



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

High-throughput strategies for molecular diagnosis of nonsyndromic inherited retinal dystrophies

TESIS DOCTORAL

Ana Rodríguez Muñoz

Dirigida por:

Dr. José María Millán Salvador

Dra. Gema García García

Enero 2020

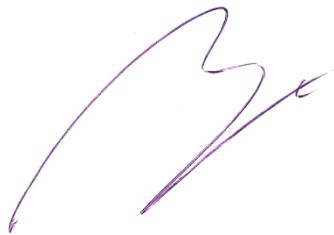
El Dr. José M^a Millán Salvador, Investigador Principal del grupo de Biomedicina Molecular, Celular y Genómica perteneciente al Instituto de Investigación Sanitaria La Fe.

La Dra. Gema García García, Investigadora Postdoctoral del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras y miembro del grupo de Biomedicina Molecular, Celular y Genómica perteneciente al Instituto de Investigación Sanitaria La Fe.

HACEN CONSTAR QUE:

El trabajo de tesis doctoral titulado *High-throughput strategies for molecular diagnosis of nonsyndromic inherited retinal dystrophies* que presenta Ana Rodríguez Muñoz, Licenciada en Farmacia, para optar al título de Doctora por la Universitat Politècnica de València, ha sido realizado en el grupo de Biomedicina Molecular, Celular y Genómica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe bajo su dirección y que reúne las condiciones para ser defendida por su autora.

Para que conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado en Valencia, a 15 de Enero de 2020.



Fdo. Dr. José M^a Millán Salvador



Fdo. Dra. Gema García García

A Julio,
A mi familia,
A mis Hermanos.

ÍNDICE

ABSTRACT	XIII
RESUMEN	XV
RESUM	XVII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIX
ÍNDICE DE TABLAS	XXIII
ABREVIATURAS	XXV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. LA VISIÓN.....	3
1.1. Anatomía del ojo humano.....	3
1.2. Estructura y función de la retina.....	4
1.3. Los fotorreceptores.....	6
1.4. Fototransducción	8
1.5. Ciclo visual	9
2. DISTROFIAS HEREDITARIAS DE LA RETINA.....	11
2.1. Clasificación de las DHR	11
2.2. DHR sindrómicas.....	19
2.3. Heterogeneidad clínica y genética	20
3. DIAGNÓSTICO ELECTROFISIOLÓGICO DE LAS DHR.....	24
3.1. Potencial evocado visual	24
3.2. Electroretinograma	25
3.3. Electrooculograma.....	26
4. DIAGNÓSTICO OFTALMOLÓGICO DE LAS DHR	28
5. DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE LAS DHR.....	31
5.1. Estudio funcional de las mutaciones que afectan al <i>splicing</i>	33
6. APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS DE LAS DHR.....	38
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	43
1. HIPÓTESIS	45
2. OBJETIVOS	46
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
1. SUJETOS DEL ESTUDIO	49
2. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN	51
3. DISEÑO DEL PANEL DE GENES.....	52
4. PREPARACIÓN DE LA LIBRERÍA	54
5. SECUENCIACIÓN.....	56

6.	ANÁLISIS DE DATOS	58
7.	INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS.....	59
8.	SECUENCIACIÓN SANGER.....	60
8.1.	Análisis de variantes intrónicas profundas no incluidas en el panel	61
9.	ANÁLISIS DE VARIANTES DE NÚMERO DE COPIAS.....	62
10.	ESTUDIOS FUNCIONALES MEDIANTE MINIGENES	63
10.1.	Diseño de los minigenes.....	63
10.2.	Amplificación y purificación del fragmento genómico	63
10.3.	Doble digestión y purificación	64
10.4.	Ligación.....	64
10.5.	Transformación.....	65
10.6.	Selección de colonias	65
10.7.	Transfección en células HEK293	66
10.8.	Extracción del ARN, RT-PCR y amplificación del transcrito	66
10.9.	Interpretación de los ensayos con minigenes	67
IV.	RESULTADOS	69
1.	Validación del panel de genes.....	71
2.	Variantes genéticas.....	72
3.	Reclasificación de pacientes	75
4.	Correlación fenotipo-genotipo.....	77
4.1.	Variabilidad fenotípica intra e interfamiliar	77
4.2.	Pacientes con mutaciones en <i>RPGR</i>	79
4.3.	Pacientes con mutaciones en <i>ABCA4</i>	83
5.	Pacientes con diagnóstico genético incompleto.....	86
6.	Pacientes con mutaciones concomitantes	88
6.1.	Familia fRPN-NB	88
6.2.	Familia fRPN-142	92
6.3.	Familia fRPN-51	94
6.4.	Familia fRPN-219	96
6.5.	Familia RPN-194	98
6.6.	Familia fRPN-169	99
7.	Estudios funcionales mediante minigenes	101
7.1.	<i>ABCA4</i> : c.2972G>T, p.(Gly991Val).....	103
7.2.	<i>ABCA4</i> : c.6148G>C, p.(Val2050Leu).....	103
7.3.	<i>BEST1</i> : c.637_639del, p.(Glu213del).....	104
7.4.	<i>CACNA2D4</i> : c.2153-12_2155del, p.?	105

7.5.	<i>CNNM4</i> : c.2039C>T, p.(Ala680Val)	106
7.6.	<i>FSCN2</i> : c.1105G>A, p.(Gly369Ser)	106
7.7.	<i>IDH3B</i> : c.532A>G, p.(Ser178Gly)	107
7.8.	<i>MAK</i> : c.755A>G, p.(Asn252Ser)	108
7.9.	<i>MERTK</i> : c.1450G>A, p.(Gly484Ser)	108
7.10.	<i>PRPF31</i> : c.182C>G, p.(Ala61Gly)	109
7.11.	<i>RHO</i> : c.316G>A, p.(Gly106Arg).....	110
7.12.	<i>RIMS1</i> : c.2544+4A>G, p.?	111
7.13.	<i>RPGRIP1</i> : c.930+3A>G, p.?	111
8.	Pacientes no resueltos	113
V.	DISCUSIÓN	115
1.	Ratio diagnóstico y variantes genéticas.....	116
2.	Reclasificación de pacientes	118
3.	Correlación fenotipo-genotipo.....	119
3.1.	Sobreexpresión de <i>ROM1</i>	119
3.2.	Variabilidad fenotípica intrafamiliar	120
3.3.	<i>RPGR</i>	120
3.4.	<i>ABCA4</i>	122
4.	Pacientes con diagnóstico genético incompleto.....	125
5.	Pacientes con mutaciones concomitantes	126
5.1.	Familia fRPN-NB	126
5.2.	Familia fRPN-142	128
5.3.	Familia fRPN-51	129
5.4.	Familia fRPN-219	130
5.5.	Familia RPN-194	131
5.6.	Familia fRPN-169	132
6.	Estudios funcionales mediante minigenes	133
6.1.	Mutaciones con efecto deletéreo observado.....	133
6.2.	Mutaciones sin efecto deletéreo observado.....	135
7.	Pacientes no resueltos	138
8.	Perspectivas terapéuticas.....	139
VI.	CONCLUSIONS	141
VII.	BIBLIOGRAFÍA	145
VIII.	ANEXOS	173
	Anexo 1. Datos clínicos.....	175
	Anexo 2. Cuestionario	187

Anexo 3. Consentimiento informado.....	188
Anexo 4. Cebadores.....	193
Anexo 5. Variantes identificadas	203
Anexo 6. Artículos publicados	226

ABSTRACT

Inherited retinal dystrophies (IRD) are a group of disorders generally characterized by the progressive death of photoreceptors and retinal pigment epithelial cells. IRD affect more than 2 million people in the world, producing a partial and, in many cases, total loss of vision, for which there is no treatment that reverses or slows the progression of the disease. They are characterized by a high clinical and genetic heterogeneity, identifying mutations in more than 250 genes responsible for some type of IRD to date.

