GS Junior*.

Por último, es importante destacar el empleo combinado de las técnicas mencionadas anteriormente: la secuenciación masiva junto con la captura de secuencias. Esta combinación posibilita la secuenciación de regiones específicas del genoma (resecuenciación dirigida) con el propósito de enriquecer esta parte del genoma mediante diversas estrategias, para luego proceder a su secuenciación. En los últimos años, se han llevado a cabo numerosos estudios que han utilizado esta estrategia, especialmente en la investigación de enfermedades genéticamente heterogéneas como el USH. (85)

4.4.5. Tratamiento y pronóstico

Hoy en día, no existe un tratamiento curativo para los pacientes con RP por USH. Al ser una enfermedad crónica y progresiva, ésta conduce inevitablemente a la ceguera. El momento en que se establece la ceguera legal es variable y depende de varios factores, como el subtipo clínico de USH o la edad de aparición de los primeros daños retinianos. Por este motivo, resulta de especial interés conocer cuáles son estas primeras alteraciones en la retina e identificar que variables nos permitirían cuantificar dicha progresión.

Por todo ello, nuestro trabajo se centrará en establecer cuáles son los primeros biomarcadores detectados por OCT en un grupo homogéneo: pacientes de edad pediátrica con síndrome de USH1 secundario a mutaciones del gen *MYO7A*.



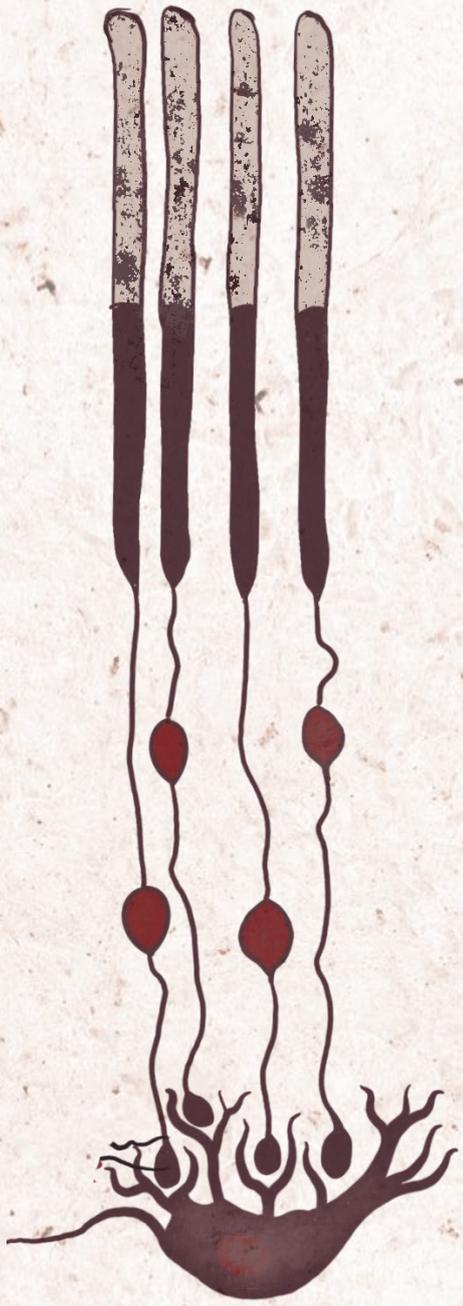
5

HIPÓTESIS

5. HIPÓTESIS

Se plantea que la retinopatía secundaria a mutaciones en *MYO7A* en pacientes con síndrome de Usher tipo 1 se produce primariamente por un daño a nivel de las capas externas de la retina, particularmente en los fotorreceptores.

Por otro lado, la SS-OCT es una herramienta diagnóstica útil para detectar los primeros signos de la enfermedad a nivel ocular, caracterizar mejor las diversas etapas de esta retinopatía y monitorear su evolución, lo que podría permitir evaluar la respuesta a eventuales tratamientos en el futuro.



6

OBJETIVOS

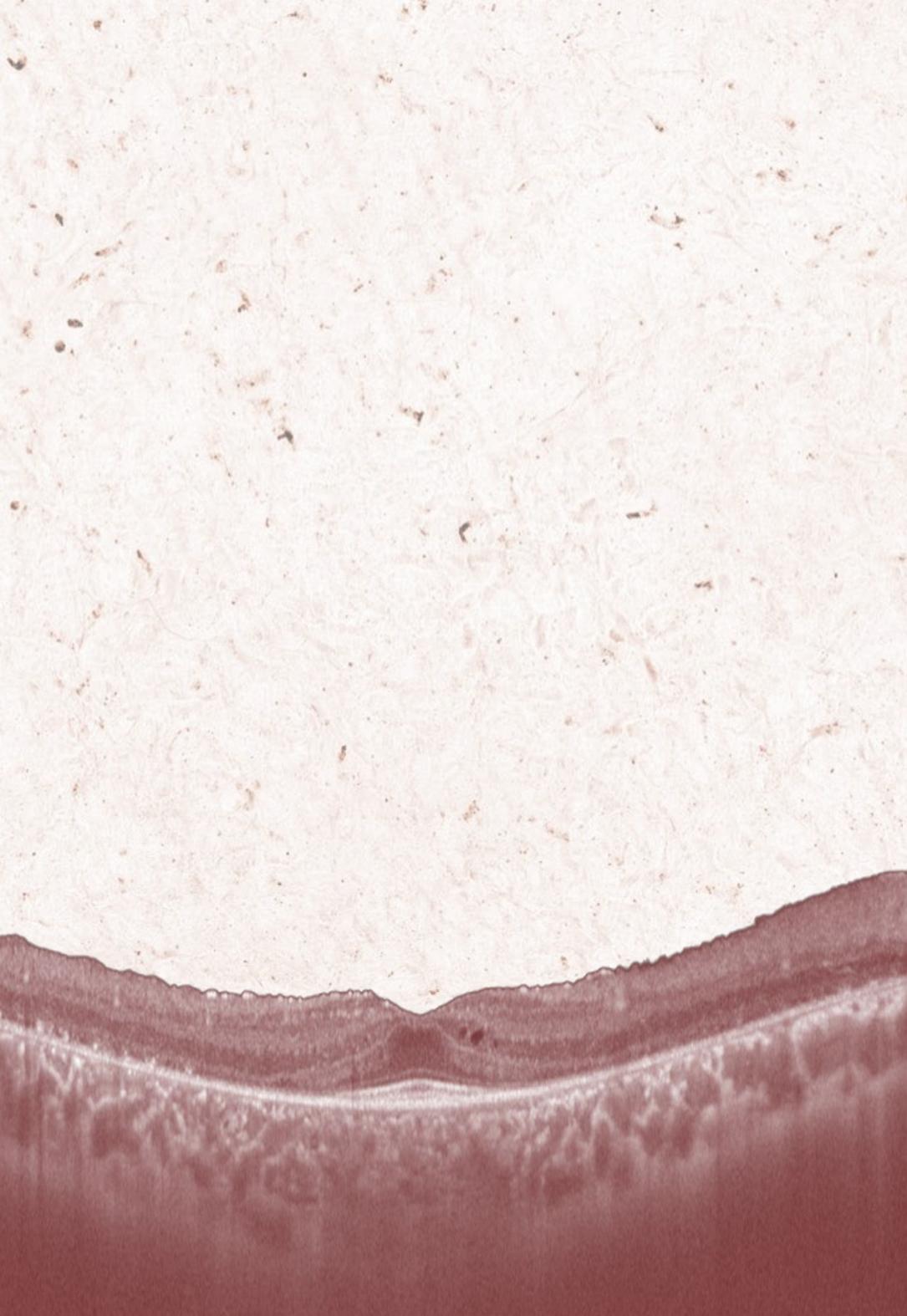
6. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

1. El objetivo principal del estudio es establecer en qué localización anatómica de la retina se producen los primeros daños secundarios a mutaciones del gen *MYO7A* en pacientes pediátricos diagnosticados de síndrome de Usher tipo 1.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

2. Describir las alteraciones de la retina detectadas mediante tomografía por coherencia óptica *Swept Source* y comparar estos hallazgos con informes publicados previamente.
3. Correlacionar las alteraciones anatómicas detectadas mediante tomografía por coherencia óptica con la agudeza visual.
4. Determinar qué parámetros son los más útiles para predecir la progresión de la enfermedad.



7

MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

7. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

ARTÍCULO 1

Resumen del artículo 1

Objetivo: Describir las alteraciones retinianas detectadas con SS-OCT en pacientes pediátricos con USH1 y comparar estos hallazgos con informes publicados previamente.

Métodos: Treinta y dos ojos de 16 pacientes (11 hombres y 5 mujeres) con diagnóstico genético de USH1 debido a mutaciones *MYO7A* se sometieron a SS-OCT. Los pacientes tenían edades comprendidas entre 4 y 17 años (media, $11,13 \pm 4,29$). Se analizaron el área subfoveal y macular mediante SS-OCT a 1050 nm utilizando 12 barridos radiales de 12,0 mm. Las anomalías estructurales fueron evaluadas y se correlacionaron con la mejor agudeza visual corregida (BCVA).

Resultados: La alteración retiniana cualitativa más frecuente fue el daño en las capas externas del área macular. Las alteraciones específicas incluyeron pérdida o amputación de la membrana limitante externa (27 ojos; 84,4%), pérdida o amputación de la capa mioide (27 ojos; 84,4%); alteración de la capa elipsoide (28 ojos; 87,5 %) y pérdida de los segmentos externos de los fotorreceptores (29 ojos; 90,6 %). La alteración del epitelio pigmentario de la retina se dividió según la pérdida de las diferentes capas: fagosomas (30 ojos; 93,8%), melanosomas (29 ojos; 90,6%) y mitocondrias (0 ojos; 0%). La presencia de edema macular quístico (EMQ) se correlacionó significativamente con alteraciones en los fotorreceptores. La amputación o ausencia de las capas mioide y elipsoide de los fotorreceptores fueron las únicas variables asociadas de forma independiente a la disminución de la BCVA.

Conclusiones: Los hallazgos de este estudio sugieren que la base fisiopatológica del síndrome de Usher en los primeros estadios de la enfermedad pueden ser cambios en las capas externas de la retina, particularmente en los fotorreceptores, que a su vez pueden causar alteraciones, como el EMQ, en las capas internas. En consecuencia, puede ser aconsejable monitorear el estado de los fotorreceptores durante el seguimiento, para la detección temprana de cambios patológicos en pacientes con USH1.



Retinal findings in pediatric patients with Usher syndrome Type 1 due to mutations in *MYO7A* gene

Olaia Subirà¹ · Jaume Català-Mora^{1,2} · Jesús Díaz-Cascajosa² · Noel Padrón-Pérez¹ · M. A. Claveria² · Natalia Coll-Alsina² · Crystel Bonnet^{3,4,5} · Christine Petit^{4,5,6,7} · J. M. Caminal¹ · Joan Prat²

Received: 12 September 2018 / Revised: 2 June 2019 / Accepted: 1 July 2019
© The Author(s), under exclusive licence to The Royal College of Ophthalmologists 2019

Abstract

Purpose To describe retinal alterations detected by swept-source optical coherence tomography (SS-OCT) in paediatric patients with Usher syndrome type 1 (USH1) and to compare these findings to previously published reports.

Methods Thirty-two eyes from 16 patients (11 males and 5 females) with a genetic diagnosis of USH1 because of *MYO7A* mutations underwent SS-OCT. Patients ranged in age from 4 to 17 years (mean, 11,13 ± 4,29). The subfoveal and macular area were analysed with SS-OCT at 1050 nm using 12 radial scans of 12.0 mm. Structural abnormalities were evaluated and correlated with best-corrected visual acuity (BCVA).

Results The most common qualitative retinal abnormality was external layer damage in macular area. Specific alterations included external limiting membrane loss/disruption (27 eyes; 84.4%), disruption of the Myoid zone (27 eyes; 84.4%); Ellipsoid zone disruption (28 eyes; 87.5%), and loss of the outer segments (29 eyes; 90.6%). The damage of the retinal pigment epithelium was divided according to the loss of the different layers: phagosome zone (30 eyes; 93.8%), melanosome zone (29 eyes; 90.6%) and mitochondria zone (0 eyes; 0%). The presence of cystoid macular oedema (CMO) was significantly correlated with alterations in photoreceptors. Disruption or absence of the myoid and ellipsoid zones of the photoreceptors were the only variables independently associated with decreased BCVA.

Conclusions The findings of this study suggest that the physiopathologic basis of early-stage Usher syndrome (USH) may be changes in the outer retinal layer, particularly the photoreceptors, which in turn may cause alterations—such as CMO—in the inner retinal layers. Accordingly, monitoring the condition of photoreceptors during follow-up may be advisable for the early detection of pathologic changes.

Introduction

Usher syndrome (USH) is an autosomal recessive disease characterized by a combination of sensorineural hearing loss (HL) and retinitis pigmentosa (RP) [1]. This syndrome accounts for 18% of all cases of RP [2]. USH is a clinically and genetically heterogeneous syndrome, as evidenced by the large number of disease-associated genes (eleven in total with the most frequently mutated genes being *USH2A* and *MYO7A*). USH can be classified into three different clinical types based on the specific genes involved and on the severity of HL. The characteristic symptom of RP is nyctalopia, caused by the loss of rod outer segments. In the earliest stages of USH, rod loss results in ring-shaped scotoma in the mid-periphery, which can progress to involve the periphery and the macula. In the final stage, damage to the cone photoreceptors induces central vision loss [3].

✉ Olaia Subirà
osubira@bellvitgehospital.cat

¹ Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

² Hospital de Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain

³ Syndrome de Usher et Autres Atteintes Rétino-Cochléaires, Institut de la Vision, Paris, France

⁴ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMRS120 Paris, France

⁵ Sorbonne Universités, UPMC University Paris, Complexité du Vivant, Paris, France

⁶ Genetics and Physiology of Hearing Laboratory, Institut Pasteur, Paris, France

⁷ College de France, Paris, France

The first generation of optical coherence tomography (OCT) had low resolution and did not allow us to distinguish retinal microscopical structures. The improvement in the resolution of the OCT with the arrival of spectral-domain OCT or swept-source OCT (SS-OCT), provides the opportunity to observe in vivo all the retinal layers, corresponding with the histological studies [4]. The analysis of the integrity of the photoreceptors and their relationship with the retinal pigment epithelium (RPE) is of major importance to understand the pathogenesis of degenerative retinal diseases like the RP in USH.

The aim of this study was to use SS-OCT to identify the qualitative alterations present in the retina of paediatric patients with early stage *MYO7A*-associated Usher syndrome type 1 (USH1); determining the precise location of the primary retinal damage and the associated pattern of progression was of particular interest. Secondly, we sought to correlate these alterations with best-corrected visual acuity (BCVA).

Methods

Patients and study design

In this retrospective study, we analysed 32 eyes from 16 patients (11 males and 5 females; age range 4–17 years; median age, 11 ± 4.29 years) with a genetic diagnosis of *MYO7A*-associated USH1. Three pairs ($n = 6$) of the patients were brothers (Table 1).

A comprehensive medical history was taken to determine age at diagnosis of USH, the first symptoms at onset, and family history of USH.

A complete ophthalmologic examination was performed, including determination of BCVA (decimal fractions with Snellen equivalent), automated visual field, electroretinography and SS-OCT.

The diagnosis of RP was based on the presence of relevant symptoms together with fundoscopic features (as

diffuse retinal vessel attenuation and RPE pigmentary changes), OCT alterations and severe reduction of the ERG responses. In all cases, audiometry was performed prior to study enrolment to confirm bilateral congenital HL. The diagnosis of USH was confirmed by genetic analysis (Table 2), with all of the patients having either one homozygous or two compound heterozygous mutations.

Exclusion criteria were: (1) history of any other ocular disease (cataract, uveitis or glaucoma); (2) refractive error > 5 diopters (due to its possible effect on choroidal thickness) [5]; and (3) prior ocular surgery (within 6 months prior to study enrolment).

The study was approved by the Research Ethics Committee at our hospital. All procedures were performed according to the hospital code of ethics and the study design adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all patients and/or their parents.

Swept-source optical coherence tomography

We scanned the macular area of both eyes using a Triton SS-OCT (Topcon Corporation, Tokyo, Japan) at a 1050 nm wavelength and scanning speed of 100,000 A-scans/second using a high-definition set of twelve 12.0 mm radial cuts. Retinal foveal and choroidal thicknesses were automatically measured and presented as a topographic map with nine subfields as defined by the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study style grid.

The SS-OCT images were closely evaluated to identify and describe any qualitative vitreoretinal alterations. For this purpose, the following structures were analysed: vitreous; inner limiting membrane (ILM), the presence of epiretinal membranes (ERMs), macular micropseudocysts (MPC) and cystoid macular oedema (CMO). With the aim of focusing on photoreceptor health and the relationship between photoreceptors and RPE, we used the nomenclature proposed by Cuenca et al. [4], based on morphological correlation between histology (using immunohistochemical methods) and OCT. Therefore, the terms used to identify the different segments of the photoreceptors are: external limiting membrane (ELM), Myoid zone, cone Ellipsoids (ISeZ) and Cone outer segment (OS). Whereas the RPE structures are: phagosome zone of the RPE (PhaZ), Melanosome zone of the RPE (RPEmel) and Mitochondria zone of the RPE (RPEmitz).

All scans were performed with dilated pupils (using cyclopentolate).

Statistical analysis

A descriptive analysis was performed. Measures of the central value (mean and median) and dispersion (standard

Table 1 Demographic and clinical features of patients with USH

Characteristic	Value
Age (years) ($n = 16$)	
Mean (median)	11,13 (11)
Sex	
Male	11 (68.75%)
Female	5 (31.25%)
Visual acuity	
Mean (median)	0.57 (0.6)

Retinal findings in pediatric patients with Usher syndrome Type 1 due to mutations in *MYO7A* gene

Table 2 USH mutations in this cohort

Patient	Gene	Mutations	
		Allele 1	Allele 2
1	<i>MYO7A</i>	c.3508 G > A, p.Glu1170Lys	c.3508 G > A, p.Glu1170Lys
2	<i>MYO7A</i>	c.3508 G > A, p.Glu1170Lys	c.3508 G > A, p.Glu1170Lys
3	<i>MYO7A</i>	c.2215 G > T, p.Glu739*	c.722 G > A, p.Arg241His
4	<i>MYO7A</i>	c.4489 G > C, p.Gly1497Arg	Exon 46 deleted
5	<i>MYO7A</i>	c.5944 G > A, p.Gly1982Arg	c.5944 G > A, p.Gly1982Arg
6	<i>MYO7A</i>	c.2283-1 G > T	c.3594 C > A, p.Cys1198*
7	<i>MYO7A</i>	c.6321 G > A, p.Trp2107*	c.6025delG, p.Ala2009Profs*32
8	<i>MYO7A</i>	c.2914 C > T, p.Arg972*	c.4131dupT, p.Gly1378Trpfs*6
9	<i>MYO7A</i>	c.5392 C > T, p.Gln1798*	c.5392 C > T, p.Gln1798*
10	<i>MYO7A</i>	c.999 T > G, p.Tyr333*	c.999 T > G, p.Tyr333*
11	<i>MYO7A</i>	c.2874_2878delCCAGG, p.Gln959Glyfs*5	c.2874_2878delCCAGG, p.Gln959Glyfs*5
12	<i>MYO7A</i>	c.2874_2878delCCAGG, p.Gln959Glyfs*5	c.2874_2878delCCAGG, p.Gln959Glyfs*5
13	<i>MYO7A</i>	c.999 T > G, p.Tyr333*	c.999 T > G, p.Tyr333*
14	<i>MYO7A</i>	c.4297delC, p.Gln1433Serfs*116	c.6025delG, p.Ala2009Profs*32
15	<i>MYO7A</i>	c.4297delC, p.Gln1433Serfs*116	c.6025delG, p.Ala2009Profs*32
16	<i>MYO7A</i>	c.6_9dupGATT, p. Leu4fsAsp*39	c.5573 T > C, p.Leu1858Pro

deviations [SD] and interquartile ranges [IQR]) were determined for continuous variables. Categorical variables were described as frequencies and percentages.