This doctoral thesis has focused on the genetic diagnosis of 208 patients affected by non-syndromic IRD (NS-IRD), through targeted genomic sequencing focuses on a panel of 117 genes and five deep intronic regions in which mutations have previously been identified. The identified variants in patients are prioritized according to the minimum allelic frequency and are classified according to the criteria of the American College of Medical Genetics and Genomics guide. The copy number variants identified by panel sequencing were validated using multiplex ligation-dependent probe amplification or genomic array. All patients underwent an ophthalmological study, more or less comprehensive, including electrophysiological tests. In addition, *in vitro* assays with minigenes were performed to verify the impact of certain variants on mRNA processing. To do this, pSPL3 plasmid in which the mutation was introduced was used, the transformation was performed in electrocompetent *E. coli* bacteria and transfection in HEK-293 cells.

By the panel sequencing, a diagnostic rate of 60% was obtained. The mutations in the resolved patients were distributed in 30 different genes, of which 38 were described for the first time in this work. The most frequently mutated genes in these patients were *ABCA4*, *USH2A*, *RPGR* and *PRPH2*. In addition, eight copy number variants were identified in the genes *EYS*, *ABCA4*, *PRPF31*, *MERTK*, *CRB1* and *ROM1*, that demonstrated the enormous potential of these technologies. In total, 10% of the families studied were reclassified and intra and inter-family phenotypic variability was detected in patients with mutations in *C1QTNF5*, *CERKL* and *PROM1*. In addition, we highlight that 50% of the symptomatic and heterozygous *RPGR* women showed retinitis pigmentosa (RP) with interocular asymmetry. Likewise, we identified a case with possible digenism between the *CNGA1* and *CNGB1* genes, and the complete duplication of *ROM1* in two unrelated families diagnosed with RP. On the other hand, six families have been identified with mutations in two genes that could potentially be

the cause of IRD. Functional assays by minigenes showed that six of the studied variants affected splicing.

The results of this thesis highlight the clinical utility of targeted genomic sequencing in IRD and the importance of a complete ophthalmological examination that allows us to establish new genotype-phenotype associations and expand the knowledge of this group of diseases. Identifying the cause of the disease is essential to improve patient management, to perform an accurate genetic counseling and to take advantage of treatments based on gene therapy.

RESUMEN

Las distrofias hereditarias de la retina (DHR) son un conjunto de trastornos caracterizados por la muerte, generalmente, progresiva de fotorreceptores y células del epitelio pigmentario retiniano. Las DHR afectan a más de 2 millones de personas en el mundo, produciendo una pérdida parcial y, en muchos casos, total de la visión, para la cual no existe ningún tratamiento que revierta o frene la progresión de la enfermedad. Se caracterizan por una elevada heterogeneidad clínica y genética, identificándose hasta la fecha mutaciones en más de 250 genes responsable de algún tipo de DHR.

Esta tesis doctoral se ha centrado en el diagnóstico genético de 208 pacientes afectados de DHR no sindrómica (DHR-NS), mediante secuenciación masiva dirigida a un panel de 117 genes y cinco regiones intrónicas profundas en las que previamente se habían descrito mutaciones. Las variantes identificadas en los pacientes se priorizaron de acuerdo a la mínima frecuencia alélica y se clasificaron según los criterios de la guía del *American College of Medical Genetics and Genomics*. Las variantes de número de copias identificadas mediante la secuenciación del panel se validaron utilizando *multiplex ligation-dependent probe amplification* o *array* genómico. A todos los pacientes se les realizó un estudio oftalmológico, más o menos exhaustivo, incluyendo pruebas electrofisiológicas. Además, se realizaron ensayos *in vitro* con minigenes para comprobar la repercusión de ciertas variantes sobre el procesamiento del ARNm. Para ello, se empleó el plásmido pSPL3 en el que se introdujo la mutación a estudio, la transformación se realizó en bacterias *E. coli* electrocompetentes y la transfección en células HEK-293.

Mediante la secuenciación del panel de genes, se obtuvo una tasa diagnóstica del 60%. Las mutaciones en los pacientes resueltos se distribuyeron en 30 genes diferentes, de las cuales 38 se describen por primera vez en este trabajo. Los genes mutados con mayor frecuencia en estos pacientes fueron *ABCA4*, *USH2A*, *RPGR* y *PRPH2*. Adicionalmente, se identificaron ocho variantes de número de copias en los genes *EYS*, *ABCA4*, *PRPF31*, *MERTK*, *CRB1* y *ROM1*, demostrando el enorme potencial de estas tecnologías. En total, se reclasificaron el 10% de las familias estudiadas y se observó variabilidad fenotípica intra e inter familiar en pacientes con mutaciones en *C1QTNF5*, *CERKL* y *PROM1*. Además, destacamos que el 50% de las mujeres heterocigotas para *RPGR* y sintomáticas presentaron retinosis pigmentaria (RP) con asimetría interocular. Asimismo, se identificó un caso con posible digenismo entre los genes *CNGA1* y *CNGB1*, y la duplicación completa de *ROM1* en dos familias

no relacionadas diagnosticadas de RP. Por otra parte, se han identificado seis familias con mutaciones en dos genes que potencialmente ambos podrían ser la causa de la DHR. En el ensayo funcional mediante minigenes, se observó que seis de las variantes analizadas presentaron un *splicing* aberrante.

Los resultados de esta tesis destacan la utilidad clínica de la secuenciación masiva dirigida para las DHR-NS y la importancia de un examen oftalmológico completo que nos permita establecer nuevas asociaciones genotipo-fenotipo y ampliar el conocimiento de este grupo de enfermedades. Identificar la causa de la enfermedad es esencial para mejorar el manejo del paciente, realizar un asesoramiento genético preciso y beneficiarse de los futuros tratamientos y ensayos clínicos basados en terapia génica.

RESUM

Les distròfies hereditàries de la retina (DHR) són un conjunt de trastorns caracteritzats per la mort, generalment, progressiva de fotoreceptors i cèl·lules de l'epiteli pigmentari retinià. Les DHR afecten més de 2 milions de persones al món, produint una pèrdua parcial i, en molts casos, total de la visió, per la qual no hi ha cap tractament que revertisca o frene la progressió de la malaltia. Es caracteritzen per una elevada heterogeneïtat clínica i genètica, identificant-se fins a la data mutacions en més de 250 gens responsable d'algun tipus de DHR.

Esta tesi doctoral s'ha centrat en el diagnòstic genètic de 208 pacients afectats de DHR no sindròmica (DHR-NS), per mitjà de seqüenciació massiva dirigida a un panell de 117 gens i cinc regions intròniques profundes en les que prèviament s'havien descrit mutacions. Les variants identificades en els pacients es van prioritzar d'acord a la mínima freqüència al·lèlica i es van classificar segons els criteris de la guia de *l'American College of Medical Genetics and Genomics*. Les variants de nombre de còpies identificades per mitjà de la seqüenciació del panell es van validar utilitzant *multiplex ligation-dependent probe amplification* o array genòmic. A tots els pacients se'ls va realitzar un estudi oftalmològic, més o menys exhaustiu, incloent proves electrofisiològiques. A més, es van realitzar assajos *in vitro* amb minigens per comprovar la repercussió de certes variants sobre el processament de l'ARNm. Per a això, es va emprar el plasmidi pSPL3 en què es va introduir la mutació a estudi, la transformació es va realitzar en bacteris *E. coli* electrocompetentes i la transfecció en cèl·lules HEK-293.

Per mitjà de la seqüenciació del panell de gens, es va obtenir una taxa diagnòstica del 60%. Les mutacions en els pacients resolts es van distribuir en 30 gens diferents, de les quals 38 es descriuen per primera vegada en este treball. Els gens mutats amb major freqüència en estos pacients van ser *ABCA4*, *USH2A*, *RPGR* i *PRPH2*. Addicionalment, es van identificar huit variants de nombre de còpies en els gens *EYS*, *ABCA4*, *PRPF31*, *MERTK*, *CRB1* i *ROM1*, demostrant l'enorme potencial d'estes tecnologies. En total, es van reclassificar el 10% de les famílies estudiades i es va observar variabilitat fenotípica intra i inter familiar en pacients amb mutacions en *C1QTNF5*, *CERKL* i *PROM1*. A més, destaquem que el 50% de les dones heterozigotes per *RPGR* i simptomàtiques van presentar retinosi pigmentària (RP) amb asimetria interocular.