The Shapiro–Wilk test was performed to explore the distribution of the numerical data. Univariate and multivariate linear regression models were performed to assess the influence of the study variables on BCVA. All statistical tests were two-tailed. Statistical significance was set at $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using SPSS version 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL; USA).

Results

Demographics

A total of 16 patients (5 females [31.25%] and 11 males [68.75%]) were included. Of these, nine were of European origin, five were of South-East Asian origin and two of South-American origin. All patients had a genetic diagnosis of USH1, determined by the presence of the mutated gene *MYO7A*. (Table 2) We identified the disease-causing mutations by multiplex PCR and SNP array/qPCR. However, all mutations were confirmed by Sanger sequencing and the large deletion was confirmed by qPCR. All the patients in this study were analysed in the previous study of Bonnet et al. [5].

In six patients (37,5%), the parents were asymptomatic carriers of Usher genes. The mean BCVA for the group was

0.57 (decimal scale), ranging from 0.1 to 1.0 (SD, 0.32) (Table 1).

SS-OCT results

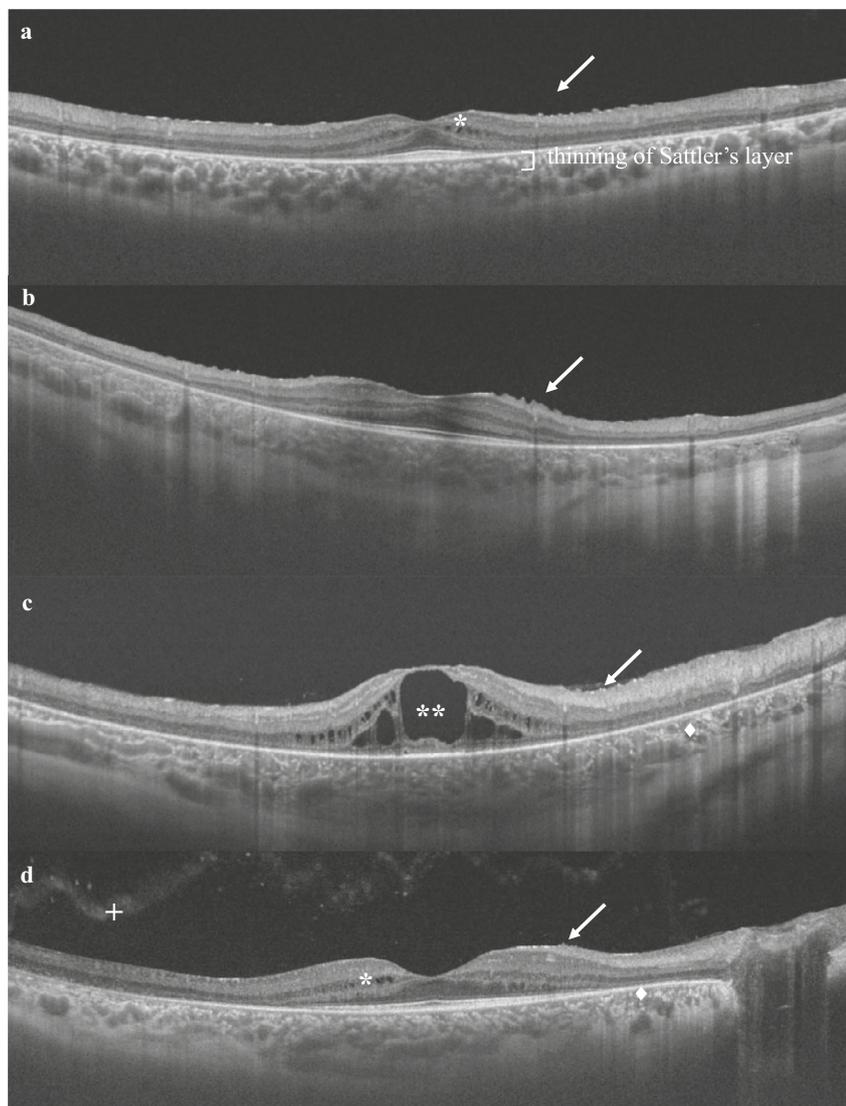
The SS-OCT results showed involvement of the ILM (hyperreflective points or waviness) in nine eyes (28.1%). MPCs and CMO were detected in 15 (46.9%) and 8 (25%) eyes, respectively. By contrast, ERM was not observed in any of the eyes.

In the analysis of the macular area, we analysed twelve 12.0 mm radial cuts centred on the fovea. The following abnormalities in the external retinal layers were reported: ELM loss or disruption (27 eyes; 84.4%); disruption of the Myoid zone (27 eyes; 84.4%); ISeZ disruption (28 eyes; 87.5%), and loss of the OS (29 eyes; 90.6%). The damage of the RPE was divided according to the loss of the different layers: PhaZ (30 eyes; 93.8%), RPEmel (29 eyes; 90.6%) and RPEmitz (0 eyes; 0%) (Fig. 1).

On the other hand, the same parameters in the subfoveal area were analysed, showing the following results: ELM loss or disruption (4 eyes; 12.5%); disruption of the Myoid zone (6 eyes; 18.8%); disruption of the ISeZ (6 eyes; 18.8%), and loss of the OS (16 eyes; 50%). The damage of the RPE was divided according to the loss of the different layers: PhaZ (7 eyes; 21.9%), RPEmel (7 eyes; 21.9%) and RPEmitz (0 eyes; 0%).

Eight eyes (25%) presented hyperreflective alterations in the vitreous cavity. It must be emphasized though that none

Fig. 1 SS-OCT scans of the fovea of four patients affected by USH, showing the most representative qualitative retinal and choroidal alterations. In the inner layers, the hyperreflective points (**a, c**) and waviness in ILM (**b, d**) are marked with an arrow. Alterations in other inner layers in the form of MPCs (**a, d**) (*) or CMO (**c**) are also shown (**). The absence of the ELM-IS/OS/RPE complex in the extrafoveal region of the external layers can be seen in all of these images, except for **c**, which shows the eye of a patient with substantial CMO leading to the disappearance of all external layers in the subfoveal area. Image **d** shows important hyperreflective condensations of the vitreous (+). In the choroid, the presence of finer alterations such as thinning of Sattler's layer (**a**) and the presence of hyperreflective foci (**c, d**) can be seen (◆)



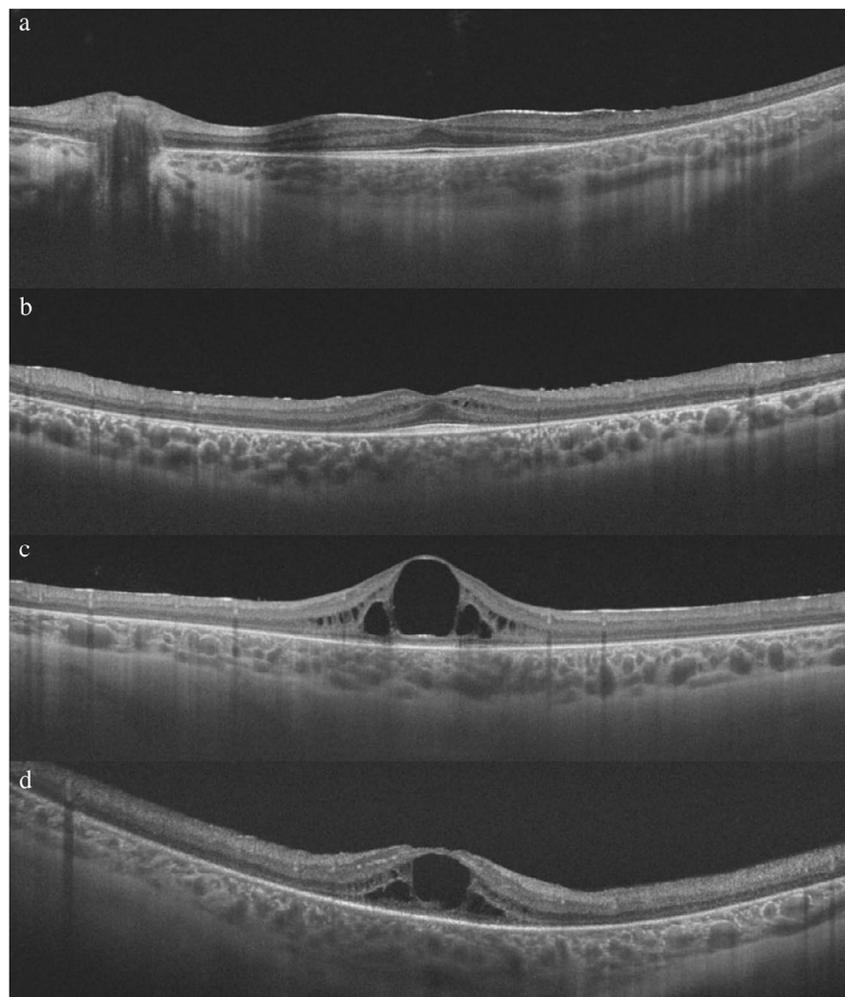
of the patients had vitreous cells in the ophthalmological examination (Fig. 2).

If we perform a general analysis of the state of the photoreceptors and the RPE, considering the damage in any of its segments, we observe the following results: at the macular area photoreceptors and RPE loss is 93.8% in both cases. Whereas if we focus the analysis in the subfoveal area we observe photoreceptors loss in 50% of the cases and RPE damage in 21.9% (Table 3).

The following choroidal alterations were observed: hyperreflective foci (25% of eyes); thinning/absence of Sattler's layer (15.6%); suprachoroidal hyporefective space (9.4%); and generalized thinning (3.1%).

A univariate analysis was performed to assess possible correlations between qualitative OCT findings in the subfoveal area and BCVA. That analysis showed that ELM layer integrity and a preserved Myoid and Ellipsoid zones of photoreceptor layer were associated with better BCVA. In patients presenting absent ELM, the mean BCVA was 0.35 versus 0.5 in patients with normal ELM ($p = 0.024$). Similarly, the mean BCVA for patients with normal versus disrupted/absent myoid and ellipsoid zone was, respectively, 0.52 and 0.32 ($p < 0.001$). No significant association was found between BCVA and any of the following: ILM alterations, the presence or absence of CMO or MPCs, alterations in the OS layer or damage in the RPE segments.

Fig. 2 SS-OCT scans of four patients affected by USH, showing the most representative external layers alterations in the subfoveal area: **a** Disruption of outer layers in the macular area, preservation of them in the subfoveal area. **b** Loss of OS layer of the photoreceptors. **c** Loss of all the photoreceptor segments: MLE, myoid zone, ellipsoid zone and OS. **d** Loss of all the photoreceptor segments and also inner segments of RPE (loss of PhaZ and RPEmel and RPEmit preservation)



Likewise, we found no association between BCVA and qualitative choroidal alterations.

To control for confounding factors, we performed a multivariate regression analysis. On that analysis, only disruption or absence of the myoid and ellipsoid zones remained independently associated with a lower BCVA ($R^2 = 0.47$; $t = -4.04$; $p = 0.001$).

Finally, to better understand the pathogenesis of macular oedema in these patients, we evaluated the correlations between CMO and ILM and between CMO and the absence/disruption of any segment of photoreceptors in the subfoveal area. That analysis showed that CMO was significantly correlated with the presence of alterations in the photoreceptor segments ($p = 0.013$; correlation coefficient, 0.433). By contrast, there was no statistically significant correlation between the presence of CMO and ILM abnormalities ($p = 0.827$).

Discussion

The main aim of the present report was to study the qualitative retinal alterations detected by SS-OCT in a group of paediatric patients with *MYO7A*-associated USH1. The most common qualitative abnormality in the retina of the macular area was external layers damage, including ELM loss or disruption (84.4% of eyes), ISeZ disruption (28 eyes; 87.5%) and loss of the OS (29 eyes; 90.6%). The damage of the different segments of RPE was: 93.8% PhaZ and 90.6% RPEmel and 0% RPEmitz.

The presence of CMO was significantly correlated with the presence of alterations in the photoreceptor segments. However, on the multivariate analysis, the only variables that were independently associated with decreased BCVA were disruption or absence of the myoid and ellipsoid zones. Overall, it can be speculated that the

Table 3 Qualitative retinal alterations in macular area

Retinal alterations observed	Frequency and percentage (eyes, $n = 32$)
ILM (altered)	9 (28.1%)
ERM (present)	0
MPCs (present)	15 (46.9%)
CMO (present)	8 (25%)
ELM (absent)	27 (84.4%)
Myoid zone (absent)	27 (84.4%)
ISeZ (absent)	28 (87.5%)
OS (absent)	29 (90.6%)
PhaZ (absent)	30 (93.8%)
RPEmel (absent)	29 (90.6%)
RPEmitz (absent)	0

ILM internal limiting membrane, ERM epiretinal membrane, MPC retinal micropseudocysts, CMO cystoid macular edema, ELM external limiting membrane, ISeZ ellipsoid zone, OS cone outer segments, PhaZ phagosome zone, RPEmel melanosome zone, RPEmitz mitochondria zone

pathophysiologic basis for *MYO7A*-associated USH in early stage disease could be alterations to the outer retinal layers (particularly the photoreceptors) and RPE. Plausibly, these outer layer alterations could be responsible for changes in the inner retinal layers—such as CMO.

OCT imaging can provide valuable data to better understand the alterations induced by USH and to better characterize the various stages of this disease. Prior studies using spectral-domain (SD)-OCT in patients with USH or nonsyndromic RP have reported contradictory results [6–13]. Several different factors could account for these differences, including the type of OCT used, the disease stage, patient age and race, and the USH type.

Testa et al. [7] retrospectively evaluated 134 USH patients. Of these, 42 were diagnosed with USH1 (mean age, 34.4 ± 17.0 years) and 91 with USH2 (mean age, 36.2 ± 13.0 years). The OCT findings revealed the presence of macular abnormalities in 126 of the 268 eyes (47.0%), with the most common abnormalities as follows: ERM (51 eyes; 19.0%), CMO (42 eyes; 15.7%), vitreomacular traction (38 eyes; 14.2%), and lamellar macular hole (7 eyes; 2.6%). In that study, macular abnormalities, particularly CMO, were more common in patients with USH1 than in patients with USH2. Sliesoraityte et al. [8] used SD-OCT imaging to evaluate CMO in 76 USH patients (mean age, 42 ± 14 years), finding cystic macular lesions in 37% of the eyes overall and in 45 and 29%, respectively, of the patients with *MYO7A* (the most common gene in USH1) or *USH2A* (the most common gene in USH2). Although the authors found some differences between the *MYO7A* and *USH2A* groups, these were not statistically significant [8].

Walia et al. performed OCT in 38 patients diagnosed with USH2 (mean age, 38 years), detecting the presence of CMO in 13 cases (34.2%) [9]. Tsilou et al. evaluated 81 patients diagnosed with either USH1 ($n = 32$; mean age, 33 years) or USH2 ($n = 34$; mean age, 42 years), finding that cystic foveal lesions were more common in the USH1 group [10].

Numerous studies have been carried out to evaluate macular abnormalities in nonsyndromic RP, revealing wide variability in the prevalence of macular abnormalities. In one study, Grigoropoulos et al. evaluated 42 eyes (21 patients) with RP, finding that CMO and ERM were present, respectively, in 19% ($n = 8$) and 64.3% ($n = 27$) of the eyes [11]. However, other authors have found a much lower prevalence of macular abnormalities in patients with RP. Hagiwara et al. used OCT to study 622 eyes from 323 patients with RP, detecting CMO in 34 eyes (5.5%) and ERM in only 4 eyes [12]. Between these two extremes, a cohort study by Triolo et al., who used SD-OCT to examine 176 eyes from 90 patients with RP, found that the most common retinal alterations were ILM thickening (118 eyes; 67%) and ERM (48 eyes; 27.3%). In that study, CMO and MPCs were detected in only 12.5% and 18.2% of eyes, respectively [13].

The present study is, to our knowledge, the first to use SS-OCT to assess the presence of retinal abnormalities in a cohort of paediatric patients diagnosed with USH1. Importantly, cystic macular abnormalities (15 eyes with MPCs and 8 eyes with CMO) were detected in more than two-thirds (71.9%) of the eyes, a significantly higher percentage than reported in other series. By contrast, none of our patients presented ERM, even though this alteration was the most common change observed in other series. These findings might support the hypothesis that ERM is more common in USH2 patients than in USH1. We found that ERM was less common in USH1 than in nonsyndromic RP, whereas the presence of CMO was more closely associated with USH1 than with nonsyndromic RP and USH2. These findings indicate that USH2 and nonsyndromic RP seem to present similar structural damage patterns, whereas patients with USH1 tend to present a broader range of macular abnormalities. However, larger studies are necessary to determine whether these findings are age related or due to genetically-determined conditions (i.e., Usher type); in this regard, our patient cohort was younger than other published studies and, based on the available evidence, CMO seems to be closely associated with younger age, whereas ERM is more common in older patients [6–13].

The main cause of cystic alterations in the macula is not clear. Kim et al. [14] evaluated a total of 266 eyes—133 of which were from patients with RP (mean age, 47.5 ± 18.1 years)—finding that vitreomacular interface abnormalities (VMIA) were present in 42.7% of the eyes with RP (they

did not evaluate the ILM). In that study, VMIA were significantly more common in eyes with CMO than in those without CMO (64.2% versus 36.8%; $P < 0.001$); by contrast, the IS/OS junction was better preserved in patients without CMO. Those authors did not assess other outer layers. Triolo et al. [13], observed ILM thickening in 67% of RP eyes and ERM in 27.3%. Those authors found that the IS/OS in the foveal region seems to be independent of the association with an evident CMO, contrary to the report by Kim et al. who found that CMO was strongly correlated with IS/OS disruption [14].

One novel finding of the current study was the presence of ILM alterations—in the form of hyperreflective points or undulations—that have not been previously associated with ERM or ILM thickening in USH patients (Fig. 1). Importantly, these ILM abnormalities were present in nearly one-fourth of the eyes in our sample. The most common macular alteration in our patient cohort was outer layer damage, consisting of IS/OS disruption/absence in >90% of the eyes, absence of the ELM in >80%, and OS/RPE disruption of more than two-thirds of patients. CMO was significantly correlated with alterations at the OS/RPE junction, but not with ILM or IS/OS abnormalities. Surprisingly, while both Triolo et al. [13] and Kim et al. [14] analysed the IS/OS junction, neither assessed the OS/RPE junction.

Other authors have performed biomicroscopic ocular evaluations in patients with RP, finding that vitreous alterations—including floating cottonball-like condensations, fibrillary degeneration, pigmentary or non-pigmentary vitreal particulation, and posterior vitreous detachment—are common in these patients [15]. In our study, close to 30% of the patients showed evidence of vitreous opacities on the OCT scan.

Our findings suggest that USH1 may initially affect the outer retinal layers, particularly the photoreceptors, and that alterations in these layers promote the development of CMO, regardless of the specific abnormalities present in the vitreomacular interface. We hypothesize that degeneration of the photoreceptors might induce a nonspecific inflammatory response, but the mechanisms leading to photoreceptor cell death are still unclear. Previous studies suggested that photoreceptor cell loss in RP is driven by apoptosis [16], but more recent reports indicate that other cell death pathways, such as the activation of cysteine-proteases, lysosomal proteases, autophagy and complement-mediated lysis, could be involved [17].

Another relevant question in this study is: Is *MYO7A*-retinopathy in a USH1 a photoreceptor-first or RPE-first disease? Due to the fact that none of the study participants had RPEmitz lesions, it can be speculated that *MYO7A*-retinopathy results in photoreceptor loss as a primary event. In the progression of the disease, it might involve the inner segments of the RPE (PhaZ and RPEmel). The fact that we

have not found RPEmitz lesions in any eye is the main argument for this hypothesis.

There are two locations of mitochondria cells in the retina: ellipsoid zone and RPE mitochondria zone. The mitochondria are critical organelles for cell function and survival. Their primary roles are adenosine triphosphate (ATP) production, control of cellular metabolism and regulation of apoptosis (programmed cell death) [4]. Our results show 87.5% of eyes with ellipsoid zone loss in the macular area, but no single eye with RPEmitz loss.