Així mateix, es va identificar un cas amb possible digenismo entre els gens *CNGA1* i *CNGB1*, i la duplicació completa de *ROM1* en dues famílies no relacionades

diagnosticades de RP. D'altra banda, s'han identificat sis famílies amb mutacions en dos gens que potencialment ambdós podrien ser la causa de la DHR. En l'assaig funcional per mitjà de minigens, es va observar que sis de les variants analitzades van presentar un *splicing* aberrant.

Els resultats d'esta tesi destaquen la utilitat clínica de la seqüenciació massiva dirigida per a les DHR-NS i la importància d'un examen oftalmològic complet que ens permeta establir noves associacions genotip-fenotip i ampliar el coneixement d'este grup de malalties. Identificar la causa de la malaltia és essencial per millorar el maneig del pacient, realitzar un assessorament genètic precís i beneficiar-se dels tractaments basats en teràpia gènica.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1 Estructura del ojo humano	4
Figura I.2 Estructura de la retina humana.	5
Figura I.3 Estructura de los fotorreceptores.	7
Figura I.4 Fototransducción.	9
Figura I.5 Representación del ciclo visual descrito en bastones.....	10
Figura I.6 Solapamiento clínico entre las distintas distrofias de retina.....	21
Figura I.7 Representación del solapamiento genético entre la RP y otras DHR.....	22
Figura I.8 Representación esquemática de los tres procesos principales que tienen lugar en fotorreceptores y células del EPR	23
Figura I.9 Potencial evocado visual con estímulo Pattern.....	24
Figura I.10 Electroretinograma de campo completo.....	25
Figura I.11 Electroretinograma multifocal.....	26
Figura I.12 Campos visuales del ojo derecho.....	28
Figura I.13 Imágenes de fondo de ojo a color del ojo izquierdo.	29
Figura I.14 Imágenes de fondo de ojo con autofluorescencia	29
Figura I.15 Imágenes de tomografía de coherencia óptica.....	30
Figura I.16 Ciclo de acoplamiento y desacoplamiento del espliceosoma	35
Figura I.17 Localización esquemática de los elementos de <i>splicing cis</i> y <i>trans</i>	35
Figura I.18 Esquema de un minigen.	37
Figura I.19 Posibilidades terapéuticas para los diferentes estadios de la retinosis pigmentaria.....	41
Figura III.1 Esquema de la preparación de la librería	55
Figura III.2 Esquema de la secuenciación con Illumina.....	57
Figura III.3 Esquema representativo del análisis de las lecturas.	58
Figura IV.1 Representación del porcentaje del tipo de variantes identificadas en los pacientes.	72
Figura IV.2 Número de casos resueltos con mutaciones en los genes representados.....	73
Figura IV.3 Tipo de mutaciones identificadas en los pacientes resueltos.	73

Figura IV.4 Datos clínicos de la familia fRPN-100.....	78
Figura IV.5 Asimetría interocular. Datos clínicos de la paciente RPN-230 a los 52 años	82
Figura IV.6 Asimetría interocular. Datos clínicos de la paciente RPN-60 a los 57 años	82
Figura IV.7 Asimetría interocular. Datos clínicos de la paciente RPN-117 a los 39 años	83
Figura IV.8 Asimetría interocular. Datos clínicos de la paciente RPN-488 a los 67 años	83
Figura IV.9 Segregación familiar de las mutaciones identificadas en la familia fRPN-NB	89
Figura IV.10 Imágenes de OCT de los pacientes de la familia fRPN-NB.....	91
Figura IV.11 Imágenes del fondo de ojo de los pacientes de la familia fRPN-NB.....	92
Figura IV.12 Segregación familiar de las mutaciones identificadas en la familia fRPN-142.	93
Figura IV.13 Pruebas oftalmoscópicas de los pacientes de la familia fRPN-142	94
Figura IV.14 Segregación familiar de las mutaciones identificadas en la familia fRPN-51.	95
Figura IV.15 Pruebas oftalmoscópicas de los pacientes de la familia fRPN-142.....	96
Figura IV.16 Pruebas oftalmoscópicas de los pacientes de la familia fRPN-219	97
Figura IV.17 Segregación familiar de las mutaciones identificadas en la familia fRPN-219.	98
Figura IV.18 Segregación familiar de las mutaciones identificadas en la familia fRPN-194.	99
Figura IV.19 Pruebas oftalmoscópicas de los pacientes de la familia fRPN-194.....	99
Figura IV.20 Segregación familiar de las mutaciones identificadas en la familia fRPN-169.	100
Figura IV.21 Resultados de los minigenes para la variante c.2972G>T de <i>ABCA4</i>	103
Figura IV.22 Resultados de los minigenes para la variante c.6148G>C de <i>ABCA4</i>	104
Figura IV.23 Resultados de los minigenes para la variante c.637_639del de <i>BEST1</i>	105
Figura IV.24 Resultados de los minigenes para la variante c.2153-12_2155del de <i>CACNA2D4</i>	105
Figura IV.25 Resultados de los minigenes para la variante c.2039C>T de <i>CNNM4</i>	106

Figura IV.26 Resultados de los minigenes para la variante c.1105G>A de <i>FSCN2</i> ...	107
Figura IV.27 Resultados de los minigenes para la variante c.532A>G de <i>IDH3B</i>	107
Figura IV.28 Resultados de los minigenes para la variante c.755A>G de <i>MAK</i>	108
Figura IV.29 Resultados de los minigenes para la variante c.1450G>A de <i>MERTK</i> ..	109
Figura IV.30 Resultados de los minigenes para la variante c.182C>G de <i>PRPF31</i> ...	110
Figura IV.31 Resultados de los minigenes para la variante c.182C>G de <i>PRPF31</i> ...	110
Figura IV.32 Resultados de los minigenes para la variante c.2544+4A>G de <i>RIMS1</i>	111
Figura IV.33 Resultados de los minigenes para la variante c.930+3A>G de <i>RPGRIP1</i>	112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla III.1 Clasificación clínica de los pacientes incluidos en el estudio.....	49
Tabla III.2 Mutaciones de los pacientes control.....	50
Tabla III.3 Regiones incluidas en el diseño del panel.....	52
Tabla III.4 Mutaciones intrónicas profundas incluidas en el diseño del panel.	53
Tabla III.5 Programa del termociclador para la hibridación.....	54
Tabla III.6 Condiciones de PCR para la Biotools DNA polimerase (5 U/ μ L).	60
Tabla III.7 Condiciones de la reacción de secuenciación para kit BigDye® Terminator v3.1.....	60
Tabla III.8 Mutaciones intrónicas profundas no incluidas en el panel.	61
Tabla III.9 Condiciones de PCR para la Phusion High-Fidelity DNA polimerase.	64
Tabla III.10 Condiciones del ensayo de doble digestión.....	64
Tabla III.11 Condiciones del ensayo de ligación.	65
Tabla III.12 Condiciones de incubación en la transformación por choque térmico.....	65
Tabla III.13 Componentes de la transfección.	66
Tabla III.14 Condiciones del ensayo de retrotranscripción.	67
Tabla IV.1 Resumen de los parámetros de calidad obtenidos en la secuenciación de los controles y pacientes.....	71
Tabla IV.2 CNV identificadas mediante el programa DECoN	74
Tabla IV.3 Clasificación clínica y de modo de herencia de los pacientes después del estudio genético y tasa diagnóstica calculada para cada entidad clínica.	76
Tabla IV.4 Datos clínicos y genotipo de los pacientes con mutaciones en <i>RPGR</i>	80
Tabla IV.5 Pacientes con mutaciones bialélicas en <i>ABCA4</i> clasificados según subtipo fenotípico.	85
Tabla IV.6 Mutaciones identificadas en pacientes con diagnóstico genético incompleto	87
Tabla IV.7 Datos clínicos y genotipo de los pacientes de la familia fRPN-NB.	90
Tabla IV.8 Predicciones bioinformáticas de las variantes seleccionadas para el ensayo con minigenes.....	102

Tabla IV.9 Resumen: mutaciones con efecto deletéreo sobre el <i>splicing</i>	112
Tabla VIII.1 Datos clínicos de los pacientes diagnosticados genéticamente.	175
Tabla VIII.2 Cebadores utilizados en la validación y segregación familiar.	193
Tabla VIII.3 Cebadores para la identificación de mutaciones intrónicas profundas no incluidas en el panel.	201
Tabla VIII.4 Secuencias de los cebadores utilizados en la construcción de los minigenes.	201
Tabla VIII.5 Cebadores del vector pSPL3.	202

ABREVIATURAS

ACL	Amaurosis congénita de Leber
ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
AD	Autosómica dominante
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AON	<i>Antisense oligonucleotides</i>
AR	Autosómica recesiva
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AV	Agudeza visual
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CNEC	Ceguera nocturna estacionaria congénita
CNV	<i>Copy Number Variants</i>
DC	Distrofia de conos
DCB	Distrofia de conos-bastones
DHR	Distrofias hereditarias de la retina
DMVB	Distrofia macular viteliforme de Best
EOG	Electrooculograma
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ERG	Electrorretinograma
ERG-G	Electrorretinograma Ganzfeld
ERG-mf	Electrorretinograma multifocal
ESE	<i>Exonic splicing enhancers</i>
ESS	<i>Exonic splicing silencers</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GTP	Guanosín trifosfato
HSF	Human splicing finder
iPSCs	<i>Induced pluripotent stem cells</i>
ISE	<i>Intronic splicing enhancers</i>
ISS	<i>Intronic splicing silencers</i>
LX	Ligada al cromosoma
MAF	<i>Minimum allele frequency</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation Probe Amplification</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
OCT	Tomografía de coherencia óptica
PB	Pares de bases
PEV	Potencial evocado visual
PEVP	Potencial evocado visual Pattern
Pre-ARNm	Precursor de ARN mensajero

RP	Retinosis pigmentaria
SBB	Síndrome de Bardet-Bield
snRNP	<i>Small nuclear ribonucleoproteins</i>
STGD	Enfermedad de Stargardt
USH	Síndrome de Usher
VC	Valor consenso
WES	<i>Whole exome sequencing</i>
WGS	<i>Whole genome sequencing</i>
3' ss	<i>3' splice site</i>
5' ss	<i>5' splice site</i>

I. INTRODUCCIÓN

1. LA VISIÓN

La visión o sentido de la vista es uno de los cinco sentidos que tiene el ser humano y, quizás, uno de los más importantes. La visión nos permite orientarnos e interpretar el entorno físico que nos rodea gracias a los rayos de luz que recibe el ojo y transforma en señales eléctricas, que son enviadas al cerebro a través de las vías ópticas donde serán interpretadas (Pons Moreno and Martínez Verdú 2004).

1.1. Anatomía del ojo humano

El ojo o globo ocular es el órgano principal del sentido de la vista. Está formado por dos líquidos de relleno (humor acuoso y humor vítreo), el cristalino y tres capas concéntricas superpuestas (Kanski and Bowling 2011) (Figura I.1):

- Capa fibrosa: es la capa más externa del ojo y su función principal es la de proteger y sostener el globo ocular. Está formada por dos estructuras continuas entre sí: la **esclerótica**, membrana posterior blanquecina formada por fibras de colágeno, y la **córnea**, membrana anterior y transparente que permite el paso de luz.
- Capa vascular o úvea formada por: la **coroides**, membrana posterior muy irrigada con vasos sanguíneos y tejido conectivo cuya función es la de nutrir al resto de capas del ojo; el **cuerpo ciliar**, localizada en la parte anterior del ojo y responsable de la producción del humor acuoso y de la acomodación del cristalino; el **iris**, membrana coloreada y circular cuya función es controlar la cantidad de luz que penetra en el ojo.
- Capa nerviosa o retina: capa más interna donde se encuentran las células fotosensibles recubiertas por células epiteliales cúbicas que contienen melanina. Su función principal es transformar las señales de luz en impulsos eléctricos. Esta es la capa afectada en las enfermedades hereditarias estudiadas en este trabajo.

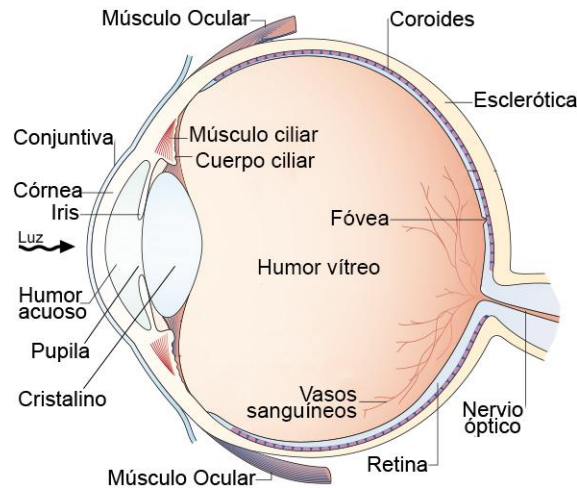


Figura I.1 Estructura del ojo humano. Representación esquemática del ojo humano en el que la luz pasa a través de la córnea, humor acuoso, pupila, cristalino y humor vítreo antes de alcanzar la retina sensible a la luz. Modificada de (Wright et al. 2010).

1.2. Estructura y función de la retina

La retina es la capa más interna del globo ocular. Anatómicamente se diferencia en dos regiones (Dowling 1987):

- Retina anterior o ciega, que reviste la cara anterior del cuerpo ciliar e iris.
- Retina posterior o sensitiva, que cubre las tres cuartas partes del globo ocular y en la que podemos diferenciar: i) la **papila óptica**, disco óptico o punto ciego, que es la región donde convergen las prolongaciones de las neuronas para formar el nervio óptico; ii) la **mácula**, zona ovalada con un color amarillento situada en el centro de la retina y iii) la **fóvea**, depresión avascular localizada en el centro de la mácula y zona de mayor agudeza visual.

La retina tiene una estructura estratificada compleja formada por diferentes tipos celulares con un total de diez capas, que incluye el epitelio pigmentario de la retina y el neuroepitelio (Ramón y Cajal 1893).

El **epitelio pigmentario de la retina** (EPR) es la capa más externa de la retina y está formado por una monocapa de células que se adhieren firmemente a la coroides a través de la membrana de Brunch. Estas células tienen microvellosidades en su polo apical, que envuelven los segmentos externos de los fotorreceptores, y gránulos de melanina en su citoplasma. El EPR tiene funciones indispensables para la viabilidad de los fotorreceptores: absorber las radiaciones luminosas, proporcionar el intercambio metabólico entre la coroides y el neuroepitelio, además de la fagocitosis y degradación constante de los segmentos externos de los fotorreceptores (Young and Bok 1969). Como consecuencia de los procesos de degradación que tienen lugar en el EPR, se

genera un subproducto llamado lipofuscina, cuya acumulación anormal ha sido identificada en varios trastornos hereditarios de la retina (Michel Michaelides et al. 2006).

Por otra parte, el neuroepitelio está constituido por células gliales de sostén, entre las que destacan las **células de Müller**, y cinco clases de neuronas: **fotorreceptores** (conos y bastones), **células bipolares**, **células horizontales**, **células amacrinas** y **células ganglionares** (Figura I.2). Los fotorreceptores, células bipolares y células ganglionares participan en la vía principal o vertical de traducción de la señal, y las células horizontales y células amacrinas ejercen un papel modulador sobre la vía vertical.

La principal función de la retina es transformar el estímulo lumínico en impulso nervioso que, a través del nervio óptico, llega a la corteza cerebral donde se traduce en las imágenes que percibimos (Wright et al. 2010).