Of the various retinal alterations described in this report, only damage at the myoid and ellipsoid zones of photoreceptors were independently associated with a decrease of the BCVA. This finding is consistent with the report by Battaglia et al., who found that changes to the ELM and OS/RPE layers are independently associated with BCVA in patients with RP [18].

The findings of the present study indicate that the pathophysiologic basis of early stage USH1 may be alterations in the outer retinal layers, especially the photoreceptors. Consequently, clinicians should consider monitoring the condition of photoreceptors during follow up, as this could permit the early detection and treatment of pathologic changes. Indeed, the status of the photoreceptors and the inner segments of the RPE (PhaZ and RPEmel) could be important parameters to monitor to ensure proper follow-up of USH patients. The main limitation of this study is the cross-sectional design, which does not allow us to determine the time course of the changes to the photoreceptors. More studies are needed to better characterize the correlation between CMO and damage to the outer layers and to better understand the cell death pathways involved in these alterations.

Summary

What was known before

- Which were the retinal abnormalities in adult patients with Usher syndrome detected by OCT, specially in outer layers.

What this study adds

- The differences of these abnormalities in a cohort of paediatric patients with Usher syndrome.

Acknowledgements This work received no funding. We thank the families HEALTH-F2-2010-242013 (TREATRUSH). We also thank Bradley Londres for editing and improving the use of English in this document and Dr. Anne Kurtenbach for her critical review and comments of this paper.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

- Milam AH, Li ZY, Fariss RN. Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res.* 1998;17:175–205.
- Boughman JA, Vernon MSK. Usher syndrome: definition and estimate of prevalence from two high-risk populations. *J Chronic Dis.* 1983;36:595–603.
- Narayan DS, Wood JPM, Chidlow G, Casson RJ. A review of the mechanisms of cone degeneration in retinitis pigmentosa. *Acta Ophthalmol.* 2016;94:748–54.
- Cuenca N, Ortuño-Lizarán I, Pinilla I. Cellular characterization of OCT and outer retinal bands using specific immunohistochemistry markers and clinical implications. *Ophthalmology.* 2018;125:407–22.
- Bonnet C, Riahi Z, Chantot-Bastarud S, Smaghe L, Letexier M, Marcaillou C, et al. An innovative strategy for the molecular diagnosis of Usher syndrome identifies causal biallelic mutations in 93% of European patients. *Eur J Hum Genet.* 2016;24:1730–8.
- Jin P, Zou H, Zhu J, Xu XUN, Jin J, Chang TAC, et al. Choroidal and retinal thickness in children with different refractive status measured by swept-source optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol.* 2016;168:164–76.
- Testa F, Melillo P, Rossi S, Marcelli V, Benedictis D, Colucci R, et al. Prevalence of macular abnormalities assessed by optical coherence tomography in patients with Usher syndrome. *Ophthalmic Genet.* 2018;39:17–21.
- Sliesoraityte I, Peto T, Mohand-said S, Sahel JA. Novel grading system for quantification of cystic macular lesions in Usher syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10:157.
- Walia S, Fishman GA, Hajali M. Prevalence of cystic macular lesions in patients with Usher II syndrome. *Eye.* 2008;23:1206–9.
- Tsilou ET, Rubin BI, Caruso RC, Reed GF, Pikus A, Hejtmancik JF, et al. Usher syndrome clinical types I and II: Could ocular symptoms and signs differentiate between the two types? *Acta Ophthalmol Scand.* 2002;80:196–201.
- Grigoropoulos VG, Emfietzoglou J, Nikolaidis P, Chatzistefanou KVJ, Theodossiadis GPTP. Optical coherence tomography findings in patients with retinitis pigmentosa and low visual acuity. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging.* 2010;41:35–9.
- Hagiwara A, Yamamoto S, Ogata K, Sugawara T, Hiramatsu A, Shibata M, et al. Macular abnormalities in patients with retinitis pigmentosa: prevalence on OCT examination and outcomes of vitreoretinal surgery. *Acta Ophthalmol.* 2011;89:e122–5.
- Triolo G, Pierro L, Parodi MB, De Benedetto U, Gagliardi M, Manitto MP, et al. Spectral domain optical coherence tomography findings in patients with retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Res.* 2013;50:160–4.
- Kim YJ, Joe SG, Lee D, Lee JY, Kim J. Correlations between spectral-domain OCT measurements and visual acuity in cystoid macular edema associated with retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54:1303–9.
- Vingolo EM, Giusti C, Forte ROP. Vitreal alterations in retinitis pigmentosa: biomicroscopic appearance and statistical evaluation. *Ophthalmologica.* 1996;210:104–7.
- Chang G, Hao Y, Wong F, Carolina N. Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron.* 1993;11:595–605.
- Lohr HR, Kuntchithapautham K, Sharma AK. Multiple, parallel cellular suicide mechanisms participate in photoreceptor cell death. *Exp Eye Res.* 2006;83:380–9.
- Battaglia PM, La SC, Triolo G, Ricciari F, Pierro L, Gagliardi M, et al. Correlation of SD-OCT findings and visual function in patients with retinitis pigmentosa. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2016;254:1275–9.

ARTÍCULO 2

Resumen del artículo 2

Objetivo: el objetivo principal fue dar respuesta a la pregunta: ¿es la distrofia retiniana hereditaria secundaria a mutaciones del gen *MYO7A* (*MYO7A*-IRD) una enfermedad que prioriza los fotorreceptores o el epitelio pigmentario de la retina? El segundo objetivo fue determinar los biomarcadores más útiles para monitorizar la progresión de la enfermedad en pacientes pediátricos con síndrome de Usher tipo 1B (USH1) secundario a la mutación *MYO7A*.

Métodos: Cincuenta y dos ojos de 26 pacientes con diagnóstico genético de mutación *MYO7A* se sometieron a SS-OCT. Las anomalías estructurales se evaluaron y se correlacionaron con el tiempo de seguimiento y la mejor agudeza visual corregida (BCVA, de sus siglas en inglés). Todos los pacientes fueron evaluados al inicio y después de ≥ 40 meses de seguimiento.

Resultados: La edad media de los pacientes fue de 9,92 ($\pm 4,1$) años. El tiempo medio de seguimiento fue de 43 ($\pm 3,2$) meses. En la evaluación final, las alteraciones cualitativas más frecuentes en el área subfoveal fueron las anomalías en los segmentos externos de los fotorreceptores (76,9% de los ojos) y en la capa de interdigitación (IZ) del epitelio pigmentario de la retina (80,8%). La presencia de edema macular cistoide al inicio del estudio se asoció de forma independiente con una menor BCVA en la evaluación final (estimación = 0,142; $t(45,00) = 2,78$, p -valor = 0,009). La anchura media de las capas elipsoide e interdigitación disminuyó significativamente a lo largo del seguimiento (en 668 μm y 278 μm , respectivamente; ambas $p < 0,001$).

Conclusiones: Este estudio muestra que las primeras alteraciones detectadas por SS-OCT en las fases tempranas de la retinopatía *MYO7A* son una disrupción de los segmentos externos de los fotorreceptores y de la IZ. Nuestros datos ponen de manifiesto el valor potencial de la medición de la anchura de la elipsoide y de la IZ durante el seguimiento para evaluar la progresión de la enfermedad, así como el valor de la monitorización de la aparición de lesiones cuánticas como biomarcador de peor pronóstico visual en pacientes con USH1-*MYO7A*.



Optical coherence tomography biomarkers in *MYO7A*-inherited retinal dystrophy: longitudinal study in pediatric patients

Olaia Subirà¹ · Jaume Català-Mora^{2,3,4} · Cristina del Prado^{2,4} · Jesús Díaz-Casajosa^{2,4} · Marina Barraso Rodrigo^{2,4} · Estefanía Cobos^{3,4} · Cinthia Aguilera⁵ · Anna Esteve-García⁵ · José García-Arumi^{1,6,7} · Josep M. Caminal^{3,4}

Received: 19 January 2024 / Revised: 3 June 2024 / Accepted: 6 June 2024

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2024

Abstract

Purpose This study aims to answer a key question: is *MYO7A*-inherited retinal dystrophy (*MYO7A*-IRD) a photoreceptor-first or retinal pigment epithelium-first disease? A second aim was to determine the most useful biomarkers to monitor disease progression in pediatric patients with Usher syndrome type 1B (*USH1*) secondary to *MYO7A* mutation.

Methods Fifty-two eyes from 26 patients with genetically-confirmed *MYO7A*-IRD underwent swept-source optical coherence tomography (SS-OCT). Structural abnormalities were evaluated and correlated with follow-up time and best corrected visual acuity (BCVA). All patients were evaluated at baseline and after ≥ 40 months of follow-up.

Results The mean (SD) patient age was 9.92 (± 4.1) years. Mean follow-up time was 43 (± 3.2) months. At the final evaluation, the most common qualitative abnormalities in the subfoveal area were alterations in the photoreceptor outer segments (76.9% of eyes) and in the interdigitation zone (IZ) (80.8%). The presence of cystoid macular edema at baseline was independently associated with worse BCVA at the final assessment (increase in LogMAR estimate = 0.142; $t(45.00) = 2.78$, $p = 0.009$). The mean width of the ellipsoid and interdigitation zones decreased significantly (by 668 μm and 278 μm , respectively; both $p < 0.001$).

Conclusion This study shows that disruption of the photoreceptor outer segments and the IZ are the first alterations detected by SS-OCT in the early phases of *MYO7A*-IRD. These data highlight the potential value of measuring the width of the ellipsoid and IZ to evaluate disease progression. These findings also demonstrate the utility of monitoring for the emergence of cystic lesions as biomarkers of worse visual prognosis in patients with *MYO7A*-IRD.

Keywords *MYO7A* mutations · Retinitis pigmentosa · Rod-cone dystrophy · Usher syndrome

✉ Olaia Subirà
olaia.subira@vallhebron.cat

¹ Ophthalmology Department, Hospital Universitari de Vall d'Hebron, Passeig de la Vall d'Hebron, 119, 08035 Barcelona, Spain

² Ophthalmology Department, Hospital de Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain

³ Ophthalmology Department, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

⁴ Unitat de Distrofies Hereditàries de Retina, Hospital Sant Joan de Déu-Hospital Bellvitge, Barcelona, Spain

⁵ Laboratori Clínic Territorial Metropolitana Sud, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Clinical Genetics Unit, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

⁶ Instituto de Microcirugía Ocular (IMO), Barcelona, Spain

⁷ Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

KEY MESSAGE**What is known**

- The outer layers of the retina are the first layers affected in patients with *MYO7A*-inherited retinal dystrophy (*MYO7A*-IRD). However, there is some controversy surrounding the exact location of *MYO7A*: is *MYO7A*-IRD a photoreceptor-first or retinal pigment epithelium-first disease?

What is new

- This is the first longitudinal study to assess *MYO7A*-IRD in pediatric patients. The results suggest that the primary event of *MYO7A*-IRD is damage at the connection point between the retinal pigment epithelium microvilli and the outer segment of the photoreceptors.
- These findings point to photoreceptor cells as a therapeutic target for gene therapy treatment trials in patients with Usher syndrome due to *MYO7A* mutations. Routine evaluation of the width of the ellipsoid and interdigitation zones maybe useful to assess treatment response.

Introduction

Usher syndrome (USH) is an autosomal recessive disease characterized by a combination of sensorineural hearing loss and retinitis pigmentosa (RP); in some cases, vestibular dysfunction may also be present [1]. Mutations in nine different genes have been associated with different forms of USH, although *MYO7A* gene mutations are the most common cause of USH type 1B (USH1B) [2].

The characteristic symptoms of RP include night blindness, progressive peripheral visual field loss resulting from rod degeneration, and a gradual decline in central visual acuity as cones become affected. To better understand the pathogenesis of retinopathy in USH, it is essential to evaluate photoreceptor integrity and the relationship between the photoreceptors and the retinal pigment epithelium (RPE). In eyes affected by USH1B, swept-source optical coherence tomography (SS-OCT) can be used to evaluate and monitor a wide range of retinal alterations.

In this context, this study had two main aims: 1) to identify the biomarkers that are first detected by SS-OCT in pediatric patients with USH1 secondary to *MYO7A* mutation, and 2) to determine which of these parameters are most useful to monitor disease progression.

Methods**Study design**

This was a retrospective, longitudinal study involving 52 eyes from 26 patients (10 females, 16 males) with genetically confirmed biallelic *MYO7A* mutations associated with USH1. All patients had either one homozygous or two compound heterozygous mutations. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) and single nucleotide polymorphism (SNP) array-quantitative (q) PCR were performed to identify the disease-causing mutations. Segregation analysis was conducted in all patients to confirm the *trans* configuration of the identified *MYO7A* variants. The DNA sequencing methods used in this study have been described in detail by Bonnet et al. [3].

A comprehensive medical history was taken in all patients, including age at USH diagnosis, family history of USH, and the first symptoms of the disease. Audiometry was performed in all cases to confirm bilateral congenital hearing loss. RP was diagnosed based on the presence of characteristic funduscopic findings (i.e., RPE pigmentary changes or diffuse retinal vessel attenuation), the presence of those alterations on OCT, and a decrease in electroretinogram response.

The study was approved by the Research Ethics Committee at our hospital. All procedures were performed in

accordance with the hospital's code of ethics. The study adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki.

Ophthalmologic assessment

A complete ophthalmologic examination was performed, including the following: determination of best-corrected visual acuity (BCVA) (Snellen charts converted to logarithm of the minimum angle of resolution [logMAR] units for statistical analysis); dilated fundus examination; color and autofluorescence (FAF) ultra-widefield fundus photography (Optos Inc., California, USA); Static Humphrey 24–2 visual field and/or dynamic semi-automatic Humphrey visual field with stimulus III and V; full-field electroretinography (following ISCEV guidelines with Diagnosis LLC mobile visual electrophysiology system, Dublin, Ireland); and Triton SS-OCT (Topcon Corporation, Tokyo, Japan) at a 1050 nm wavelength and scanning speed of 100,000 A-scans/second using a high-definition set of twelve 12.0 mm radial cuts.

The patients ranged in age from 4 to 19 years at the start of the study. All participants were evaluated at baseline and after ≥ 40 months (mean, 43; SD, 3.2 months) of follow-up.

Exclusion criteria were: refractive error > 5 diopters, history of any other ocular disease, and prior ocular surgery performed < 6 months before study enrolment.

The macular area of both eyes was scanned with a Triton SS-OCT. The twelve images of the SS-OCT radial cuts were evaluated to identify qualitative vitreoretinal alterations. The following features were evaluated: vitreous; inner limiting membrane (ILM); presence of epiretinal membrane (ERM); hyperreflective foci (HRFs; punctate hyperreflective dots observed in the outer retinal layers); microcystic macular edema (MME; small empty spaces or cavities confined to the inner nuclear layer); and cystoid macular edema (CME). The OCT images of the horizontal radial cut centered on the nerve and fovea were used for quantitative measurements. The measurements obtained at the baseline and final evaluation were compared.

To better understand the relationship between the photoreceptors and RPE, we analyzed the different layers that involve any of the photoreceptor segments or RPE structures, as follows: outer plexiform layer (OPL), outer nuclear layer (ONL), external limiting membrane (ELM), myoid zone (MZ), ellipsoid zone (EZ), outer segments of photoreceptors (OS), interdigitation zone (IZ), and RPE-Bruch's membrane complex. The alterations in these OCT bands were independently evaluated by two researchers. Any disagreements between the observers were resolved by a third researcher. Changes in the OCT bands were considered as qualitative variables and classified as either "preserved" or "affected" (i.e., absent or disrupted) layers in the macular and subfoveal areas. Additionally, changes over time in the width of the EZ and IZ were assessed as quantitative variables.

Statistical analyses

A descriptive analysis of the data was performed. Categorical variables are described as frequencies and percentages and numerical variables as means with standard deviation (SD). QQ plots were used to assess distribution normality of the numerical variables.

We performed multiple bivariate analyses. The Chi-square and Fisher's exact tests were used to evaluate possible associations between categorical variables. Repeated measures correlation coefficients were calculated to evaluate correlations between numerical variables while controlling for non-independence between eyes from the same participant. Depending on the type of distribution, the Student's *t*-test or Mann–Whitney's *U*-test was applied, as

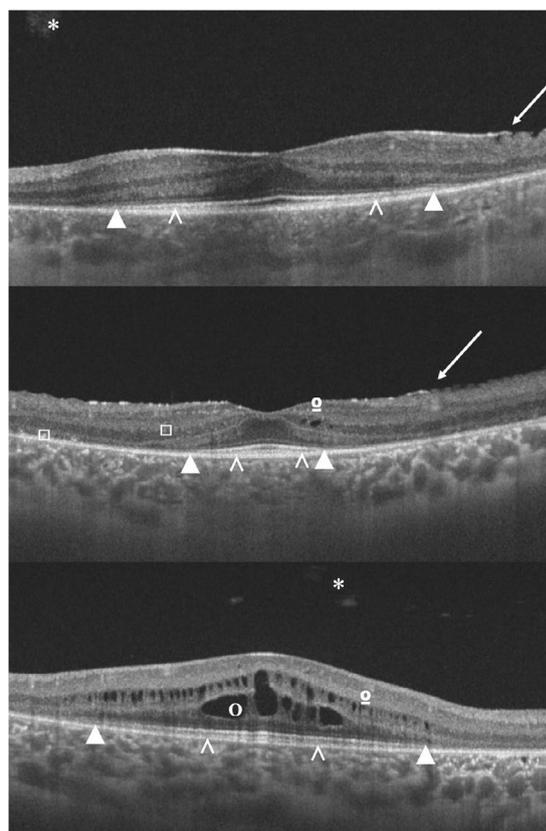


Fig. 1 SS-OCT scans of the fovea of three patients with *MYO7A*-IRD showing the most representative retinal alterations. Disruption of the EZ (\blacktriangle) and IZ (\blacktriangledown) layers was observed in all three of these patients (\wedge). The images show alterations in the vitreoretinal interface, including internal limiting membrane waviness (arrows) and vitreous condensations (*). Hyperreflective foci (\square), microcystic macular edema (\ast), and cystoid macular edema (\circ) are present in the inner layers

appropriate, to test for between-group differences in numerical values.

For this study, the variables were measured at two time points: at baseline and at the final assessment after at least 40 months of follow-up. McNemar's test was used to study changes from baseline to the final follow-up for categorical variables. For numerical data, we used the Student's t-test for paired data or Wilcoxon's signed-rank test, as appropriate, to compare the baseline and final measurements.

The variables significantly associated with the variables of interest on the bivariate analysis were included in a multivariate analysis. We used mixed models to account for the non-independence of measures in both eyes in the same participant. Linear or logistic mixed model regressions were performed according to the type of dependent variable (numerical or categorical).

Statistical significance was set at $P < 0.05$. Bonferroni's correction for multiple testing was used for the bivariate analysis. All statistical tests were two-tailed. RStudio v.2021.09.0 + 351 and SPSS v. 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL; USA) were used to perform the statistical analyses.

Results

The mean age of the *MYO7A*-IRD patients at baseline was 9.9 years (SD, 4.1; range, 4–19). The mean time between the baseline and final assessments was 43 months (SD, 3.2; range, 40–48). The mean (SD) BCVA [logMAR] was 0.176 (± 0.175) at baseline and 0.231 (± 0.189) at the follow-up examination.

Descriptive analysis of changes in OCT

In the analysis of the vitreoretinal interface, we observed an incidence of ERM of 1.9% at baseline vs. 3.8% at follow-up. Similarly, the incidence of ILM alterations rose from 19.2% to 30.8%. Likewise, vitreous condensations were found in 34.6% of patients at baseline and 38.5% at follow-up.

Cystic retinal alterations were also found. MME was observed in 42.3% of eyes at both time points (baseline and follow-up). CME was present in 25% of eyes at baseline vs. 30.8% at follow-up. HRFs were detected in 36.5% of eyes at baseline vs. 50% at follow-up (Fig. 1).

Table 1 Retinal layer alterations in the macular and subfoveal areas at baseline and final follow-up

Layer involvement	Macular area		Subfoveal area	
	Baseline Number of eyes (%)	Follow-up Number of eyes (%)	Baseline Number of eyes (%)	Follow-up Number of eyes (%)
<i>OPL</i>	29 (55.8)*	45 (86.5)*	13 (25)**	26 (50)**
<i>ONL</i>	44 (84.6)	46 (88.5)	26 (50)	27 (51.9)
<i>ELM</i>	46 (88.5)	47 (90.4)	7 (13.5)	10 (19.2)
<i>MZ</i>	44 (84.6)	49 (94.2)	10 (19.2)	10 (19.2)
<i>EZ</i>	51 (98.1)	52 (100)	10 (19.2)	13 (25)
<i>OS</i>	51 (98.1)	52 (100)	26 (50)***	40 (76.9)***
<i>IZ</i>	51 (98.1)	52 (100)	29 (55.8)****	42 (80.8)****
<i>RPE</i>	7 (13.5)	9 (17.3)	0	0

Abbreviations: *OPL* Outer plexiform layer; *ONL* Outer nuclear layer; *ELM* External limiting membrane; *MZ* Myoid zone; *EZ* Ellipsoid zone; *OS* Cone outer segments; *IZ* Interdigitation zone; *RPE* Retinal pigment epithelium

Statistically significant changes in the analysis with McNemar test and Bonferroni correction ($p < 0.0029$): *McNemar $\chi^2 (1) = 14.062$, p -value = 0.00018; **McNemar $\chi^2 (1) = 11.077$, p -value = 0.00087; ***McNemar $\chi^2 (1) = 12.071$, p -value = 0.00051; ****McNemar $\chi^2 (1) = 11.077$, p -value = 0.00087

Table 2 Study of cystic lesions during the observation period

	Baseline		Follow-up	
	CME (No)	CME (Yes)	CME (No)	CME (Yes)
MME at baseline (No)	28 eyes (93.3%)	2 eyes (6.7%)	28 eyes (100%)	0 eyes (0%)
MME at baseline (Yes)	11 eyes (50%)	11 eyes (50%)	8 eyes (72.7%)	3 eyes (27.3%)

$p = 0.018$, Fisher's Exact Test

Abbreviations: *MME* Microcystic macular edema; *CME* Cystoid macular edema

Finally, we studied the involvement of the retinal layers where the various parts of the photoreceptors and RPE are located (from the inner nuclear layer to the RPE-Bruch's membrane complex). The analysis of the macular and subfoveal areas confirmed less involvement of the subfoveal area at both study time points due to centripetal progression of the RP. As a result, the subfoveal area had a greater specificity than the macular area in terms of the study of disease progression (Table 1).

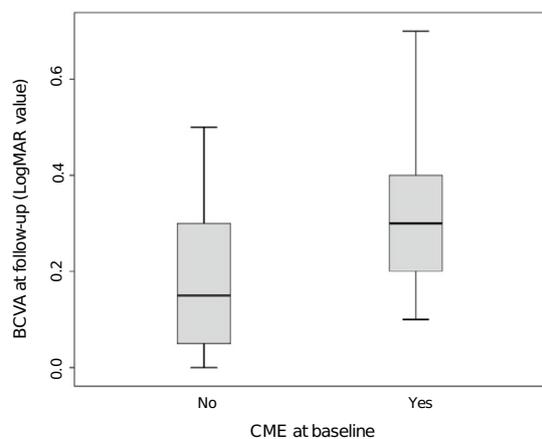


Fig. 2 Final best corrected visual acuity (BCVA) according to the presence or not of cystoid macular edema (CME) at baseline

Influence of patient age on retinal alterations detected by OCT

Age was significantly associated with several baseline variables. The mean age of patients without macular involvement of the ONL [$t(49.8) = -6.97, p < 0.001$], ELM [$t(24.95) = -5.2, p < 0.001$], and the MZ [$t(32.27) = -4.04, p < 0.001$] was lower than that of patients with macular involvement. At the follow-up examination, involvement of the OPL in the macular area was associated with a higher median age [$t(18.39) = -3.58, p = 0.0021$]. By contrast, age was not significantly associated with the presence of cystic retinal alterations (CME or MME).

Analysis of the emergence of CME and MME

We studied the relationship between presenting MME and CME. We observed that 11 eyes (50%) of patients with CME at baseline had MME simultaneously. There was a significant positive association between the presence of CME and MME (odds ratio, 13.2; 95% confidence interval: 2.35–141.82; $p < 0.001$). To determine whether the presence of MME at baseline was associated with the subsequent development of CME, we excluded the 13 cases with baseline CME. Of the 11 (50%) eyes who had only MME at baseline, 3 eyes (27.3%) developed CME during the follow-up period. By contrast, none of the patients without baseline MME developed CME during follow-up period ($p = 0.018$, Fisher's Exact Test) (Table 2).

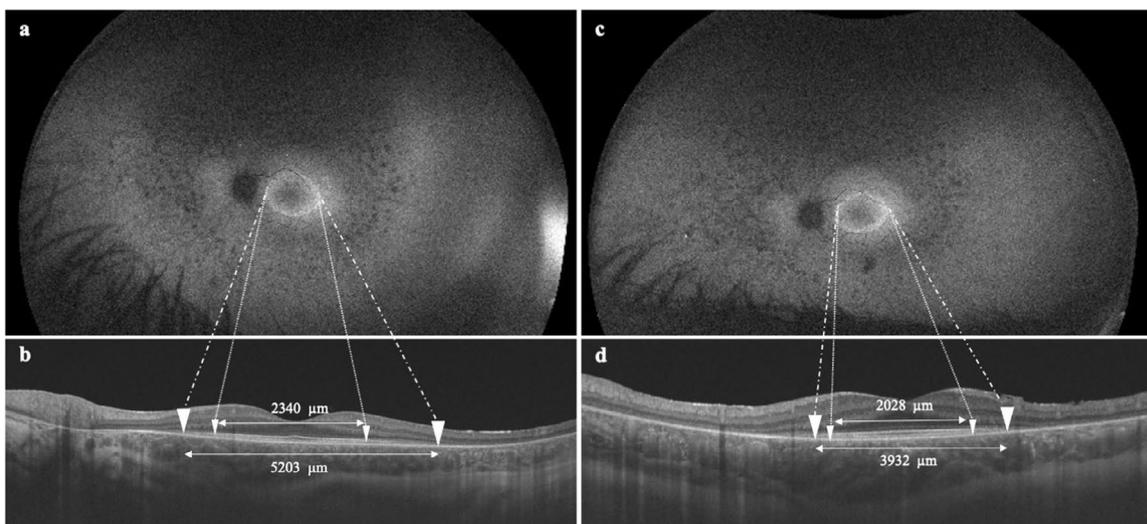


Fig. 3 Example of autofluorescence and measurements, based on SS-OCT, of the ellipsoid and interdigitation zones of the left eye in a patient with USH1 at baseline (a and b) and 56 months later (c and d)

On the bivariate study, the presence of HRFs ($\chi^2(1) = 9.36$, $p = 0.002$) and absence/disruption of the subfoveal IZ ($p = 0.001$, Fisher's exact test) at baseline were both associated with the development of CME or MME. However, on the multivariate logistic mixed model, neither of these variables were significantly associated with the development of CME or MME.

Association between baseline alterations and final BCVA

On the bivariate analysis, lower BCVA at the final follow-up was significantly associated with three baseline variables: disrupted/absent MZ ($W = 45.5$, $p < 0.001$), EZ ($W = 45.5$, $p < 0.001$), and IZ ($W = 192.5$, $p = 0.008$). The presence of CME at baseline was associated with worse BCVA at the final evaluation ($W = 91$, $p < 0.001$). However, on the multivariate analysis (mixed logistic regression model), the only baseline variable that remained independently associated with a lower BCVA at follow-up was CME (estimate = 0.142; $t(45.00) = 2.78$; $p = 0.009$) (Fig. 2).

Evaluation of rates of disease progression

To determine the best biomarker of disease progression we evaluated changes in the width of the EZ and IZ over time, finding significant decreases in both variables (668 μm and 278 μm , respectively). The estimated annual mean decrease was 191 μm for the EZ and 79 μm for the IZ (Fig. 3).

On the mixed linear model, the best predictors of changes in BCVA were a decrease in IZ and EZ width, both of which were associated with worse BCVA. However, this association was statistically significant only for the IZ width ($p = 0.01$). In general, we found that when the EZ or IZ width at baseline was small, even minor changes in the width resulted in more pronounced changes in BCVA.

Discussion

The main aims of this study were to identify the biomarkers first detected by SS-OCT in the first two decades of life in patients with *MYO7A*-IRD, and to determine which of these parameters are most useful to evaluate disease progression (retinal damage).

The most common qualitative abnormalities in the subfoveal area at baseline were alterations in the external layers. However, the only variables showing a significant difference between the baseline and final examinations were: the OS band -at baseline, 50% of eyes were involved vs. 76.9% of eyes at the final examination ($p < 0.001$) - and the IZ band -at baseline, 55.8% of eyes were involved vs. 80.8% at the final follow-up ($p < 0.001$).

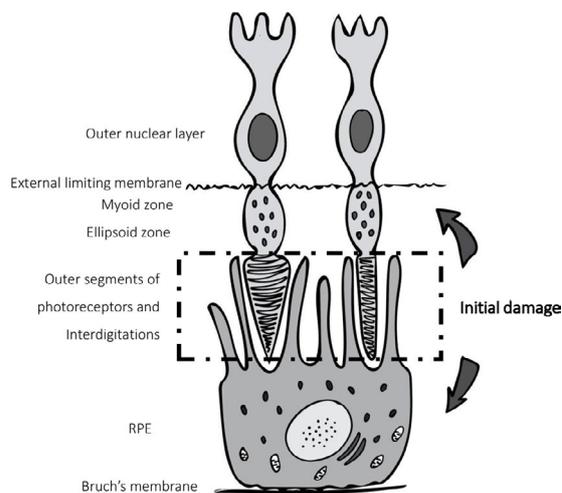


Fig. 4 Diagram showing the retinal layers to illustrate our hypothesis that disease progression starts with initial damage at the connection point between the outer segments of the photoreceptors and the microvilli of the retinal pigment epithelium

The exact location of *MYO7A* in the retina is somewhat controversial. Jacobson et al. [4] suggested that the photoreceptor is the first detectable site of *MYO7A* disease in young individuals and those with early-stage disease, although the investigators only studied 3 pediatric patients with this mutation. By contrast, Hasson et al. [5] and Williams et al. [6] have postulated that most of the *MYO7A* in the retina is present in the RPE, with a small amount associated with the ciliary and periciliary membrane of the photoreceptor cells. Studies involving *MYO7A*-null mice have shown that *MYO7A* localizes to the apical region of RPE melanosomes and may be involved in the removal of phagosomes from the apical RPE for delivery to lysosomes in the basal RPE [6–8]. In the photoreceptors, opsin abnormally accumulates in the transition zone of the cilium, suggesting that *MYO7A* may function as a selective barrier for membrane proteins at the distal end of the transition zone of the photoreceptors, thus playing an important role in the maintenance of the periciliary structure [9].

Our findings suggest that the primary event of *MYO7A*-IRD is damage at the connection point between the RPE microvilli (represented by changes in the IZ) and the outer segment of the photoreceptors (represented by changes in the EZ). This hypothesis regarding the importance of the IZ as a potential primary site of pathology may be explained by the following facts: the IZ width is always smaller than the EZ width, and IZ is the most affected band of the outer layers at baseline and at the final follow-up (55.8% and 80.8% of eyes, respectively). On the other hand, only 17.3% (9/52) of the eyes in this study developed RPE/Bruch's complex

lesions in the macular area during follow-up, and we did not observe any cases of RPE/Bruch's complex lesions in the subfoveal area during the entire follow-up period. This finding suggests that progression of *MYO7A*-IRD starts with involvement of the photoreceptor outer segments and the IZ of the RPE, and then progresses centrifugally to involve nearby layers (i.e., the ellipsoid and myoid zones) (Fig. 4).

This hypothesis regarding centrifugal evolution is further supported by age differences between patients with and without macular involvement of the external nuclear layer, ELM, or MZ. Patients without macular involvement were significantly ($p < 0.001$) younger than those with macular involvement, indicating that those layers do not appear to be affected until the disease progresses over time (i.e., as the patient ages). Similarly, we also found outer plexiform involvement in older patients at the final follow-up evaluation. These findings are consistent with the results of a previous cross-sectional study carried out by our group [10] and with the study by Sousa et al. [11], who evaluated 48 eyes with RP. Those authors found that the three layers most commonly absent in patients with RP were the EZ (absent in 79.2%), IZ (70.8%), and ELM (45.8%). However, those authors did not evaluate the OS layer.

We evaluated the presence of cystic lesions in the macular area in order to determine how they influence on BVCA. Microcystic macular edema (MME or MMO) refers to the presence of small retinal cysts confined to the inner nuclear layer (INL) [12]. These cysts typically have square or rectangular shapes with at least one border appearing concave or straight, lacking an obvious wall, which has led some authors to prefer the term micropseudocysts (MPC) [13, 14]. Recent research has mainly focused on MME in conditions with optic neuropathy such as multiple sclerosis, where MME is believed to result from the breakdown of the blood-retinal barrier or focal inflammation [12]. Other authors have described MME in optic neuropathies such as compressive optic neuropathy, Leber's hereditary optic neuropathy or dominant optic atrophy [15, 16]. Those authors suggest that retrograde trans-synaptic degeneration from optic neuropathy may contribute to the degeneration of the INL and the formation of cystic spaces. Importantly, MME (or MPCs) are not limited to optic disk pathologies and have been documented in other conditions such as age-related macular degeneration, idiopathic juxtafoveolar retinal telangiectasis, tamoxifen retinopathy or RP [17–21].

Studies performed to assess macular cystic lesions in individuals with nonsyndromic RP have found significant variability in the occurrence of these irregularities. For example, Grigoropoulos and colleagues examined 42 eyes affected by RP, finding that CME and ERM were present in 19% (8 eyes) and 64.3% (27 eyes) of cases, respectively [20]. A cohort study by Triolo et al. in patients with RP used SD-OCT to evaluate 176 eyes (90 patients), finding that the most

common macular alterations were thickening of the ILM in 118 eyes (67%) and ERM in 48 eyes (27.3%); however, MME and CME were detected in only 18.2% and 12.5% of eyes, respectively [14]. Conversely, other researchers, such as Hagiwara et al. [21], have reported a considerably lower prevalence of cystic macular lesions in patients with RP. In that study, which included 622 eyes (323 patients), the authors found CME in only 5.5% of eyes and ERM in only 4 eyes. By contrast, the incidence of CME in our cohort was significantly higher, with 50% of patients with CME at baseline having comorbid MME. Moreover, those two variables were significantly and positively associated, with 27.3% of patients who developed CME during follow-up presenting MME at baseline.

The primary cause of cystic macular alterations is not well-understood. Kim et al. evaluated 220 eyes in 128 RP patients (mean age \pm SD: 47.5 \pm 18.1 years) finding the presence of vitreomacular interface abnormalities in 42.7% of RP-affected eyes, which was associated with CME in 64.2% of the eyes ($P < 0.001$). In that study, the CME group had a significantly higher risk ($p = 0.016$) of presenting disruption of the inner segment/outer segment junction (IS/OS) [22]. By contrast, Triolo et al. found that disruption of the IS/OS junction in the foveal region was independent of the presence of CME. Those authors found ILM thickening in 67% of RP-affected eyes and ERM in 27.3% of cases [14]. In our study, ERM was present at baseline in only 1.9% of eyes and 3.8% at the final follow-up; the incidence of ILM alterations at baseline was 19.2% vs. 30.8% at follow-up. These results suggest that ERM occurs less frequently in USH1 compared to nonsyndromic RP, while the presence of MME or CME is more closely associated with USH1 than with nonsyndromic RP or USH2. However, it is important to underscore that our patients were younger, on average than the cohorts in most other published studies, which is relevant given that the available data suggests that CME is more common in younger individuals while ERM is more prevalent in older patients [14, 20–22].

On the bivariate analysis, we found a statistically significant association between HRFs or absent/disrupted subfoveal IZ at baseline and CME or MME at the final evaluation. Nevertheless, on the multivariate analysis, none of these variables were significant predictors of either CME or MME. In this regard, the emergence of HRFs has been linked to various factors such as lipid leakage, microglial activity, or movement of RPE cells [23]. In the study by Huang et al. involving 154 eyes in 77 RP patients, HRFs were positively correlated with poorer vision, central macular thinning, and EZ disruption (all $P < 0.001$) [24], leading the authors to conclude that the presence of HRFs could be an important prognostic indicator of RP progression. Similarly, another study by Kuroda et al. observed an increase in HRFs within the outer nuclear layer of advanced RP patients. This

increase was particularly evident in regions with EZ and ELM disruption, suggesting a potential migration of RPE cells following photoreceptor cell loss [25].

To better understand the likely course of the disease and its prognosis, it is important to evaluate the BCVA and to determine whether it is associated with any of the variables detected on SS-OCT. On the bivariate analysis, we found a significant association between poor BVCA at follow-up and the following baseline variables: CME ($W = 91$, $p < 0.001$), disrupted/absent MZ ($W = 45.5$, $p < 0.001$), EZ ($W = 45.5$, $p < 0.001$), and IZ ($W = 192.5$, $p = 0.008$). However, on the multivariate analysis, the only baseline variable that remained independently associated with a lower BCVA at follow-up was CME. This finding underscores the importance of understanding the pathogenesis of CME to identify the patients with a poor prognosis and to help predict the course of the disease.

Finally, we sought to identify the most useful biomarkers of disease progression. To do so, we evaluated changes in the width of two hyperreflective outer retinal layers (which makes them easier to measure), the EZ and IZ. Data from studies that have performed anatomical reconstruction show that the EZ corresponds to the outer portion of the photoreceptors where a large number of mitochondria are located, which gives it its high reflectivity, while the IZ appears to represent the interdigitation of the contact cylinders formed by the apical processes of the RPE cells (i.e., microvilli) that encase part of cone outer segments [26].

Several studies have evaluated retinal dystrophy progression by measuring EZ zone integrity [27, 28]. However, those studies did not assess changes in the width of the IZ. Nonetheless, other studies have demonstrated the value of the IZ as a prognostic marker after surgery in other retinal conditions such as retinal detachment [29], macular hole [30], and ERM [31].

In previous studies involving patients with RP, the location at which the EZ zone disappears is a structural biomarker for the edge of the functional visual field [32]. Oh et al. compared disease progression in eyes with RP between the different modes of inheritance, observing that the rate of decrease in EZ line width was fastest for XLRP and slowest for autosomal dominant and recessive RP such as USH [33]. Similarly, Takahashi et al. compared disease progression in patients with RP based on gene function, distinguishing between patients with and without mutations in ciliary genes [34]. In that study, patients with ciliary gene mutations had a greater loss of the EZ zone.

In our cohort, there was a statistically significant decrease in the width of the EZ and IZ from baseline to the final assessment (decrease of 668 and 278 μm , respectively). The estimated annual reduction in the mean width of the EZ and IZ was 243.6 and 79 μm , respectively. On the mixed linear

model, there was an association between the decrease in EZ and IZ width and worse BCVA, but this was only significant for IZ width ($p = 0.01$).

Our results suggest that IZ width may be the most reliable parameter to assess disease progression in this patient population. However, it is important to keep in mind that the IZ (unlike the EZ) is not always distinguishable from the underlying RPE layer, even in healthy subjects [26, 35], and it has shown high variability among healthy adults, which might be related to variability in the photoreceptor distribution in healthy subjects [36]. For this reason, we believe that the EZ provides more valuable information about the patients as a group, whereas a close evaluation of both the EZ and IZ (when distinguishable) could provide useful information for individual changes over time.

Strengths and limitations

The main limitation of this study is the sample size, which is mainly due to the rarity of this disease. In this regard, large multicenter studies are necessary to better characterize the correlation between EZ and IZ width and the rate of disease progression in different age groups. Furthermore, determination of the correlation between the EZ and IZ with visual fields requires a representation of their spatial distribution, which implies a need for more comprehensive studies that include OCT volume scans and microperimetry. By contrast, the main strength of our study is the homogeneity of the group in terms of age and gene basis. Moreover, since our patient cohort consisted of pediatric patients, our data help to better understand the pathophysiology of this disease in its early stages and the differences with nonsyndromic RP.