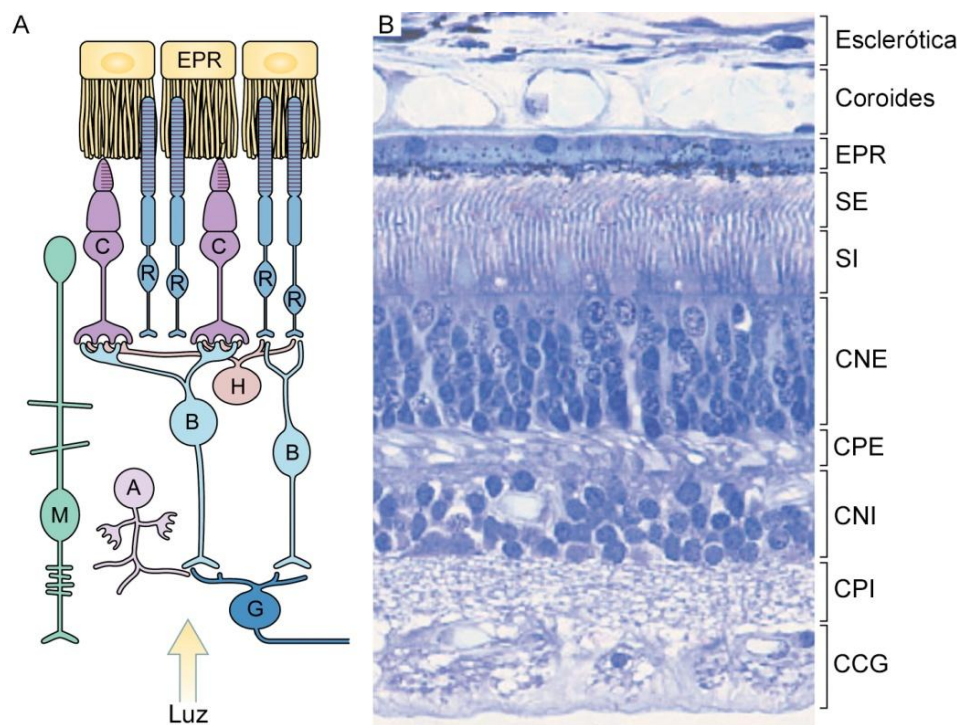


Figura I.2 Estructura de la retina humana. (A) Diagrama de la organización de las células retinianas: A, células amacrinas; B, células bipolares; C, conos; G, células ganglionares; H, células horizontales; M, células de Müller; R, bastones. (B) Sección transversal estratificada de la retina humana: i) capa de fotorreceptores, formada por los segmentos externos (SE) de los conos y bastones; ii) capa limitante externa, representa la unión intercelular entre los fotorreceptores y las células de Müller; iii) capa nuclear externa (CNE), formada por los núcleos de los fotorreceptores; iv) capa plexiforme externa (CPE), región de sinapsis entre los fotorreceptores con las células bipolares y horizontales; v) capa nuclear interna (CNI), formada por los núcleos de las células bipolares, amacrinas, horizontales y de Müller; vi) capa plexiforme interna (CPI), región de sinapsis entre las células bipolares con las células ganglionares y amacrinas; vii) capa de células ganglionares (CCG), formada por los núcleos de las células ganglionares; viii) capa de fibras del nervio óptico, constituida por los axones de las células ganglionares; ix) capa limitante interna, formada por la membrana basal de las células de Müller, que tiene función de soporte y separa la retina del humor vítreo. Modificada de (Sung and Chuang 2010).

1.3. Los fotorreceptores

Uno de los tipos celulares principales de la retina son los fotorreceptores, que son las neuronas responsables de transformar la energía lumínica en potencial eléctrico mediante el proceso de la fototransducción. La mayoría de vertebrados tienen dos tipos de fotorreceptores: bastones y conos, los cuales se diferencian entre sí en su morfología, localización, fotopigmento y función. Ambos tienen una estructura funcional similar (Figura I.3), que consiste en (Wassle and Boycott 1991; Kolb 2002):

- Segmento externo. En los bastones, el segmento externo está formado por una acumulación de discos membranosos en forma de pilas de monedas rodeados por la membrana celular, sin embargo, en los conos, los discos están formados por repliegues de la propia membrana plasmática. En el segmento externo es donde se localiza el pigmento fotosensible de los fotorreceptores y donde se realiza la fototransducción.

- Segmento interno. Es donde se localiza una gran acumulación de mitocondrias y donde reside la maquinaria de síntesis proteica de la célula.

- Cilio conector. Conectando el segmento externo y el segmento interno se localiza un cilio conector interno que presenta una estructura similar a los cilios o flagelos de otras células. El cilio conector sirve de paso de vesículas entre el segmento externo y el interno. Esta función es esencial para el funcionamiento de los fotorreceptores ya que el segmento externo carece de la maquinaria necesaria para la síntesis de energía y proteínas.

- Cuerpo celular. Contiene el núcleo del fotorreceptor.

-Terminación sináptica. Los fotorreceptores, además de realizar la fototransducción, se comportan como neuronas, liberando neurotransmisores en su terminal axónico, conectando, de esta manera, con las células horizontales y bipolares.

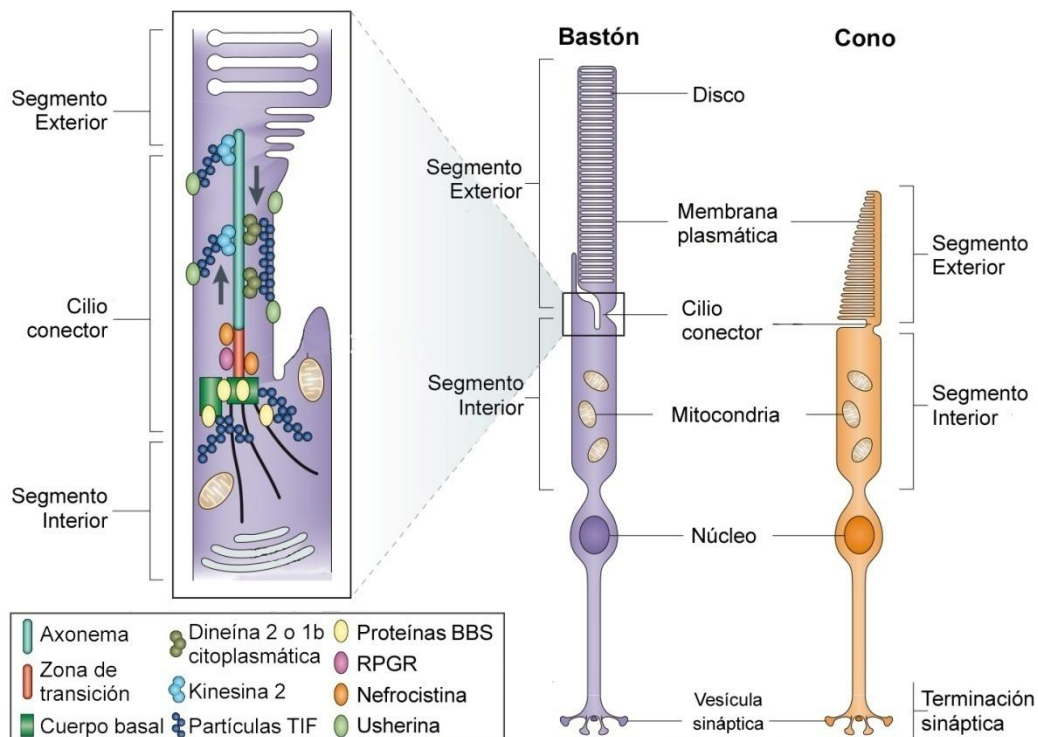


Figura I.3 Estructura de los fotorreceptores. En la parte derecha está representada la estructura de un bastón y un cono. En la parte izquierda se detalla la estructura del cilio conector que consiste en una columna vertebral, llamada axonema, que se compone de nueve dobletes de microtúbulos organizados en un círculo. Existe un elevado flujo de proteínas y membranas desde el segmento interno hacia el externo a través de mecanismos de transporte intraflagelar (TIF), accionados por motores kinesina 2 (hacia la punta del axonema) o por motores de dineína (hacia el cuerpo basal), por lo que el cilio es crucial para la función y supervivencia de los fotorreceptores. BBS, síndrome de Bardet-Bield; RPGR, regulador de retinosis pigmentaria GTPasa. Modificada de (Wright et al. 2010).

Los **bastones** son los fotorreceptores más abundantes de la retina humana, representan el 95% (aproximadamente 120 millones), se distribuyen por toda la retina, excepto en la fóvea. Son los responsables de la visión periférica y la visión nocturna, ya que son altamente sensibles a la luz. Los discos del segmento externo contienen un tipo de fotorreceptor, la rodopsina, que tiene su máximo de absorción alrededor de 500 nm y es responsable de la visión en blanco y negro. Por otra parte, la cantidad de **conos** en la retina es 20 veces inferior (aproximadamente 6-7 millones) y su densidad aumenta a medida que nos acercamos a la mácula, siendo máxima en la fóvea donde además es el único tipo de fotorreceptor dada la ausencia de bastones en esta zona (Osterberg 1935; Kolb 2002). Los conos son menos sensibles a la luz que los bastones, por lo que se activan en condiciones fotópicas, y tienen tres tipos de ópsinas. En función de la longitud de onda en la que tienen su máximo de absorción, estas ópsinas determinarán el tipo de cono: conos-S (azul, 421 nm), conos-M (verde, 530 nm) y conos-L (rojo, 559nm). Los conos son responsables de la visión cromática y de la agudeza visual (Stockman and Sharpe 2000).