Conclusions

To our knowledge, this is the first longitudinal study to assess patients during the early years of *MYO7A*-IRD. Our findings suggest that regularly performing SS-OCT in these patients may be beneficial, as the data obtained through this imaging modality can be used to evaluate the photoreceptor outer segments and the interdigitation zone of the RPE, which are the first alterations that appear in the early phases of *MYO7A*-IRD. Our findings also underscore the potential value of routinely measuring the width of the IZ and EZ (particularly the IZ, when feasible) during follow-up in order to check for the presence of pathologic changes. This would allow clinicians to monitor treatment response and to determine, for example, whether the decrease in the width of the EZ or IZ slows after initiation of gene therapy.

Acknowledgements This article is part of a PhD thesis submitted to the University of Barcelona. We thank Bradley Londres for professional English language editing and Dr. Ana Méndez for her critical review of the manuscript.

Funding No funding was received for this research.

Declarations

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the Ethics Committee of Hospital de Sant Joan de Déu (C.I. PIC-181–19, CEIm Fundació Sant Joan de Déu) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

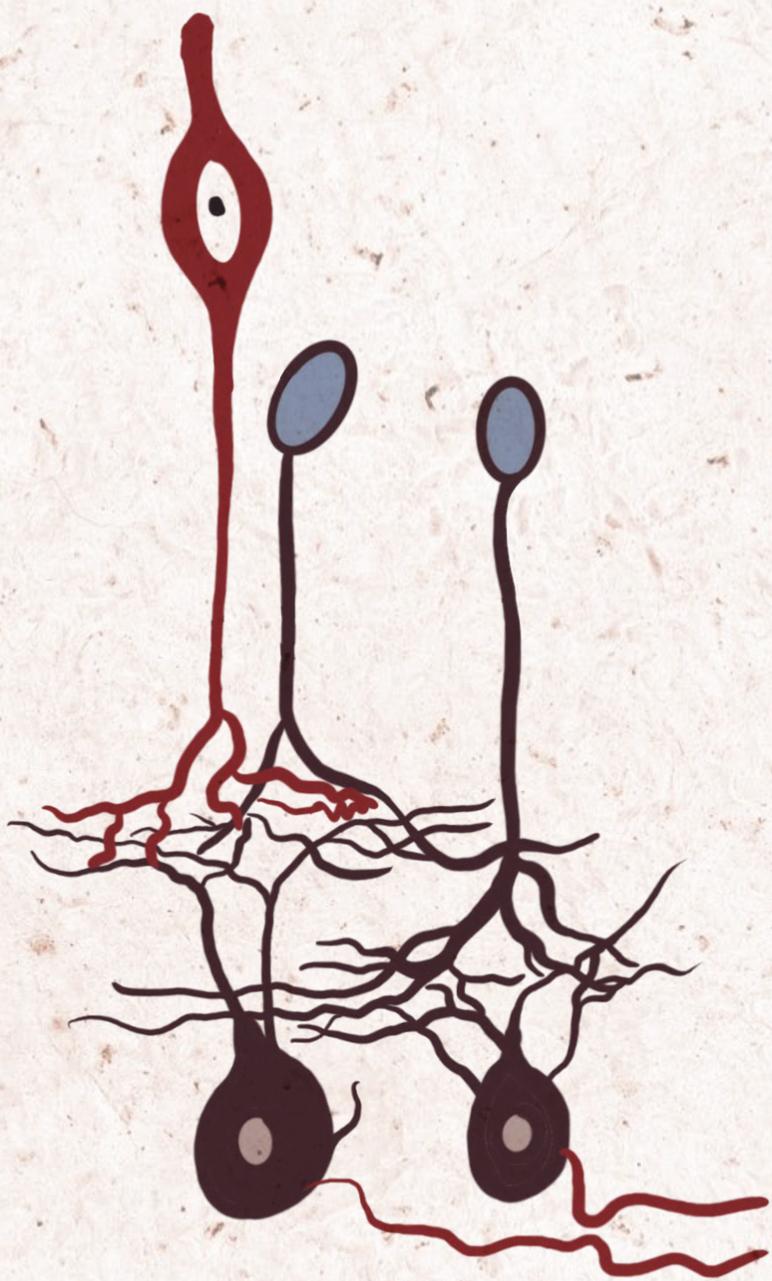
Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study or their legal guardians.

Conflict of interest All authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest or non-financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

References

- Milam AH, Li ZY, Fariss RN (1998) Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res* 17(2):175–205. [https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(97\)00012-8](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(97)00012-8)
- Yan D, Liu XZ (2010) Genetics and pathological mechanisms of Usher syndrome. *J Hum Genet* 55(6):327–335. <https://doi.org/10.1038/jhg.2010.29>
- Bonnet C, Riahi Z, Chantot-bastaraut S et al (2016) An innovative strategy for the molecular diagnosis of Usher syndrome identifies causal biallelic mutations in 93% of European patients. *Eur J Hum Genet* 24(12):1730–1738. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.99>
- Jacobson SG, Cideciyan AV, Aleman TS et al (2008) Usher syndromes due to MYO7A, PCDH15, USH2A or GPR98 mutations share retinal disease mechanism. *Hum Mol Genet* 17(15):2405–2415. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn140>
- Hasson T, Heintzelman MB, Santos-Sacchi J, Corey DP, Mooseker MS (1995) Expression in cochlea and retina of myosin VIIa, the gene product defective in usher syndrome type 1B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(21):9815–9819. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9815>
- Williams DS, Lopes VS (2011) The many different cellular functions of MYO7A in the retina. *Biochem Soc Trans* 39(5):1207–1210. <https://doi.org/10.1042/BST0391207>
- Gibbs D, Diemer T, Khanobdee K, Hu J, Bok D, Williams DS (2010) Function of MYO7A in the human RPE and the validity of shaker1 mice as a model for Usher syndrome 1B. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(2):1130–1135. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4032>
- Futter CE, Ramalho JS, Jaissle GB, Seeliger MW, Seabra MC (2004) The role of Rab27a in the regulation of melanosome distribution within retinal pigment epithelial cells. *Mol Biol Cell* 15(5):2264–2275. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-10-0772>
- Toms M, Pagarkar W, Moosajee M (2020) Usher syndrome: clinical features, molecular genetics and advancing therapeutics. *Ther Adv Ophthalmol* 12:1–19. <https://doi.org/10.1177/2515841420952194>
- Subirà O, Català-Mora J, Díaz-Cascajosa J et al (2020) Retinal findings in pediatric patients with Usher syndrome Type 1 due to mutations in MYO7A gene. *Eye (Lond)* 34(3):499–506. <https://doi.org/10.1038/s41433-019-0536-6>
- Sousa K, Fernandes T, Gentil R, Mendonça L, Falcão M (2019) Outer retinal layers as predictors of visual acuity in retinitis pigmentosa: a cross-sectional study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 257(2):265–271. <https://doi.org/10.1007/s00417-018-4185-4>
- Gelfand JM, Nolan R, Schwartz DM, Graves J, Green AJ (2012) Microcystic macular oedema in multiple sclerosis is associated with disease severity. *Brain* 135:1786–1793. <https://doi.org/10.1093/brain/aws098>
- Querques G, Coscas F, Forte R, Massamba N, Sterkers M, Souied EH (2011) Cystoid macular degeneration in taxotifen age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 152:100–107. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2011.01.027>
- Triolo G, Pierro L, Battaglia M et al (2013) Spectral domain optical coherence tomography findings in patients with retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Res* 50(3):160–164. <https://doi.org/10.1159/000351681>
- Abegg M, Zinkernagel M, Wolf S (2012) Microcystic macular degeneration from optic neuropathy. *Brain* 135:e225. <https://doi.org/10.1093/brain/aws215>
- Barboni P, Carelli V, Savini G, Carbonelli M, La Morgia C, Sadun A (2013) Microcystic macular degeneration from optic neuropathy: not inflammatory, not trans-synaptic degeneration. *Brain* 136(7):e329. <https://doi.org/10.1093/brain/awt014>
- Cohen SY, Dubois L, Nghiem-Buffer S (2010) Retinal pseudocysts in age-related geographic atrophy. *Am J Ophthalmol* 150:211–217. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2010.02.019>
- Gaudric A, Ducos de Lahitte G, Cohen SY, Massin P, Haouchine B (2006) Optical coherence tomography in group 2A idiopathic juxtafoveal retinal telangiectasis. *Arch Ophthalmol* 124:1410–1419
- Gualino V, Cohen SY, Delyfer MN, Sahel JA, Gaudric A (2005) Optical coherence tomography findings in taxotifen retinopathy. *Am J Ophthalmol* 140:757–758. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2005.04.042>
- Grigoropoulos VG, Emfietzoglou J, Nikolaidis P et al (2010) Optical coherence tomography findings in patients with retinitis pigmentosa and low visual acuity. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 41(1):35–39. <https://doi.org/10.3928/15428877-20091230-07>
- Hagiwara A, Yamamoto S, Ogata K et al (2019) Macular abnormalities in patients with retinitis pigmentosa: prevalence on OCT examination and outcomes of vitreoretinal surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 257(2):265–271. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2010.01866.x>
- Kim YJ, Joe SG, Lee DH, Lee JY, Kim JG, Yoon YH (2013) Correlations between spectral-domain OCT measurements and visual acuity in cystoid macular edema associated with retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54(2):1303–1309. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10149>
- Midena E, Torresin T, Velotta E, Pilotto E, Parozzani R, Frizziero L (2021) OCT hyperreflective retinal foci in diabetic retinopathy: a semi-automatic detection comparative study. *Front Immunol* 12:613051. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.613051>
- Huang CH, Yang CH, Lai YJ et al (2022) Hyperreflective foci as important prognostic indicators of progression of retinitis pigmentosa. *Retina* 42(2):388–395
- Kuroda M, Hirami Y, Hata M, Mandai M, Takahashi M, Kurimoto Y (2014) Intraretinal hyperreflective foci on spectral-domain optical coherence tomographic images of patients with retinitis pigmentosa. *Clin Ophthalmol* 8:435–440. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S58164>
- Starengi G, Sadda S, Chakravarthy U, Spaide RF, International Nomenclature for Optical Coherence Tomography (IN•OCT) Panel (2014) Proposed lexicon for anatomic landmarks in normal posterior segment spectral-domain optical coherence tomography:

- the IN•OCT consensus. *Ophthalmology* 121(8):1572–1578. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2014.02.023>
27. Menghini M, Lujan BJ, Zayit-Soudry S et al (2015) Correlation of outer nuclear layer thickness with cone density values in patients with retinitis pigmentosa and healthy subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56(1):372–381. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-15521>
 28. Spaide RF, Curcio CA (2011) Anatomical correlates to the bands seen in the outer retina by optical coherence tomography: literature review and model. *Retina* 31(8):1609–1619
 29. Gharbiya M, Grandinetti F, Scavella V et al (2012) Correlation between spectral-domain optical coherence tomography findings and visual outcome after primary rhegmatogenous retinal detachment repair. *Retina* 32(1):43–53
 30. Ooka E, Mitamura Y, Baba T, Kitahashi M, Oshitari T, Yamamoto S (2011) Foveal microstructure on spectral-domain optical coherence tomographic images and visual function after macular hole surgery. *Am J Ophthalmol* 152(2):283–290. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2011.02.001>
 31. Itoh Y, Inoue M, Rii T, Hirota K, Hirakata A (2013) Correlation between foveal cone outer segment tips line and visual recovery after epiretinal membrane surgery. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 54(12):7302–7308. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12702>
 32. Birch DG, Locke KG, Wen Y, Locke KI, Hoffman DR, Hood DC (2013) Spectral-domain optical coherence tomography measures of outer segment layer progression in patients with X-linked retinitis pigmentosa. *JAMA Ophthalmol* 131(9):1143–1150. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2013.4160>
 33. Oh JK, Nuzbrokh Y, Lima de Carvalho JR Jr, Ryu J, Tsang SH (2020) Optical coherence tomography in the evaluation of retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Genet* 41(5):413–419. <https://doi.org/10.1080/13816810.2020.1780619>
 34. Takahashi VKL, Xu CL, Takiuti JT et al (2019) Comparison of structural progression between ciliopathy and non-ciliopathy associated with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis* 14(1):187. <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1163-9>
 35. Lima LH, Sallum JM, Spaide RF (2013) Outer retina analysis by optical coherence tomography in cone-rod dystrophy patients. *Retina* 33(9):1877–1880
 36. Gu R, Deng G, Jiang Y, Jiang C, Xu G (2018) Area of the cone interdigitation zone in healthy Chinese adults and its correlation with macular volume. *BMC Ophthalmol* 18(1):188. <https://doi.org/10.1186/s12886-018-0862-7>
- Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.
- Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.



8

DISCUSIÓN

8. DISCUSIÓN

La aparición de la OCT ha supuesto un antes y un después en el diagnóstico oftalmológico, especialmente en cuanto a las patologías retinianas se refiere. Tal y como se ha expuesto anteriormente, la OCT es una técnica diagnóstica no invasiva que proporciona imágenes en profundidad de los tejidos como si de una muestra histológica se tratase, pero con la gran ventaja de ser una prueba no invasiva y de fácil ejecución.

Las imágenes de OCT proporcionan datos valiosos para comprender las alteraciones inducidas por USH y para caracterizar mejor las diversas etapas de esta enfermedad. Estudios previos han utilizado SD-OCT y SS-OCT en pacientes con USH o RP no sindrómica y han reportado cuáles son las alteraciones características de estas patologías a nivel retiniano en pacientes adultos, no obstante, no están descritos estos cambios en pacientes con USH de edad pediátrica, por lo que hasta ahora no se ha podido establecer con certeza cuáles son las primeras modificaciones retinianas producidas en esta enfermedad. (86)(87)(88)(89)(90)(91)(92)

Además, este trabajo se centra en un grupo homogéneo de pacientes, tanto por las características clínicas como genéticas, ya que todos los pacientes estudiados tienen menos de 20 años y todos ellos cuentan con un diagnóstico molecular confirmado de USH1 por mutaciones en el gen *MYO7A*. Gracias a esto, nos planteamos el objetivo principal de esta tesis: establecer en qué localización anatómica de la retina se producen los primeros daños secundarios a mutaciones del gen *MYO7A* en pacientes pediátricos diagnosticados de USH1.

Los resultados de esta investigación han permitido dar respuesta al objetivo principal así como a los secundarios, que son: describir las alteraciones retinianas detectadas mediante OCT en pacientes pediátricos con USH1 y comparar estos hallazgos con las descripciones publicadas previamente, correlacionar las alteraciones anatómicas detectadas con la agudeza visual de los pacientes, y determinar qué parámetros son los más útiles para predecir la progresión de la enfermedad.

8.1. ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES RETINIANAS DETECTADAS MEDIANTE SS-OCT

En la primera fase de nuestro estudio, se evaluaron las anomalías cualitativas de la retina, siendo la más común el daño de las capas externas del área macular, incluyendo la pérdida o disrupción de la membrana limitante externa (MLE; 84,4% de los ojos), la disrupción de la capa elipsoides (EZ; 28 ojos, 87,5%) y la pérdida de segmentos externos de los FR (OS; 29 ojos, 90,6%). El daño de los diferentes segmentos del EPR fue: 93,8% en la capa de fagosomas o de interdigitación y 90,6% en la capa de melanosomas y 0% en la capa de mitocondrias o complejo ERP-membrana de Bruch. Entre los resultados obtenidos, cabe destacar que la presencia de edema macular quístico (EMQ), en un 25% de los pacientes, se correlacionó significativamente con la presencia de alteraciones en los FR.

De manera plausible, estas alteraciones de las capas externas podrían ser responsables de los cambios en las capas internas de la retina, como el EMQ. En este sentido, si realizamos una revisión de la literatura publicada, Testa et al. evaluaron retrospectivamente 134 pacientes con USH, de estos, 42 fueron diagnosticados con USH1 (edad media: $34,4 \pm 17,0$ años) y 91 con USH2 (edad media: $36,2 \pm 13,0$ años). Las exploraciones con OCT revelaron la presencia de anomalías maculares en 126 de los 268 ojos (47,0%), siendo las anomalías más comunes las siguientes: presencia de membrana epirretiniana (MER; 51 ojos, 19,0%), EMQ (42 ojos, 15,7%), tracción vitreomacular (38 ojos, 14,2%) y agujero macular lamelar (7 ojos, 2,6%). En ese estudio, las anomalías maculares, particularmente el EMQ, fueron más comunes en pacientes con USH1 que en pacientes con USH2. Por otro lado, Sliesoraityte et al. (87) utilizaron imágenes SD-OCT para evaluar el EMQ en 76 pacientes con USH (edad media, 42 ± 14 años), encontrando lesiones maculares quísticas en el 37% de los ojos en general y en el 45 y 29%, respectivamente, de los pacientes con *MYO7A* (el gen más común en USH1) y *USH2A* (el gen más común en USH2). Aunque los autores encontraron algunas diferencias entre los grupos *MYO7A* y *USH2A*, éstas no fueron estadísticamente significativas. (87)

Walia et al realizó un examen con OCT a 38 pacientes diagnosticados de USH2 (edad media: 38 años), detectando la presencia de EMQ en 13 casos (34,2%). (88) En la misma línea, Tsilou et al. evaluaron a 81 pacientes diagnosticados con USH1 (n = 32; edad media: 33 años) o USH2 (n = 34; edad media: 42 años), encontrando que las lesiones foveales quísticas eran más comunes en el grupo USH1. (89)

Además de estos estudios en pacientes diagnosticados de USH, se han realizado numerosos estudios para evaluar las anomalías maculares en la RP no sindrómica, revelando una amplia variabilidad en la prevalencia de anomalías maculares. Grigoropoulos et al. evaluaron 42 ojos (21 pacientes) con RP, encontrando que el EMQ y la MER se presentaron, respectivamente, en el 19% (n = 8) y el 64,3% (n = 27) de los ojos. (93) Sin embargo, otros autores han encontrado una prevalencia mucho menor de anomalías maculares en pacientes con RP: Hagiwara et al. utilizaron OCT para estudiar 622 ojos de 323 pacientes con RP, detectando EMQ en 34 ojos (5.5%) y MER en solo 4 ojos. (91) Entre estos dos extremos, un estudio de cohorte realizado por Triolo et al., en el que utilizaron SD-OCT para examinar 176 ojos de 90 pacientes con RP, encontró que las alteraciones retinianas más comunes fueron el engrosamiento de MLI (118 ojos; 67%) y la MER (48 ojos; 27,3%). En ese estudio, se detectaron EMQ y micropseudoquistes (MPC) en solo el 12,5% y el 18,2% de los ojos, respectivamente. (92)

El presente estudio es, hasta donde sabemos, el primero en utilizar SS-OCT para evaluar la presencia de anomalías retinianas en una cohorte de pacientes pediátricos diagnosticados con USH1. Es importante destacar que se detectaron anomalías maculares quísticas (15 ojos con MPC y 8 ojos con EMQ) en más de dos tercios (71,9%) de los ojos, un porcentaje significativamente mayor que el reportado en otras series. Por el contrario, ninguno de nuestros pacientes presentó MER, a pesar de que esta alteración fue el cambio más frecuente observado en otras series. Estos hallazgos podrían apoyar la hipótesis de que **la MER es más común en pacientes con USH2 o RP no sindrómica que en pacientes con USH1, mientras que la presencia de EMQ se asociaría más estrechamente a los pacientes con diagnóstico de USH1.**

Estas conclusiones indican que el USH2 y la RP no sindrómica parecen presentar patrones de daño estructural similares, mientras que los pacientes con USH1 tienden a presentar una gama más amplia de anomalías maculares. Sin embargo, se necesitan estudios más amplios para determinar si estas modificaciones están relacionadas con la edad o se deben a condiciones genéticamente determinadas (es decir, subtipo de USH); en este sentido, nuestra cohorte de pacientes era más joven que otros estudios publicados y, según la evidencia disponible, el EMQ parece estar estrechamente relacionado con una edad más temprana, mientras que la MER es más común en pacientes de edades más avanzadas. (86)(87)(88) (89)(90)(91)(92) (figura 19)

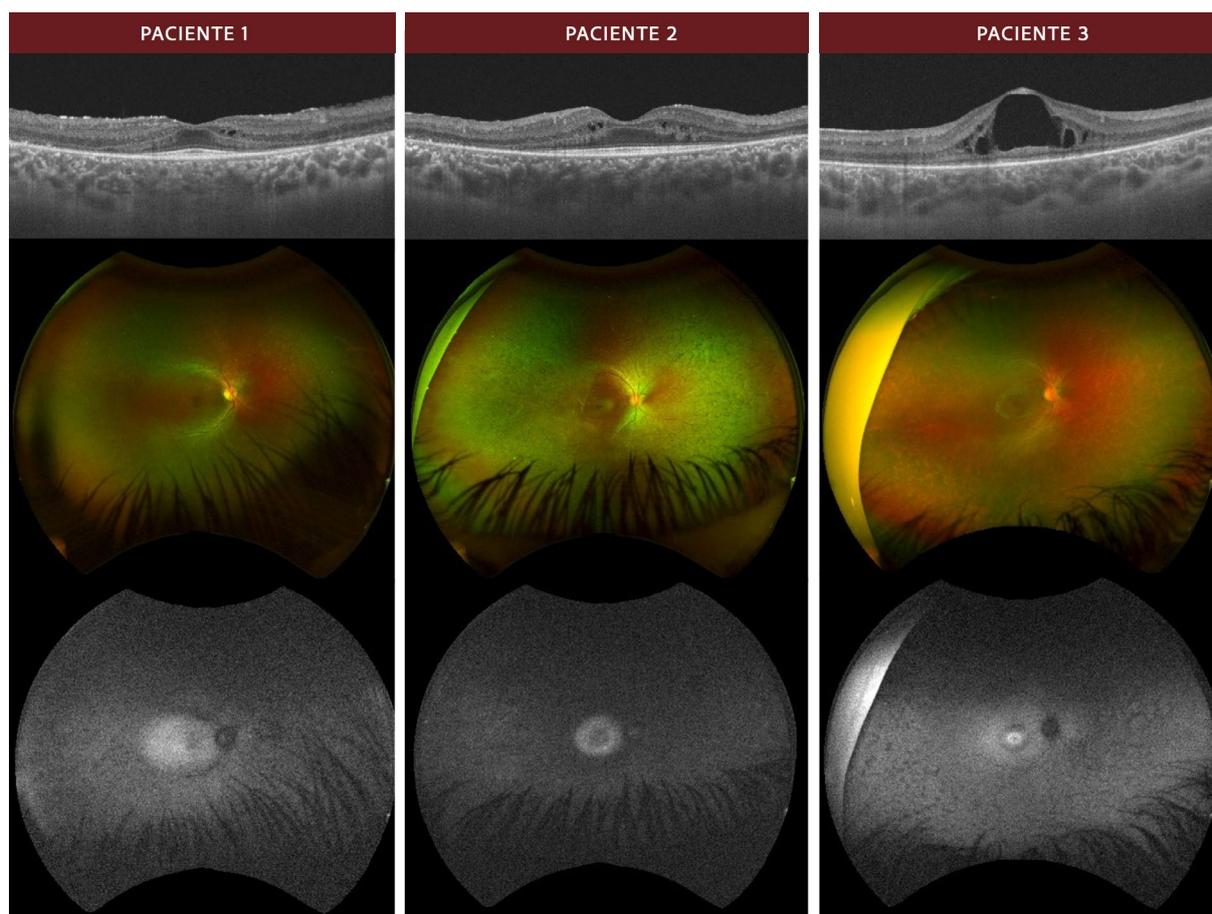


Figura 19. OCT, retinografía de campo amplio y autofluorescencia del ojo derecho de tres pacientes afectados de USH1 por *MYO7A*. Observamos distintos grados de edema macular quístico (EMQ) y micropseudoquistes (MPCs) en las OCTs (imágenes superiores), que no se correlacionan con el grado de atrofia retiniana observada en las retinografías (imágenes centrales) ni en las imágenes de autofluorescencia (imágenes inferiores). (imágenes propias)

La causa principal de las alteraciones quísticas maculares no está clara. Kim et al. evaluaron un total de 266 ojos, 133 de los cuales eran de pacientes con RP (edad media: $47,5 \pm 18,1$ años), encontrando que las anomalías de la interfaz vitreomacular estaban presentes en el 42,7% de los ojos con RP (los autores no evaluaron la MLI). En este estudio, las anomalías de la interfaz vitreomacular fueron significativamente más comunes en los ojos con EMQ que en aquellos sin EMQ (64.2% versus 36.8%; $P < 0,001$); por el contrario, la capa elipsoides (EZ) o IS/OS se conservó mejor en pacientes sin EMQ, no obstante, los investigadores no evaluaron la correlación con otras capas externas de la retina. (94) Por otro lado, Triolo et al (92) observaron un engrosamiento de la MLI en el 67% de los ojos con RP y la presencia de MER en el 27,3%. Las conclusiones de este estudio apuntan a que los daños la capa IS/OS en la región foveal parecen no estar asociados a la presencia de EMQ, contrariamente al informe de Kim et al. que encontraron que el EMQ estaba fuertemente correlacionado con la disrupción en IS/OS. (94)

Otro hallazgo novedoso de nuestra investigación es la presencia de alteraciones de la MLI, en forma de puntos hiperreflectivos u ondulaciones, que no se han descrito previamente en pacientes con USH. Con respecto a esta constatación, cabe destacar que las anomalías de la MLI estaban presentes en casi una cuarta parte de los ojos de nuestra muestra. (figura 20)

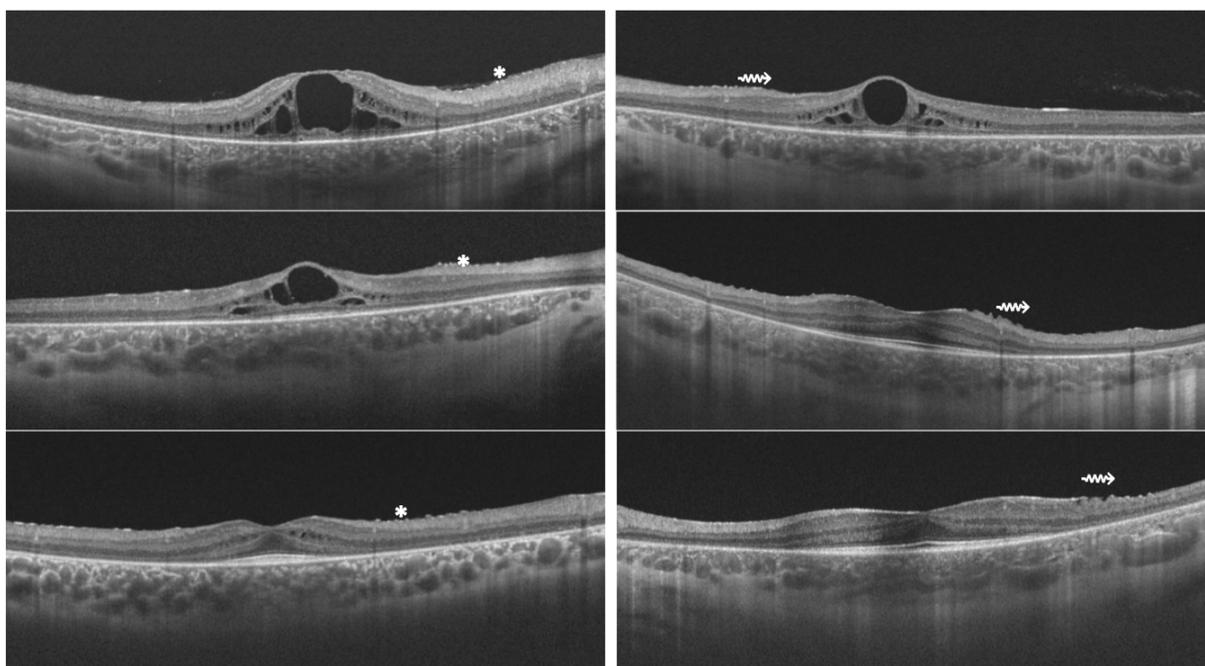


Figura 20. Alteraciones en la MLI en imágenes de OCT macular de distintos pacientes con USH1 por *MYO7A*. Observamos puntos hiperrefringentes en las imágenes de la izquierda (*) y ondulaciones de la MLI en las imágenes de la derecha (~w~). (imágenes propias)

Tal y como hemos comentado anteriormente, la alteración macular más frecuente en nuestra cohorte de pacientes fue el daño de las capas externas, que consistía en la disrupción o ausencia de IS/OS en más del 90% de los ojos, la ausencia de MLE en más del 80% y la disrupción de OS/EPR en más de dos tercios de los pacientes. El EMQ se correlacionó significativamente con alteraciones en la unión OS/EPR, pero no con anomalías de la MLI o alteraciones en la unión IS/OS. Sorprendentemente, aunque tanto Triolo et al. (92) como Kim et al. (94) analizaron la unión IS/OS, ninguno evaluó la unión OS/EPR.

Los resultados de nuestro estudio sugieren que el USH1 secundario a mutaciones en *MYO7A* puede afectar inicialmente a las capas externas de la retina, particularmente a los fotorreceptores, y que las alteraciones en estas capas promueven el desarrollo de EMQ, independientemente de las anomalías específicas presentes en la interfaz vitreomacular. Nuestra hipótesis es que la degeneración de los fotorreceptores podría inducir una respuesta inflamatoria

inespecífica, pero los mecanismos que conducen a la muerte celular de los fotorreceptores aún no están claros. Estudios previos sugirieron que la pérdida de células fotorreceptoras en la RP es impulsada por la apoptosis, (95) pero informes más recientes indican que otras vías de muerte celular, como la activación de cisteína-proteasas, proteasas lisosomales, autofagia y lisis mediada por complemento, podrían estar involucradas. (96)

En otro orden de cosas, destacamos que cerca del 30% de nuestra cohorte de pacientes mostraron evidencia de opacidades vítreas. (figura 21) Algunos autores han realizado evaluaciones oculares con biomicroscopía en pacientes con RP encontrando que las alteraciones vítreas, incluidas las condensaciones similares a bolas de algodón, la degeneración fibrilar, las partículas vítreas pigmentarias o no pigmentarias y el desprendimiento vítreo posterior, son comunes en estos pacientes. (97) El mecanismo exacto de estas anomalías no está claro, sin embargo, algunos autores apuntan que el humor vítreo en los ojos con RP difiere del de los ojos sanos debido a la ruptura de la barrera hematorretiniana que se observa en los pacientes con RP. (97)(98)(99)

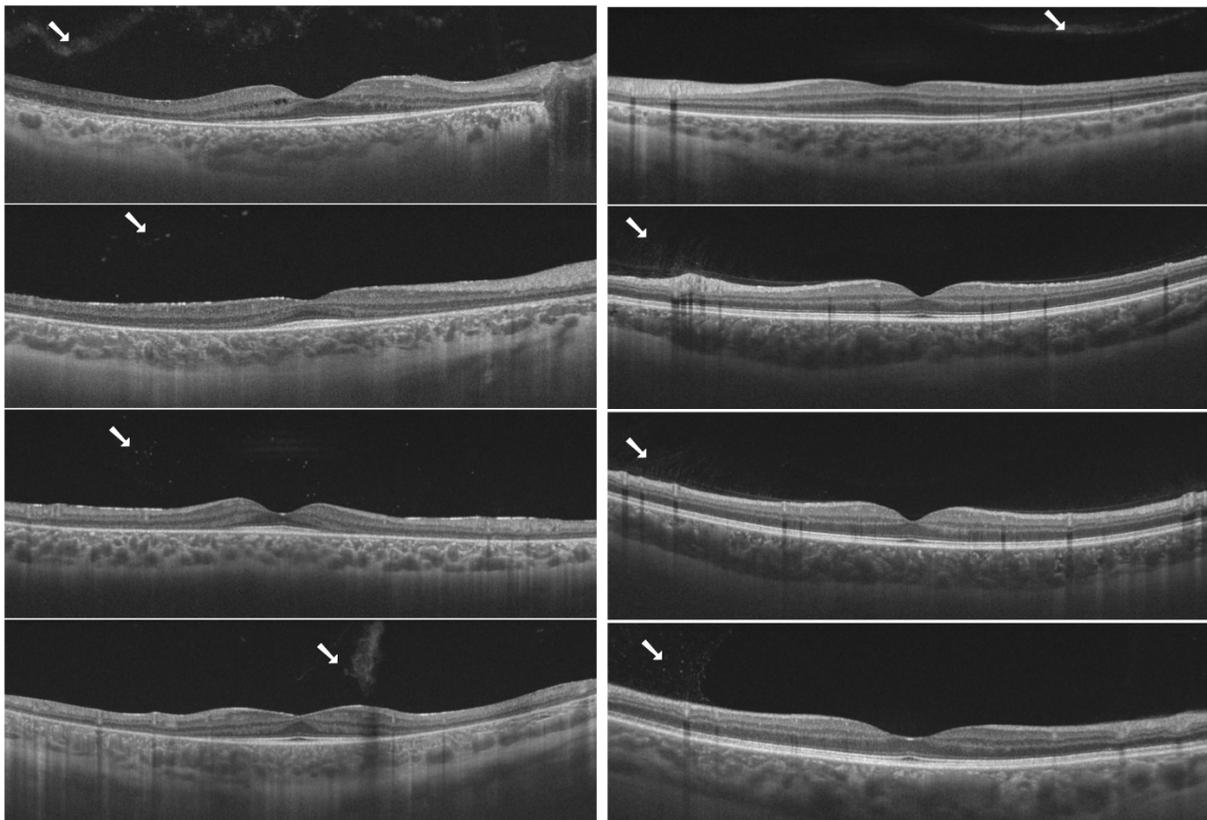


Figura 21. OCTs maculares de pacientes con USH1 por *MYO7A* en las que observamos diferentes grados de opacidades vítreas. (imágenes propias)

8.2. CORRELACIÓN DE LAS ALTERACIONES ANATÓMICAS DETECTADAS CON LA AGUDEZA VISUAL

La función visual en pacientes con RP y qué anomalías encontradas mediante OCT influyen en su deterioro ha sido ampliamente estudiado en pacientes con RP, dada a su repercusión en el día a día de los pacientes. Diversos estudios han analizado las correlaciones de la MAVC y las alteraciones tomográficas mediante estudios univariados. Concretamente, Sandberg et al. Informaron de que tanto el adelgazamiento (debido a la pérdida de células) como el engrosamiento de la retina (debido al presunto edema) parecen estar asociados con una menor AV en pacientes con RP típica. (100) En esta misma línea de investigación, pero de forma más precisa, Matsuo et al. encontraron que la identificación de un mayor número de capas retinianas externas se correlacionaba con una mayor MAVC. (101) Otros autores han centrado su atención en el análisis de la unión IS/OS, encontrando una correlación estadísticamente significativa entre la longitud de IS/OS y la MAVC, (102) (103), así como una correlación positiva entre la longitud de IS/OS y una mejor sensibilidad al contraste. (104) No obstante, no existe una unanimidad que confirme esta asociación, ya que otros autores han informado de una reducción del grosor de OS/RPE en pacientes con RP y una correlación positiva entre esta medición y la MAVC, sin encontrar asociación entre la MAVC y la longitud de IS/OS. (105)

En nuestro primer estudio transversal, aunque encontramos una asociación positiva entre IS/OS en el estudio univariado, **al realizar el análisis multivariado, las únicas variables que se asociaron de forma independientemente con una disminución de MAVC fueron las alteraciones en la MLE y en las capas mioides, elipsoides y OS de los fotorreceptores.** Estas conclusiones están en consonancia con los informes de Battaglia et al. (106), quienes confirmaron un correlación independiente entre la MAVC y la afectación de la MLE.

Posteriormente, al profundizar en este análisis en el estudio longitudinal, observamos una asociación significativa entre un mayor descenso de la MAVC en el seguimiento y la afectación de las siguientes variables basales: presencia de EMQ ($W=91$, $p<0,001$), ausencia o disrupción de la capa mioide ($W=45,5$, $p<0,001$), ausencia o disrupción de la capa elipsoide ($W=45,5$, $p<0,001$) y ausencia o disrupción de la capa de interdigitación ($W=192,5$, $p=0,008$). Sin embargo, **en el análisis multivariante, la única variable basal que permaneció asociada**

de forma independiente con una MAVC más baja en el seguimiento fue la presencia de EMQ al inicio del estudio. Este hallazgo subraya la importancia de comprender la patogénesis del EMQ para identificar a los pacientes con mal pronóstico y ayudar a predecir el curso de la enfermedad.

8.3. LOCALIZACIÓN DE *MYO7A* EN LA RETINA Y TEORÍA FISIOPATOLÓGICA

La pregunta más relevante que nos hizo plantear este estudio y que constituye el objetivo principal del mismo es: ¿Es la retinopatía *MYO7A* asociada a USH1 una enfermedad causada por un daño primario en los FR o en el EPR?