1.4. Fototransducción

La fototransducción es un proceso bioquímico mediante el cual una señal luminosa es absorbida por los pigmentos visuales en los fotorreceptores, amplificada y convertida en una respuesta neuronal. Este proceso tiene lugar en la membrana de los discos del segmento externo de los fotorreceptores y participan diversos canales catiónicos dependientes de guanosín monofosfato cíclico (GMPc).

En condiciones de **oscuridad**, el GMPc activa los canales catiónicos dando lugar a una despolarización de la membrana del fotorreceptor y, por tanto, una continua liberación de su neurotransmisor glutamato en la sinapsis. En condiciones de **luz**, la rodopsina en los bastones y diferentes opsinas en los conos, absorben un fotón de luz, lo que produce un cambio conformacional de *cis* a *trans* del cromóforo retiniano y la consiguiente activación de la opsina. La opsina activada, activa una proteína G heterodimérica llamada transducina, la cual, mediante el aumento de la síntesis de guanosín trifosfato (GTP), estimula la actividad de la fosfodiesterasa 6 para degradar el GMPc, que es lo que mantiene abiertos los canales catiónicos. Por tanto, los canales se cierran disminuyendo la secreción de glutamato por parte de los fotorreceptores. De esta forma, se acumulan cationes en el exterior de la membrana plasmática y el potencial de receptor adopta una forma de hiperpolarización (Michel Michaelides et al. 2006; Yau and Hardie 2009) (Figura I.4).

En conclusión, en condiciones de oscuridad los conos y bastones están despolarizados (-40 mV) y liberan glutamato, inhibiendo las células bipolares. Sin embargo, en condiciones fotópicas los fotorreceptores se hiperpolarizan (-70 mV) disminuyendo la liberación de glutamato, activando así las células bipolares. Este potencial de acción llegará a las células ganglionares que transmitirán la señal a través de sus axones hasta la corteza visual del cerebro (Schnapf and Baylor 1987).

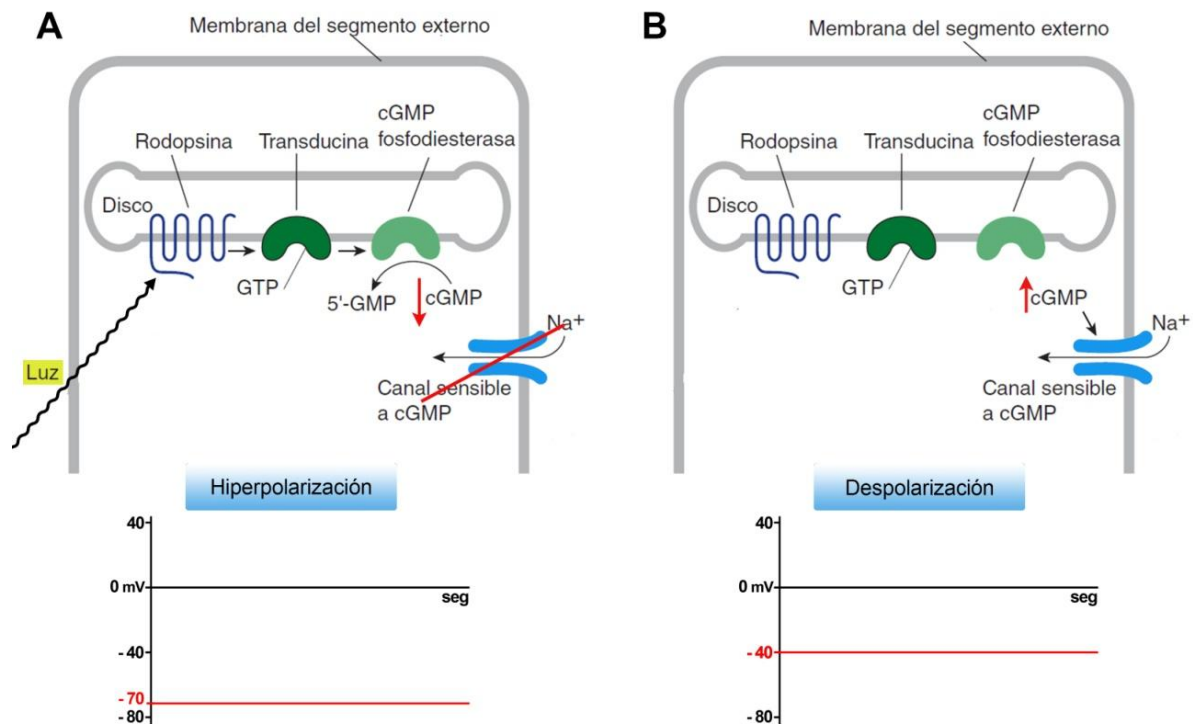


Figura 1.4 Fototransducción. Fototransducción. (A) En condiciones de luz y (B) en condiciones de oscuridad. Abreviaciones: cGMP: guanósil monofosfato cíclico; GTP: guanósil trifosfato; 5'-GMP: guanósil monofosfato 5'. Modificada de (Raff and Levitzky 2011).

1.5. Ciclo visual

El ciclo visual es una vía de reacciones enzimáticas mediante la cual se regenera el cromóforo retiniano. Tras la activación del fotorreceptor por la luz, el *all-trans* retinal se libera de la opsina, se conjuga con la proteína retinol aciltransferasa (LRAT) y es transportado del interior del disco al citoplasma del fotorreceptor mediante la proteína ABCA4 (de la familia de proteínas ABCR, *ATP-binding cassette transporter retina-specific*). A continuación, el *all-trans* retinal se reduce a *all-trans* retinol mediante la enzima RDH12 (*all-trans retinol deshidrogenase 12*) y es transportado al EPR por la IRBP (*intersticial retinol binding protein*) donde adquiere su conformación inicial (11-*cis* retinal) (Wright et al. 2010; Den Hollander et al. 2010) (Figura 5).

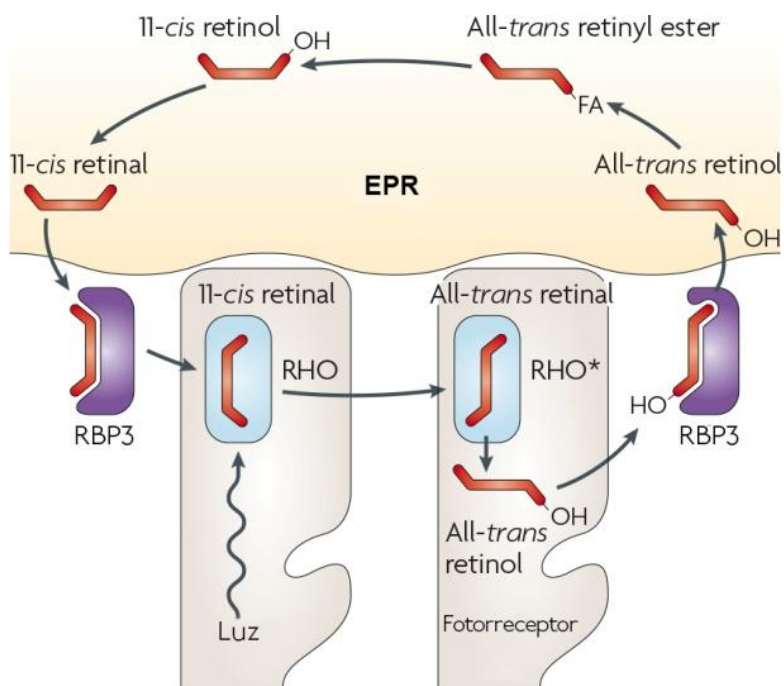


Figura I.5 Representación del ciclo visual descrito en bastones. Abreviaciones: EPR: Epitelio pigmentario de la retina, RHO*: rodopsina activada. Modificada de (Wright et al. 2010).