Existe cierta controversia sobre la ubicación exacta de *MYO7A* en la retina. Algunos autores como Jacobson et al. (76) han señalado a los FR como la primera localización detectable de la enfermedad *MYO7A* en individuos jóvenes o en etapas tempranas de esta patología, sin embargo, los investigadores solo estudiaron 3 pacientes pediátricos con esta mutación. Por el contrario, Hasson et al. (77) y Williams et al. (78) han postulado que la mayor parte de *MYO7A* en la retina está presente en el EPR, y una pequeña cantidad estaría asociada con la membrana ciliar y periciliar de las células fotorreceptoras. Los estudios con ratones *MYO7A*-nulos han demostrado que *MYO7A* se localiza en la región apical de los melanosomas del EPR y estaría involucrado en la eliminación de fagosomas del EPR apical para su entrega a los lisosomas en el EPR basal. Mientras que en los FR, la opsina se acumula anormalmente en la zona de transición del cilio, lo que sugiere que *MYO7A* funcionaría como una barrera selectiva para las proteínas de membrana en el extremo distal de la zona de transición de los FR, desempeñando así un papel importante en el mantenimiento de la estructura periciliar. (78)

Nuestros hallazgos sugieren que el evento primario de la retinopatía *MYO7A* es el daño en el punto de conexión entre las microvellosidades del EPR (representadas por cambios en la IZ) y el segmento externo de los fotorreceptores (representado por cambios en la EZ). Esta hipótesis sobre la importancia de la IZ como posible localización primaria de esta patología puede explicarse por los siguientes hechos: la anchura de la IZ es siempre menor que la anchura de la EZ, y la IZ es la banda más afectada de las capas externas al inicio y al final del seguimiento (55,8% y 80,8% de los ojos, respectivamente). Por otro lado, solo el 17,3% (9/52) de los ojos de este estudio desarrollaron lesiones complejas de EPR/Bruch en el área macular durante el seguimiento, y no observamos ningún caso de lesiones complejas de EPR/Bruch en el área subfoveal durante todo el período de seguimiento. **Este hallazgo sugiere que la progresión de *MYO7A*-IRD comienza con la afectación de los segmentos externos de los fotorreceptores y la IZ del EPR, y luego progresa centrífugamente para involucrar a las capas cercanas (es decir, las zonas elipsoide y mioide).** (figura 22)

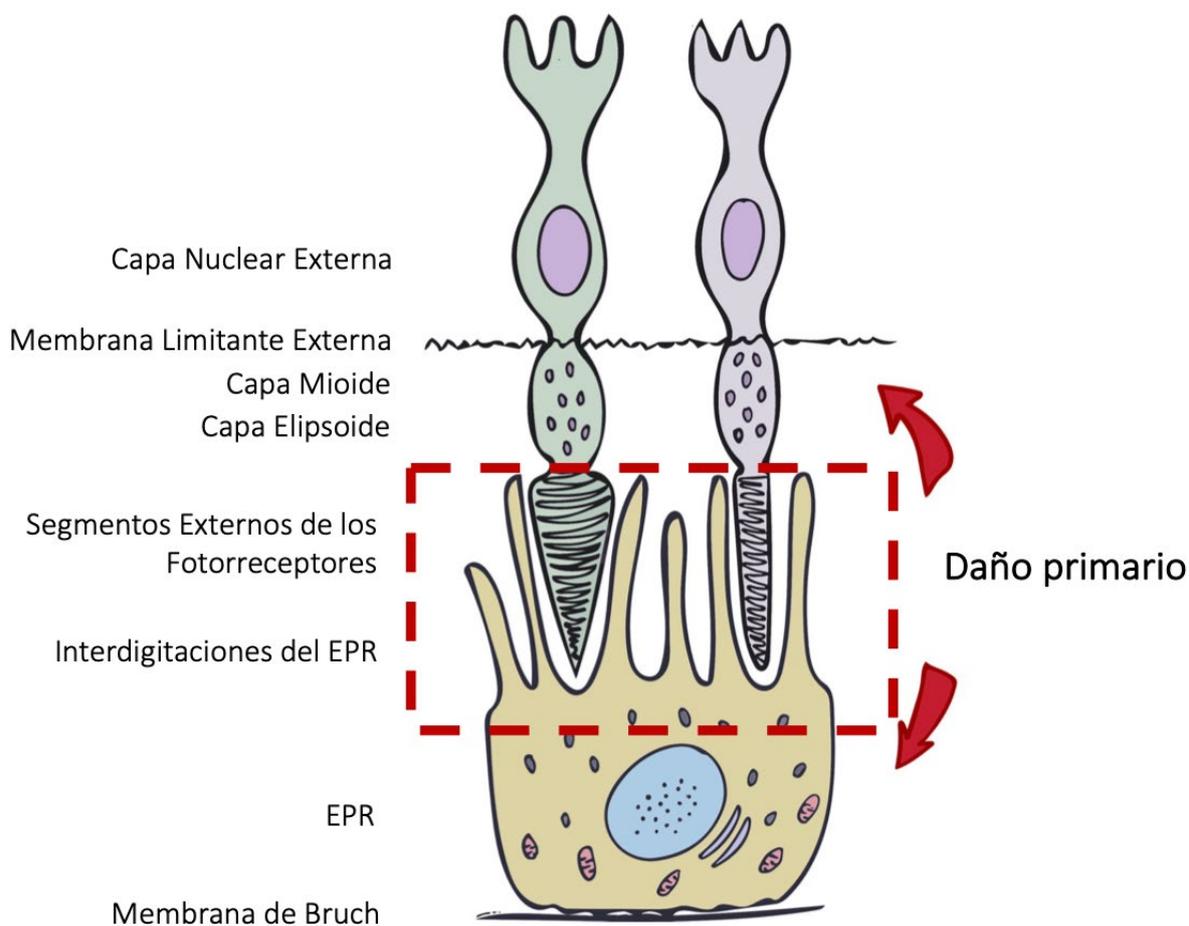


Figura 22. Ilustración esquemática de las diferentes capas de la retina donde se refleja la hipótesis del daño inicial en los OS de fotorreceptores y su progresión centrífuga en la retinopatía por *MYO7A*. (imagen propia)

Esta hipótesis sobre la progresión centrífuga se ve respaldada por el hecho de que los pacientes sin afectación macular de la capa nuclear externa, MLE o mioide tenían una mediana de edad más baja que los pacientes con afectación macular ($p < 0,001$), lo que indica que la afectación de esas capas no aparece hasta que la enfermedad progresa con el tiempo, es decir, a medida que el paciente envejece. Del mismo modo, también encontramos afectación de la capa plexiforme externa en pacientes de edad más avanzada en la evaluación final de seguimiento. Estos hallazgos son consistentes con los hallazgos del estudio de Sousa et al. que evaluaron 48 ojos con RP y encontraron que la EZ (79,2%), IZ (70,8%) y ELM (45,8%) fueron las tres capas más comúnmente ausentes en estos pacientes, no obstante, los autores no evaluaron la capa de OS de los FR. (107)

En conclusión, podemos decir que es probable que **la base fisiopatológica de la etapa temprana de USH1 secundario a mutaciones de MYO7A sea el resultado de la afectación de las células fotorreceptoras y su unión con las microvellosidades del EPR.**

En consecuencia, se debe considerar la monitorización de la condición de los fotorreceptores durante el seguimiento, ya que esto podría permitir la detección temprana de los cambios patológicos. De hecho, el estado de los fotorreceptores y las capa más interna del EPR (IZ) podrían ser parámetros importantes a monitorizar para asegurar un seguimiento adecuado de los pacientes con USH.

8.4. INDICADORES DE PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD

A través del estudio longitudinal, se buscó identificar los biomarcadores más útiles de la progresión de la enfermedad. Para ello, evaluamos los cambios en la medición de dos capas externas de la retina que son hiperreflectantes (lo que facilita su medición): la longitud de EZ e IZ. Los datos de los estudios con reconstrucción anatómica muestran que la EZ corresponde a la porción externa de los fotorreceptores donde se encuentra un gran número de mitocondrias, lo que le confiere su alta reflectividad, mientras que la IZ parece representar la interdigitación de los cilindros de contacto formados por las apófisis apicales de las células del EPR que recubren parte de los segmentos externos de los conos. (82) Varios estudios han evaluado la progresión de la distrofia retiniana midiendo la integridad de la zona EZ, (108)(109) sin embargo, esos estudios no evaluaron los cambios en el ancho de la IZ. Si bien **no existen datos sobre los cambios de IZ en la literatura actual, sí que encontramos estudios que han demostrado el valor de esta capa de la retina como marcador pronóstico después de la cirugía en otras afecciones retinianas como el desprendimiento de retina, (110) el agujero macular(111) y la MER (112), por lo que su valor en enfermedades retinianas degenerativas como la RP se plantea como uno de los objetivos de nuestra investigación.**

Respecto al valor de EZ como marcador de progresión de la RP, en estudios previos realizados, el lugar en el que desaparece la zona EZ es un biomarcador estructural para el borde del campo visual funcional. (113) Oh et al. compararon la progresión de la enfermedad en los ojos con la RP entre los diferentes modos de herencia, observando que la tasa de disminución en el ancho de la línea EZ fue más rápida para la RP ligada al cromosoma X (XLRP) y más lenta para RP autosómica dominante y recesiva como USH. Del mismo modo, Takahashi et al. (114) compararon la progresión de la enfermedad en pacientes con RP en función de la mutación génica, distinguiendo entre pacientes con y sin mutaciones en los genes ciliares. En ese estudio, los pacientes con mutaciones en genes ciliares tuvieron una mayor pérdida de la zona EZ.

En nuestro estudio, observamos una disminución estadísticamente significativa en el ancho de la EZ y la IZ desde el inicio hasta la evaluación final, que disminuyó, respectivamente, en 668 y 278 μm . La reducción anual estimada en el ancho medio de la EZ y la IZ fue de 243,6 y 79 μm , respectivamente. En el modelo lineal mixto, hubo una asociación entre la disminución de la EZ y la anchura de la IZ y

el empeoramiento de la MAVC, pero solo fue significativa para la anchura de la IZ ($p = 0,01$).

Nuestros resultados sugieren que la amplitud de la IZ puede ser el parámetro más fiable para evaluar la progresión de la enfermedad. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la IZ (a diferencia de la EZ) no siempre se distingue de la capa subyacente del EPR, incluso en sujetos sanos. (82) Por esta razón, creemos que la **EZ proporciona información más valiosa sobre los pacientes como grupo, mientras que una evaluación conjunta de la EZ y la IZ (cuando se distinguen) podría proporcionar información más útil para los cambios individuales a lo largo del tiempo.**

Tabla 7. Disminución de la capa elipsoides (EZ) y la capa de interdigitación (IZ) a lo largo del seguimiento como medidas de progression de la enfermedad.

Variable	Disminución media (intervalo de confianza: 97.5%)	p-value
Longitud de EZ (μm)	668 (402-935)	$p < 0.001$
Longitud de IZ (μm)	278 (102-454)	$p < 0.001$

8.5. LIMITACIONES

A pesar de que el presente trabajo representa el estudio con un mayor número de casos de pacientes con retinopatía por mutaciones *MYO7A* en población pediátrica publicados hasta la fecha, la principal limitación de este estudio es el tamaño de la muestra, que se debe principalmente a la rareza de esta enfermedad. En este sentido, son necesarios grandes estudios multicéntricos para caracterizar mejor la correlación entre la EZ y la amplitud de la IZ y la tasa de progresión de la enfermedad en diferentes grupos de edad.

Además, la determinación de la correlación entre la EZ y la IZ con los campos visuales requiere una representación de su distribución espacial, lo que implica la necesidad de estudios más exhaustivos que incluyan exploraciones volumétricas con OCT y microperimetría.

Por otro lado, el tiempo de seguimiento, aunque es largo en comparación con otros estudios publicados, es limitado, por lo que creemos que sería interesante diseñar nuevos estudios con un mayor tiempo de seguimiento para poder extraer conclusiones sobre la evolución de estos pacientes, ya en la edad adulta.

8.6. FORTALEZAS

La principal fortaleza de este estudio es la homogeneidad del grupo en términos de edad y base genética. Además, gracias a que todos los pacientes han sido diagnosticados y seguidos en un hospital pediátrico de referencia, la cohorte estaba formada por pacientes pediátricos, con una edad media mucho menor que en los estudios hasta ahora publicados. Este hecho es importante porque nuestros datos ayudan a comprender mejor la fisiopatología de esta enfermedad en sus estadios iniciales y las diferencias con la RP no sindrómica.

Por otro lado, se trata de una cohorte seguida de forma prospectiva lo que permite una recogida de datos muy fidedigna. Además, no hubo pérdidas de seguimiento y los pacientes fueron seguidos durante un periodo de tiempo largo, lo que nos ha permitido poder documentar la evolución de la enfermedad a través de cambios tomográficos, a priori sutiles.

8.7. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

8.7.1. Relación de los hallazgos de OCT con nuevas pruebas diagnósticas: micropertimetría y angiografía-OCT

Una de las futuras vías de investigación que nos plantea esta tesis doctoral es correlacionar los resultados de nuestro estudio, los cuales nos muestran con detalle la estructura de la mácula en las primeras fases del USH1-*MYO7A* medida por tomografía de coherencia óptica, y la función, medida por micropertimetría. Creemos que esta línea de investigación será muy interesante, ya que nos permitirá valorar cambios funcionales en etapas tempranas de la enfermedad, en las que la agudeza visual todavía es relativamente buena.

La micropertimetría es una prueba funcional que consiste en realizar pruebas del campo visual mientras que simultáneamente, se estudia el punto de la retina que se está estimulando. Por este motivo, se trata de un método especialmente útil para evaluar los campos visuales muy afectados en pacientes con mala fijación por patología retiniana con compromiso macular, como son las fases más avanzadas de la RP. Como se demuestra en nuestro estudio, en las etapas iniciales del USH1, podemos encontrar alteraciones anatómicas con AV relativamente buenas, no obstante, la calidad de vida de estos pacientes puede estar ya comprometida debido a los defectos campimétricos. El objetivo de esta futura investigación sería realizar una correlación estructura-función de la sensibilidad retiniana (medida mediante micropertimetría) y los índices de progresión estructurales detectados mediante SS-OCT en esta tesis doctoral: la longitud de la elipsoides y de la IZ.

Por otro lado, creemos que sería interesante abordar la relación entre la hemodinámica ocular y los cambios estructurales detectados en nuestro estudio. Para ello, hemos tomado imágenes de 6x6mm de angiografía-OCT (AOCT) en todas las visitas de seguimiento de nuestra cohorte de pacientes, así como en individuos sanos de edad pediátrica que representarían el grupo control. Estudios anteriores han confirmado que existe una reducción del flujo sanguíneo en pacientes con RP, (115) no obstante, quedan muchas preguntas por responder sobre el papel de la disfunción vascular en la degeneración de los fotorreceptores. El objetivo de este futuro estudio sería comparar los cambios en la vascularización retiniana en el área macular de los pacientes USH1-*MYO7A* de edad pediátrica con individuos sanos de la misma edad. Esto nos permitiría, en un primer lugar, comprender mejor la etiopatogenia de esta enfermedad y, en un segundo lugar,

detectar nuevos biomarcadores de especial interés para el seguimiento y la evaluación de posibles tratamientos dirigidos en un futuro próximo.

8.7.2. Correlaciones genotipo-fenotipo

Tal y como se ha comentado anteriormente, el gen *MYO7A* codifica la miosina VIIa, una proteína motora basada en actina que comprende varios dominios funcionales y que se expresa en el oído interno y en la retina. En esta tesis doctoral se han descrito las alteraciones retinianas de una cohorte de pacientes pediátricos con USH diagnosticados genéticamente con mutaciones en *MYO7A*. A partir de aquí, una vez esbozado el perfil fenotípico de estos pacientes, creemos que sería de utilidad realizar un estudio transversal retrospectivo en el que podamos realizar las correlaciones con el genotipo. Esto permitiría una evaluación más precisa en futuros ensayos clínicos, ya que permitiría establecer si la aparición, la gravedad y la progresión de la enfermedad visual están o no determinadas por el tipo de mutación en *MYO7A* o su ubicación.

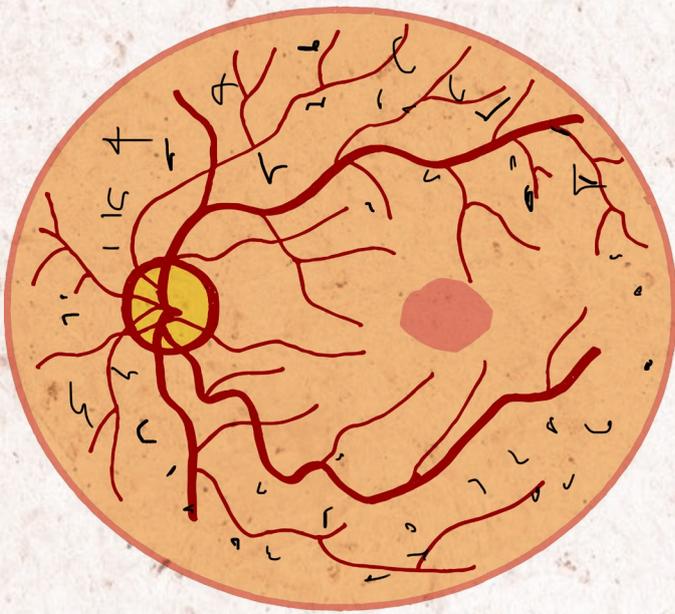
8.7.3. Utilidad de los resultados del estudio en la evaluación de futuros tratamientos

En los últimos años, se han producido grandes avances sobre estrategias terapéuticas basadas en genes para enfermedades hereditarias como la amaurosis congénita de Leber, producida por defectos en el gen *RPE65*. Estas estrategias terapéuticas se ven favorecidas por el hecho de que la retina es un tejido muy accesible, además de por su privilegiado sistema inmune y las propias barreras internas del ojo que limitan la difusión sistémica de los vectores virales que puedan ser utilizados en este tipo de tratamientos.

En el caso del síndrome de Usher la terapia de reemplazo de genes subretiniana ya ha demostrado ser efectiva en varios modelos de ratón Usher. (116) Los vectores del virus adeno-asociado (AAV) se han utilizado en ratones *knockout MYO7A* mediante la inyección subretiniana para restaurar la expresión del gen Usher que era defectuoso. Por otro lado, también se han probado los vectores AAV superpuestos duales para la administración de *MYO7A* como una alternativa más segura para genes grandes, aunque parecen ser menos eficientes. (116)(117) (118)(119) Más recientemente, se han iniciado los ensayos clínicos de fase I/II de terapia génica conocida como UshStat®. El objetivo de este tratamiento es permitir el transporte de copias no mutadas del gen *MYO7A* a células de la retina afectadas

de pacientes con USH1B, mediante el uso de la tecnología *Oxford's LentiVector*[®], que permite el transporte de grandes genes como el *MYO7A*.

Los resultados de nuestro estudio nos permiten conocer mejor el curso natural de esta enfermedad y sus características en los pacientes más jóvenes, que son los que potencialmente más se pueden beneficiar de las estrategias terapéuticas basadas en reemplazamiento genético. De manera que, nuestros datos podrán ser útiles para la evaluación de la eficacia de este tipo de tratamientos en futuros ensayos clínicos.



9

CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

1. La base fisiopatológica de la etapa temprana del síndrome de Usher tipo 1 secundario a mutaciones del gen *MYO7A* es el resultado del daño en los fotorreceptores y su punto de unión con las microvellosidades del epitelio pigmentario de la retina.
2. La afectación de los fotorreceptores promueve el desarrollo de edema macular quístico, independientemente de las anomalías específicas presentes en la interfaz vitreomacular. La presencia de membrana epirretiniana es más común en pacientes con síndrome de Usher tipo 2 o retinosis pigmentaria no sindrómica que en pacientes con síndrome de Usher tipo 1, mientras que la presencia de edema macular quístico se asocia más estrechamente a los pacientes con diagnóstico de síndrome de Usher tipo 1.
3. La presencia de edema macular quístico se asocia de forma independiente a una peor agudeza visual corregida, por lo que el hallazgo de edema macular es útil para identificar a los pacientes con mal pronóstico y ayudar a predecir el curso de la enfermedad.
4. La capa de interdigitación es el parámetro más fiable para evaluar la progresión de la enfermedad. Sin embargo, esta capa (a diferencia de la capa elipsoides) no siempre se distingue de la capa subyacente del epitelio pigmentario de la retina, incluso en sujetos sanos. La evaluación conjunta del descenso en la longitud de la capa elipsoides y de la de interdigitación (cuando se distingue) es de utilidad para evaluar los cambios individuales a lo largo del tiempo, mientras que la medición aislada de la amplitud de la elipsoides proporciona información más valiosa sobre los pacientes como grupo.

10

BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Ruiz A, Borrego S, Marcos I, Antiñolo G. Capítulo I: Anatomía y fisiología de la retina. En: Valverde Pérez D. La retinosis pigmentaria en España: estudio clínico y genético. 1ª edición. Madrid: ONCE; 2001. 8-27. 2001. p. 1-190.
2. Ramón y Cajal S. La retina de los vertebrados. Editores: Cuenca N, de la Villa P. Vol. 5, 1ª edición, Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 2021.
3. Weisz PB, Keogh RN. La ciencia de la biología. Barcelona: Omega; 1987.
4. Vecino E, Rodríguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res.* 2016;51:1-40.
5. Junqueira LC, Carneiro J. Histología básica. 3ª edición. Barcelona: Ed.Salva; 1987.
6. Del Priore LV, Kaplan HJ, Hornbeck R, Jones Z, Swinn M. Retinal pigment epithelial debridement as a model for the pathogenesis and treatment of macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 1996;122(5):629-43.
7. Nicoletti A, Wong DJ, Kawase K, Gibson LH, Yang-Feng TL, Richards JE, et al. Molecular characterization of the human gene encoding an abundant 61 kDa protein specific to the retinal pigment epithelium. *Hum Mol Genet.* 1995;4(4):641-9.
8. Bridges CD. Vitamin A and the role of the pigment epithelium during bleaching and regeneration of rhodopsin in the frog eye. *Exp Eye Res.* 1976;22(5):435-55.
9. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 2005;85(3):845-81.
10. Steinberg RH, Linsenmeier RA, Griff ER. Three light-evoked responses of the retinal pigment epithelium. *Vision Res.* 1983;23(11):1315-23.
11. Baylor D. How photons start vision. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(2):560-5.
12. D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, LaVail MM, et al. Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum Mol Genet.* 2000;9(4):645-51.
13. Gu SM, Thompson DA, Srikumari CR, Lorenz B, Finckh U, Nicoletti A, et al. Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet.* 1997;17(2):194-7.
14. Marlhens F, Bareil C, Griffoin JM, Zrenner E, Amalric P, Eliaou C, et al. Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet.* 1997;17(2):139-41.

15. Maw MA, Kennedy B, Knight A, Bridges R, Roth KE, Mani EJ, et al. Mutation of the gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet.* 1997;17(2):198-200.
16. Wässle H, Boycott BB. Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev.* 1991;71(2):447-80.
17. Osterberg G. Topography of the Layer of Rods and Cones in the Human Retina. Copenhagen: Levin & Munksgaard; 1935.
18. Guyton A, Hall JE, Hall ME. Tratado de Fisiología Médica. 14ª edición, Madrid: Elsevier; 2021.
19. Rawn JD. Bioquímica Interamericana. Madrid: McGraw-Hil; 1989.
20. Sterling P, Cohen E, Freed MA, Smith RG. Microcircuitry of the on-beta ganglion cell in daylight, twilight, and starlight. *Neurosci Res.* 1987;6(Suppl. 6):S269-85.
21. Dryja TP, Li T. Molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet.* 1995;4:1739-43.
22. Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP. Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science.* 1994;264(5165):1604-8.
23. Yokota T, Shiojiri T, Gotoda T, Arai H. Retinitis pigmentosa and ataxia caused by a mutation in the gene for the alpha-tocopherol-transfer protein. *N Engl J Med.* 1996;335(23):1770-7.
24. Boycott BB, Hopkins JM, Sperling HG. Cone connections of the horizontal cells of the rhesus monkey's retina. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1987;229(1257):345-79.
25. Nelson R, Kolb H. Synaptic patterns and response properties of bipolar and ganglion cells in the cat retina. *Vision Res.* 1983;23(10):1183-95.
26. Famiglietti EV, Kolb H. Structural basis for ON-and OFF-center responses in retinal ganglion cells. *Science.* 1976;194(4261):193-5.
27. Schiller PH. The ON and OFF channels of the visual system. *Trends Neurosci.* 1992;15(3):86-92.
28. Price MT, Romano C, Fix AS, Tizzano JP, Olney JW. Blockade of the second messenger functions of the glutamate metabotropic receptor is associated with degenerative changes in the retina and brain of immature rodents. *Neuropharmacology.* 1995;34(8):1069-79.
29. Scherer SW, Duvoisin RM, Kuhn R, Heng HH, Belloni E, Tsui LC. Localization of two metabotropic glutamate receptor genes, GRM3 and GRM8, to human chromosome 7q. *Genomics.* 1996;31(2):230-3.
30. Stell WK. The structure and relationships of horizontal cells and photoreceptor-bipolar synaptic complexes in goldfish retina. *Am J Anat.* 1967;121(2):401-23.

31. Boycott BB, Peichl L, Wässle H. Morphological types of horizontal cell in the retina of the domestic cat. *Proc R Soc London B Biol Sci.* 1978;203(1152):229-45.
32. Masland RH. The Neuronal Organization of the Retina. *Neuron.* 2012;76(2):266-80.
33. Demb JB, Singer JH. Functional Circuitry of the Retina. *Annu Rev Vis Sci.* 2015; 1:263-289.
34. Grünert U, Wässle H. GABA-like immunoreactivity in the macaque monkey retina: A light and electron microscopic study. *J Comp Neurol.* 1990;297(4):509-24.
35. Kim US, Mahroo OA, Mollon JD, Yu-Wai-Man P. Retinal Ganglion Cells—Diversity of Cell Types and Clinical Relevance. *Front Neurol.* 2021;12:1-20.
36. Wolfe JM, Friedman-Hill SR, Bilsky AB. Parallel processing of park-whole information in visual search tasks. *Percept Psychophys.* 1994;55(5):537-50.
37. Yamada ES, Bordt AS, Marshak DW. Wide-field ganglion cells in macaque retinas. *Vis Neurosci.* 2005;22(4):383-393.
38. Müller H. Zur Histologie der Netzhaut: Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie. 1851; 3: 234-237.
39. Newman E, Reichenbach A. The Muller cell: A functional element of the retina. *Trends Neurosci.* 1996;19(8):307–12.
40. Kettenmann H. Beyond the neuronal circuitry. *Trends Neurosci.* 1996;19(8):305-6.
41. Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica para las Distrofias Hereditarias de Retina. Guía de Práctica Clínica para las Distrofias Hereditarias de Retina. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Servicio de Evaluación del Servicio Canario de la Salud; 2017. Guías de Práctica Clínica en el SNS.
42. Donders FC. Beiträge zur pathologischen Anatomie des Auges. *Arch für Ophthalmologie.* 1855;2(1):106-18.
43. Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. Perspective on Genes and Mutations Causing Retinitis Pigmentosa Stephen. *Arch Ophthalmol.* 2007;125(2):151-8.
44. Verbakel SK, van Huet RAC, Boon CJF, den Hollander AI, Collin RWJ, Klaver CCW, et al. Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res.* 2018;66:157-86.
45. Karali M, Testa F, Brunetti-Pierri R, Di Iorio V, Pizzo M, Melillo P, et al. Clinical and genetic analysis of a european cohort with pericentral retinitis pigmentosa. *Int J Mol Sci.* 2020;21(1):86.
46. Rath A, Nguengang S. Prevalencia de las enfermedades raras : Datos bibliográficos Enfermedades listadas por orden de prevalencia o incidencia decreciente o por número de casos publicados. *Inf Periódicos Orphanet.* 2021;1-69.

47. España FR. PREVARET: Estudio Epidemiológico Sobre La Prevalencia De Las Enfermedades Distróficas De La Retina. 2012.
48. Babizhayev MA, Deyev AI, Derevyagin VI. Morphometric evaluation of human lens opacification. *J Microsc.* 1989;154(2):115-27.
49. Szamier RB, Berson EL. Retinal Histopathology of a Carrier of X-chromosome-linked Retinitis Pigmentosa. *Ophthalmology.* 1985;90(2):271-8.
50. Marmor MF, Aguirre G, Arden G, Berson E, Birch DG, Boughman JA, et al. Retinitis Pigmentosa: A Symposium on Terminology and Methods of Examination. *Ophthalmology.* 1983;90(2):126-31.
51. Weller JM, Michelson G, Juenemann AG. Unilateral retinitis pigmentosa: 30 Years follow-up. *BMJ Case Rep.* 2014;10:1-8.
52. Carr RE, Irwin M. Unilateral Retinitis Pigmentosa. *Arch Ophthalmol.* 1973;90(1):21-26.
53. Hamel C. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis.* 2006;1(1):1-12.
54. Boughman JA, Vernon M, Shaver KA. Usher syndrome: definition and estimate of prevalence from two high-risk populations. *J Chronic Dis.* 1983;36(8):595-603.
55. Saihan Z, Webster AR, Luxon L, Bitner-Glindzicz M. Update on Usher syndrome. *Curr Opin Neurol.* 2009;22(1):19-27.
56. Millán JM, Aller E, Jaijo T, Blanco-Kelly F, Gimenez-Pardo A, Ayuso C. An Update on the Genetics of Usher Syndrome. *J Ophthalmol.* 2011:1-8.
57. Espinós C, Millán JM, Beneyto M, Nájera C. Epidemiology of Usher Syndrome in Valencia and Spain. *Community Genet.* 1998;1(4):223-8.
58. Von Graefe A. Exceptionnelles Verhalten des Gesichtsfeldes bei. Pigment entartung der Netzhaut. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1858;4(2):250-3.
59. Usher C.H. On the inheritance of Retinitis pigmentosa with notes of cases. *R. Lond. Ophthalmol. Hosp. Rep.* 1914;19:130-236.
60. Bell J. Retinitis pigmentosa and allied diseases of the eye. London: Cambridge University Press; 1922.
61. Ahuja S. Pioneers for the Basic Understanding of Usher syndrome. *Nova Scien.* 2011:421-8.
62. Davenport SLH, Omenn GS. The heterogeneity of Usher syndrome. Montreal: Fifth International Conference on Birth Defects; 1977.
63. Smith RJH, Berlin CI, Hejtmancik JF, Keats BJ, Kimberling WJ, Lewis RA, et al. Clinical diagnosis of the Usher syndromes. *Am J Med Genet.* 1994;50(1):32-8.
64. Weil D, Blanchard S, Kaplan J, Guilford P, Gibson F, Walsh J, et al. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type IB. *Nature.* 1995; 374(6517):60-1.

65. Pakarinen L, Tuppurainen K, Laippala P, Mäntyjärvi M, Puhakka H. The ophthalmological course of Usher syndrome type III. *Int Ophthalmol*. 1995;19(5):307-11.
66. Gerber S, Bonneau D, Gilbert B, Munnich A, Dufier JL, Rozet JM, et al. USH1A: Chronicle of a slow death. *Am J Hum Genet*. 2006;78(2):357-9.
67. Kremer H, van Wijk E, Märker T, Wolfrum U, Roepman R. Usher syndrome: Molecular links of pathogenesis, proteins and pathways. *Hum Mol Genet*. 2006;15:262-70.
68. Castiglione A, Möller C. Usher Syndrome. *Audiol Res*. 2022;12(1):42-65.
69. Ebermann I, Phillips JB, Liebau MC, Koenekoop RK, Schermer B, Lopez I, et al. PDZD7 is a modifier of retinal disease and a contributor to digenic Usher syndrome. *J Clin Invest*. 2010;120(6):1812-23.
70. Whatley M, Francis A, Ng ZY, Khoh XE, Atlas MD, Dilley RJ, et al. Usher Syndrome: Genetics and Molecular Links of Hearing Loss and Directions for Therapy. *Front Genet*. 2020;11.
71. Kimberling WJ, Möller CG, Davenport S, Priluck IA, Beighton PH, Greenberg J, et al. Linkage of usher syndrome type I gene (USH1B) to the long arm of chromosome 11. *Genomics*. 1992;14(4):988-94.
72. Liu XZ, Walsh Z, Tamagawa Y, Kitamura K, Nishizawa N, Steel KP, et al. Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. *Nat Genet*. 1997;17(3):268-9.
73. Liu XZ, Walsh J, Mburu P, Kendrick-Jones J, Cope MJ, Steel KP, et al. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet*. 1997;16(2):188-90.
74. Kelley PM, Weston MD, Chen ZY, Orten DJ, Hasson T, Overbeck LD, et al. The genomic structure of the gene defective in Usher syndrome type Ib (MYO7A). *Genomics*. 1997;40(1):73-9.
75. Hasson T. Molecular motors: Sensing a function for myosin-VIIa. *Curr Biol*. 1999;9(22):838-41.
76. Jacobson SG, Cideciyan AV, Aleman TS, Sumaroka A, Roman AJ, Gardner LM, et al. Usher syndromes due to MYO7A, PCDH15, USH2A or GPR98 mutations share retinal disease mechanism. *Hum Mol Genet*. 2008;17(15):2405-15.
77. Hasson T, Heintzelman MB, Santos-Sacchi J, Corey DP, Mooseker MS. Expression in cochlea and retina of myosin VIIa, the gene product defective in usher syndrome type 1B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(21):9815-9.
78. Williams DS, Lopes VS. The many different cellular functions of MYO7A in the retina. *Biochem Soc Trans*. 2011;39(5):1207-10.
79. Sandberg MA, Weigel-difranco C, Rosner B, Berson EL. The relationship between visual field size and electroretinogram amplitude in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(8):1693-8.

80. Berson EL. Retinitis pigmentosa and allied diseases: applications of electroretinographic testing. *Int Ophthalmol*. 1981;4(1-2):7-22.
81. Cuenca N, Ortuño-Lizarán I, Pinilla I. Cellular Characterization of OCT and Outer Retinal Bands Using Specific Immunohistochemistry Markers and Clinical Implications. *Ophthalmology* . 2018;125(3):407-22.
82. Staurenghi G, Sadda S, Chakravarthy U, Spaide RF. Proposed lexicon for anatomic landmarks in normal posterior segment spectral-domain optical coherence tomography: The IN•OCT consensus. *Ophthalmology*. 2014;121(8):1572-8.
83. García G. Usher syndrome : molecular analysis of the USH2 genes and development of a next-generation sequencing platform. Universidad de Valencia; 2013.
84. Cremers FPM, Kimberling WJ, Külm M, De Brouwer AP, Van Wijk E, Te Brinke H, et al. Development of a genotyping microarray for Usher syndrome. *J Med Genet*. 2007;44(2):153-60.
85. Neveling K, Collin RWJ, Gilissen C, Van Huet RAC, Visser L, Kwint MP, et al. Next-generation genetic testing for retinitis pigmentosa. *Hum Mutat*. 2012;33(6):963-72.
86. Testa F, Melillo P, Rossi S, Marcelli V, Benedictis D, Colucci R, et al. Prevalence of macular abnormalities assessed by optical coherence tomography in patients with Usher syndrome. *Ophthalmic Genet*. 2018;39(1):17-21.
87. Sliesoraityte I, Peto T, Mohand-said S, Sahel JA. Novel grading system for quantification of cystic macular lesions in Usher syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2015;10:1-8.
88. Walia S, Fishman GA, Hajali M. Prevalence of cystic macular lesions in patients with Usher II syndrome. *Eye*. 2008;23(5):1206-9.
89. Tsilou ET, Rubin BI, Caruso RC, Reed GF, Pikus A, Hejtmancik JF, et al. Usher syndrome clinical types I and II : Could ocular symptoms and signs differentiate between the two types?. *Acta Ophthalmol Scand*. 2002;80(2):196-201.
90. Grigoropoulos VG, Emfietzoglou J, Nikolaidis P, Chatzistefanou K, Vergados J, Theodossiadis GP, et al. Optical coherence tomography findings in patients with retinitis pigmentosa and low visual acuity. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2010;41(1):35-9.
91. Hagiwara A, Yamamoto S, Ogata K, Sugawara T, Hiramatsu A, Shibata M, et al. Macular abnormalities in patients with retinitis pigmentosa: prevalence on OCT examination and outcomes of vitreoretinal surgery. *Acta Ophthalmol*. 2011;89(2):122-5.
92. Triolo G, Pierro L, Parodi MB, De Benedetto U, Gagliardi M, Manitto MP, et al. Spectral domain optical coherence tomography findings in patients with retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Res*. 2013;50(3):160-4.

93. Grigoropoulos VG, Emfietzoglou J, Nikolaidis P, Chatzistefanou K, Vergados J, Theodossiadis GP, et al. Optical coherence tomography findings in patients with retinitis pigmentosa and low visual acuity. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2010;41(1):35-9.
94. Kim YJ, Joe SG, Lee DH, Lee JY, Kim JG, Yoon YH. Correlations between Spectral-Domain OCT Measurements and Visual Acuity in Cystoid Macular Edema Associated with Retinitis Pigmentosa. 2013;54(2):1303-9.
95. Chang G-Q, Hao Y, Wong F. Apoptosis: Final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and mutant mice. *Neuron*. 1993;11(4):595-605.
96. Lohr HR, Kuntchithapautham K, Sharma AK, Rohrer B. Multiple, parallel cellular suicide mechanisms participate in photoreceptor cell death. *Exp Eye Res*. 2006;83(2):380-9.
97. Vingolo EM, Giusti C, Forte R, Onori P. Vitreal alterations in retinitis pigmentosa: biomicroscopic appearance and statistical evaluation. *Ophthalmologica*. 1996;210(2):104-7.
98. Ikeda Y, Hisatomi T, Murakami Y, Miyazaki M, Kohno RI, Takahashi H, et al. Retinitis pigmentosa associated with asteroid hyalosis. *Retina*. 2010;30(8):1278-81.
99. Travassos A, Fishman G, Cunha-Vaz JG. Vitreous fluorophotometry studies in retinitis pigmentosa. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1985;222(4-5):237-40.
100. Sandberg MA, Brockhurst RJ, Gaudio AR, Berson EL. The association between visual acuity and central retinal thickness in retinitis pigmentosa. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(9):3349-54.
101. Matsuo T, Morimoto N. Visual acuity and perimacular retinal layers detected by optical coherence tomography in patients with retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol*. 2007;91(7):888-90.
102. Mitamura Y, Aizawa S, Baba T, Hagiwara A, Yamamoto S. Correlation between retinal sensitivity and photoreceptor inner/outer segment junction in patients with retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol*. 2009;93(1):126-7.
103. Aizawa S, Mitamura Y, Baba T, Hagiwara A, Ogata K, Yamamoto S. Correlation between visual function and photoreceptor inner/outer segment junction in patients with retinitis pigmentosa. *Eye*. 2009;23(2):304-8.
104. Yioti GG, Kalogeropoulos CD, Aspiotis MB, Stefaniotou MI. Contrast sensitivity and color vision in eyes with retinitis pigmentosa and good visual acuity: correlations with SD-OCT findings. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2012;43(6):S44-53.
105. Witkin AJ, Ko TH, Fujimoto JG, Chan A, Drexler W, Schuman JS, et al. Ultra-high resolution optical coherence tomography assessment of photoreceptors in retinitis pigmentosa and related diseases. *Am J Ophthalmol*. 2006;142(6):945-52.

106. Battaglia Parodi M, La Spina C, Triolo G, Ricciari F, Pierro L, Gagliardi M, et al. Correlation of SD-OCT findings and visual function in patients with retinitis pigmentosa. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2016;254(7):1275-9.
107. Sousa K, Fernandes T, Gentil R, Mendonça L, Falcão M. Outer retinal layers as predictors of visual acuity in retinitis pigmentosa: a cross-sectional study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2019;257(2):265-71.
108. Menghini M, Lujan BJ, Zayit-Soudry S, Syed R, Porco TC, Bayabo K, et al. Correlation of outer nuclear layer thickness with cone density values in patients with retinitis pigmentosa and healthy subjects. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2014;56(1):372-81.
109. Spaide RF, Curcio CA. Anatomical correlates to the bands seen in the outer retina by optical coherence tomography: literature review and model. *Retina*. 2011;31(8):1609-19.
110. Gharbiya M, Grandinetti F, Scavella V, Cecere M, Esposito M, Segnalini A, et al. Correlation between spectral-domain optical coherence tomography findings and visual outcome after primary rhegmatogenous retinal detachment repair. *Retina*. 2012;32(1):43-53.
111. Ooka E, Mitamura Y, Baba T, Kitahashi M, Oshitari T, Yamamoto S. Foveal microstructure on spectral-domain optical coherence tomographic images and visual function after macular hole surgery. *Am J Ophthalmol*. 2011;152(2):283-290.
112. Itoh Y, Inoue M, Rii T, Hirota K, Hirakata A. Correlation between foveal cone outer segment tips line and visual recovery after epiretinal membrane surgery. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(12):7302-8.
113. Birch DG, Locke KG, Wen Y, Locke KI, Hoffman DR, Hood DC. Spectral-domain optical coherence tomography measures of outer segment layer progression in patients with X-linked retinitis pigmentosa. *JAMA Ophthalmol*. 2013;131(9):1143-50.
114. Takahashi VKL, Xu CL, Takiuti JT, Apatoff MBL, Duong JK, Mahajan VB, et al. Comparison of structural progression between ciliopathy and non-ciliopathy associated with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis*. 2019;14(1):187.
115. Parodi MB, Cicinelli MV, Rabiolo A, Pierro L, Gagliardi M, Bolognesi G, et al. Vessel density analysis in patients with retinitis pigmentosa by means of optical coherence tomography angiography. *Br J Ophthalmol*. 2017;101(4):428-32.
116. Lopes VS, Boye SE, Louie CM, Boye S, Dyka F, Chiodo V, et al. Retinal gene therapy with a large MYO7A cDNA using adeno-associated virus. *Gene Ther*. 2013;20(8):824-33.
117. Hashimoto T, Gibbs D, Lillo C, Azarian SM, Legacki E, Zhang XM, et al. Lentiviral gene replacement therapy of retinas in a mouse model for Usher syndrome type 1B. *Gene Ther*. 2007;14(7):584-94.

- 118.** Trapani I, Colella P, Sommella A, Iodice C, Cesi G, de Simone S, et al. Effective delivery of large genes to the retina by dual AAV vectors. *EMBO Mol Med.* 2014;6(2):194-211.
- 119.** Colella P, Trapani I, Cesi G, Sommella A, Manfredi A, Puppo A, et al. Efficient gene delivery to the cone-enriched pig retina by dual AAV vectors. *Gene Ther.* 2014;21(4):450-6.