2. DISTROFIAS HEREDITARIAS DE LA RETINA

Las distrofias hereditarias de la retina (DHR) son un conjunto de trastornos caracterizados por la muerte, generalmente, progresiva de fotorreceptores y células del EPR. Se estima que este grupo de enfermedades afecta a 1 de cada 3000 personas (Sahel, Marazova, and Audo 2015), por lo que se engloban dentro de las denominadas enfermedades raras. Las DHR producen una pérdida parcial y, en muchos casos, total de la visión, para lo cual no existe ningún tratamiento que revierta o frene la progresión de la enfermedad (Berger, Kloeckener-Gruissem, and Neidhardt 2010).

Son enfermedades monogénicas que pueden presentar herencia autosómica dominante (AD), autosómica recesiva (AR) y ligada al cromosoma X (LX), aunque en algunos casos minoritarios también se han descrito otros tipos de herencia no mendeliana como herencia mitocondrial, digenismo y disomía uniparental (Rivolta et al. 2002; Kajiwara, Berson, and Dryja 1994). La degeneración macular asociada a la edad, la principal causa de ceguera en el mundo industrializado, también es una DHR, pero con un patrón de herencia multifactorial, por lo que no está considerada en este trabajo.

2.1. Clasificación de las DHR

Las DHR se pueden clasificar en función de múltiples criterios, por ejemplo: según el área de la retina que se vea predominantemente afectada (periféricas/ centrales), la concurrencia o no de patología extraocular (no sindrómicas/ sindrómicas), si la degeneración de los fotorreceptores es progresiva o no (progresivas/ estacionarias), etc. En este trabajo, las DHR se han clasificado según el tipo de fotorreceptor que se ve afectado al inicio de la enfermedad, por tanto, se han categorizado dentro de 4 grandes grupos: i) distrofias de bastones, ii) distrofias de conos, iii) distrofias mixtas y iv) otras distrofias de la retina (Berger, Kloeckener-Gruissem, and Neidhardt 2010). En esta clasificación se han considerado solo las DHR no sindrómicas.

2.1.1. Distrofias de bastones

Las distrofias de bastones o distrofias de bastones-conos se caracterizan por una pérdida, en primer lugar, de bastones que progresivamente se extenderá también a los conos. Debido a la localización de los fotorreceptores en la retina, a las distrofias de bastones se las conoce también como distrofias periféricas. A su vez, este subgrupo

de DHR puede diferenciarse en función de si son progresivas (ej. Retinosis pigmentaria) o estacionarias (ej. cegueras nocturnas estacionarias).

2.1.1.1. Retinosis pigmentaria

La **Retinosis pigmentaria** (RP, MIM #268000, ORPHA:791) es la DHR más frecuente, suponiendo el 85-90% de todos los casos de DHR (Ayuso and Millan 2010). Estudios realizados en diferentes poblaciones estiman que la RP afecta alrededor de 1 de cada 4.000 personas (Bunker et al. 1984; Ammann, Klein, and Franceschetti 1965). El primer síntoma de la enfermedad es ceguera nocturna, seguida de una pérdida progresiva y concéntrica del campo visual, dando lugar a una visión en túnel. Debido a la escasez de bastones a nivel macular, la función de la mácula permanece relativamente bien preservada hasta estadios avanzados de la enfermedad, cuando también se afectan los conos, pudiendo ocasionar una ceguera completa. Normalmente, la presentación de los síntomas empieza en la adolescencia, pero puede variar desde la infancia temprana hasta la edad adulta. En general, las formas de RP que se manifiestan en una edad temprana progresan más rápido. También se correlaciona la severidad de enfermedad con el patrón de herencia, generalmente, pacientes con RP ligada al X (5-15% de los pacientes con RP) tienen peor pronóstico que los pacientes con RP autosómica recesiva (50-60%), mientras que los pacientes con RP autosómica dominante (30-40%) son los que tienen una mácula mejor preservada (Hamel 2006; Hartong, Berson, and Dryja 2006).

Las anomalías típicas del fondo de ojo en pacientes con RP son: espículas de pigmento a nivel periférico, atenuación vascular y palidez papilar. En la tomografía de coherencia óptica (*optical coherence tomography*, OCT) podemos observar, en estadios tempranos, una desorganización de las capas externas, en primer lugar en la zona de interdigitación, seguido de la zona de los elipsoides y finalmente en la membrana limitante externa. En estadios avanzados de la enfermedad, hay una pérdida completa de la capa de fotorreceptores y la capa nuclear externa. Algunos pacientes con RP presentan otras complicaciones oculares susceptibles de ser tratadas: i) pacientes con RP de inicio temprano pueden presentar nistagmus; ii) más del 50% de los pacientes presentan alteraciones maculares como el edema macular quístico, agujero macular o membrana epirretiniana; iii) aproximadamente el 45% de los pacientes presentan catarata subcapsular posterior (Verbakel et al. 2018).

La RP es la DHR genéticamente más heterogénea ya que, hasta la fecha, se han identificado más de 90 genes asociados a esta enfermedad. De los cuales más de un 50% presenta un patrón de herencia autosómico recesivo (RetNet,

<https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm#A-genes>, acceso: noviembre 2019). Los genes más prevalentes en RP AR son *EYS* (Audo et al. 2010; Barragán et al. 2010) y *USH2A* (Rivolta et al. 2000; Bernal et al. 2003), con una frecuencia de 10-30% y 10-15%, respectivamente (Fahim, Daiger, and Weleber 2000). Los genes mutados con más frecuencia en pacientes con RP AD son *RHO* (28%) seguido de *PRPF31* (8%) (Stephen P. Daiger et al. 2008), mientras que el gen *RPGR* es responsable de al menos el 70% de los casos de RP LX (Vervoort et al. 2000).

2.1.1.2. Ceguera nocturna estacionaria congénita

La **ceguera nocturna estacionaria congénita** (CNEC, ORPHA:2015) se incluye dentro de las distrofias de bastones no progresivas y se caracteriza por nictalopía congénita, generalmente no progresiva, con buena agudeza visual (AV). Sin embargo, algunos pacientes también manifiestan otros síntomas como fotofobia, disminución de la AV, miopía, nistagmus o estrabismo. Estos pacientes presentan por lo general un fondo de ojo normal, excepto dos subtipos de CNEC, **enfermedad de Oguchi** (ORPHA:75382) y **fundus albipunctatus** (MIM #136880, ORPHA:227796), que presentan una decoloración amarillenta y puntos blancos que respetan el área macular, respectivamente. CNEC y RP tienen un considerable solapamiento debido a que mutaciones en varios genes pueden dar lugar a una y otra enfermedad (Zeit, Robson, and Audo 2015).

2.1.2. Distrofias de conos

Las distrofias de conos o distrofias centrales se caracterizan por una pérdida generalmente progresiva de conos al inicio de la enfermedad con una disfunción también de bastones en estadios más avanzados. Al igual que las distrofias de bastones, las distrofias de conos se subdividen en progresivas (ej. Distrofias de conos, distrofias de conos-bastones y distrofias maculares) y estacionarias (ej. acromatopsia congénita).

2.1.2.1. Distrofia de conos (DC) y distrofia de conos-bastones (DCB)

La **Distrofia de conos** (DC, ORPHA:1871) y **distrofia de conos-bastones** (DCB, ORPHA:1871) tienen una prevalencia de 1:30.000-1:40.000 (Michel Michaelides 2004; Hamel 2007), diez veces menor que la RP, sin embargo, el curso clínico de estas enfermedades es generalmente más rápido y severo que las distrofias de bastones-conos. La DC y la DCB se caracterizan por presentar fotofobia, disminución de la AV, discromatopsia y escotomas centrales. A diferencia de la DC, la distrofia de DCB

presenta una disfunción temprana de los bastones dando lugar a una nictalopía prácticamente al inicio de la enfermedad (Michel Michaelides et al. 2006). En ambas enfermedades, los pacientes suelen debutar entre las 2 primeras décadas de la vida, seguido de una pérdida de visión gradual y terminando con ceguera legal antes de los 25 años en el caso de las DCB y antes de los 50 años en las DC (Alberta A.H.J. Thiadens et al. 2012).

La DC, a diferencia de las DCB y maculopatías, puede cursar con ausencia de lesiones maculares durante años, a pesar de que la AV esté disminuida (Hamel 2007). En estadios avanzados, tanto en la DC como en la DCB y maculopatías, se observa no solo la atrofia central sino también signos y síntomas de RP. En fases tempranas, el electroretinograma (ERG) nos permitirá diferenciar una distrofia de conos (respuestas fotópicas claramente disminuidas) de una distrofia macular (respuestas fotópicas normales o levemente disminuidas) y de una DCB, en la que además de una afectación importante de las respuestas fotópicas, hay una disminución de las respuestas escotópicas (Michel Michaelides et al. 2006).

La DC y la DCB son también genéticamente heterogéneas ya que, hasta la fecha, se han identificado más de 30 genes asociados a ambas enfermedades (RetNet), con patrones de herencia AR (80%), AD (15%) o LX (5%) (Alberta A. H. J. Thiadens et al. 2011). El gen *ABCA4* es una importante causa genética para ambas DHR, con una frecuencia de casos de 9% para la DC y 26% para la DCB (Alberta A.H.J. Thiadens et al. 2012).

2.1.2.2. Acromatopsia congénita

La **acromatopsia congénita** (ORPHA:49382) es una distrofia de conos generalmente no progresiva de herencia autosómica recesiva. Se caracteriza por una ceguera completa (acromatopsia completa) o incompleta a los colores (acromatopsia incompleta), una importante fotofobia, disminución de la agudeza visual y nistagmus. El fondo de ojo es generalmente normal, aunque puede observarse cambios granulares en la mácula y en algunos casos maculopatía en ojo de buey. En el ERG se observa una respuesta de bastones normal, con ausencia de respuesta de conos. Hasta la fecha, la acromatopsia congénita se asocia con mutaciones en 6 genes diferentes, siendo el gen *CNGB3* el responsable del 45% de los casos (Mayer et al. 2017a).

2.1.2.3. Distrofias maculares

Las distrofias maculares son un conjunto heterogéneo de enfermedades relacionadas con la alteración de los fotorreceptores y el EPR a nivel macular. Se caracterizan por una disminución de la agudeza visual y alteraciones fundoscópicas generalmente simétricas en la mácula, aunque en estadios avanzados también puede afectarse la retina periférica (Michel Michaelides 2003).

2.1.2.3.1. Enfermedad de Stargardt

La **enfermedad de Stargardt** (STGD, MIM #248200, ORPHA:827), también llamada *Fundus flavimaculatus*, es una distrofia macular autosómica recesiva causada por mutaciones en *ABCA4*. Este gen codifica para una proteína transmembrana que participa en el transporte del *all-trans*-retinal. Mutaciones en este gen da lugar a la acumulación de *all-trans*-retinal en el interior del disco de los fotorreceptores que pasará a las células del EPR mediante fagocitosis. La acumulación de este producto en las células del EPR lleva a la formación de lipofuscina, con un color característico naranja fluorescente, cuya acumulación es tóxica para estas células. Por tanto, la muerte de los fotorreceptores se produciría secundariamente al fallo del EPR (Rozet et al. 1998).

La enfermedad de STGD es la segunda DHR más frecuente tras la RP, con una prevalencia de 1:8.000-1:10.000 individuos (Tanna et al. 2017). Aunque la edad de inicio normalmente es entre los 10 y 20 años, las alteraciones iniciales también pueden aparecer en la infancia temprana e incluso en la edad adulta y asociarse con un mejor pronóstico. Se caracteriza por una disminución de la agudeza visual y la aparición de un escotoma relativo o absoluto central (Oh et al. 2004).

Típicamente desarrollan unas manchas amarillentas (*flecks*) centrales y paracentrales, que le da nombre a la enfermedad (*fundus flavimaculatus*, FF). La angiografía fluoresceínica (AF) nos ayuda a diferenciar las drusas (hiperfluorescentes) de los *flecks* típicos del FF (hipofluorescentes o fluorescencia difusa), también nos permite observar el característico fondo oscuro o color bronce causado por el excesivo depósito de lipofuscina en el EPR que impide ver los detalles de la coroides (“silencio corioideo”) y que es casi patognomónico de esta enfermedad. También es común el patrón en ojo de buey, la formación de un anillo de *flecks* que normalmente respeta la fovea, en estos casos los pacientes se suelen quejar de un escotoma anular. La autofluorescencia revela áreas de hiperautofluorescencia correspondientes a acúmulo de lipofuscina e hipoautofluorescencia en áreas de atrofia del EPR. La OCT permite evaluar el grado de pérdida de la capa de fotorreceptores. El ERG es generalmente

normal, aunque en estadios más severos de la enfermedad aparecen signos y síntomas de RP y anomalías del ERG fotópico y escotópico (Querques and Souied 2016; Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica para las Distrofias Hereditarias 2017).

2.1.2.3.2. Distrofia macular viteliforme de Best

La **distrofia macular viteliforme de Best (DMVB) o enfermedad de Best** (MIM #153700, ORPHA:1243) es una de las distrofias maculares más frecuente, afectando a 1:10.000 individuos. Es una enfermedad autosómica dominante y autosómica recesiva debida a mutaciones en *BEST1* con expresividad variable que generalmente se manifiesta en la infancia. Mutaciones en *BEST1* provoca un acúmulo de lipofuscina en el EPR y, secundariamente, la disfunción de los fotorreceptores, similar a lo que ocurre en la enfermedad de STGD. Aunque la presentación de la enfermedad es muy variable, se caracteriza por una mácula con aspecto de “yema de huevo” (viteliforme), debido a los depósitos de lipofuscina en el espacio subretiniano, con disminución de la agudeza visual y metamorfopsias. Aproximadamente, el 20% de los pacientes desarrolla una membrana neovascular corioidea que podría explicar la disminución severa de la agudeza visual. Es característico de la enfermedad la disminución del índice de Arden (<1.5) en el electrooculograma (EOG) con un ERG generalmente normal. El EOG es un importante marcador en esta enfermedad ya que está alterado incluso en pacientes con fondo de ojo normal o levemente alterado y en algunos casos de portadores de mutaciones en *BEST1* asintomáticos (Querques and Souied 2016; Tsang and Sharma 2018a).

2.1.2.3.3. Distrofias en patrón del EPR

Las **distrofias en patrón del ERP** (ORPHA:63454) son un grupo heterogéneo de maculopatías de herencia autosómica dominante caracterizadas por la acumulación de lipofuscina a nivel de EPR. La edad de inicio es muy variable, pero los pacientes suelen permanecer asintomáticos hasta la edad adulta e incluso toda la vida. El curso de la enfermedad suele ser benigno, aunque a partir de los 70 años más del 50% de los pacientes presentan una grave pérdida de visión, debido a una atrofia del EPR y/o el desarrollo de neovascularización coroidal. La mayoría de los pacientes presentan mutaciones en *PRPH2*, aunque existe heterogeneidad genética. Mutaciones en *PRPH2* pueden producir también RP o distrofia corioidea areolar central, en este contexto, se han descrito casos de portadores de la misma mutación con fenotipo unos de RP y otros de distrofia en patrón, incluso entre miembros de la misma familia. Gass clasificó las distrofias en patrón en función de su aspecto oftalmoscópico, de las cuales

las dos más frecuentes son: i) **distrofia foveomacular viteliforme del adulto** (ORPHA:99000), lesión ovalada subretiniana amarillenta, bilateral y simétrica, con EOG normal; y ii) **distrofia en patrón en alas de mariposa** (ORPHA:99001), pigmentación central en forma de mariposa (Querques and Souied 2016; Boon et al. 2008).

2.1.2.3.4. Otras maculopatías

La **distrofia macular autosómica dominante Stargardt-like** (MIM #600110, ORPHA:99003) es una maculopatía de comienzo precoz relacionada con mutaciones en el gen *ELOVL4*. Se caracteriza por relativamente buena función visual, atrofia macular con o sin *flecks*, mínima discromatopsia y ausencia de cambios significativos en el ERG. Por otra parte, la **distrofia coroidea areolar central** (ORPHA:75377) también llamada coroiditis central senil o angio-esclerosis coroidea, se caracteriza por una gran área de atrofia en el centro de la mácula de bordes bien delimitados sin patrón anular con pérdida o ausencia de fotorreceptores, EPR y coriocapilares, dando lugar a una disminución progresiva de la agudeza visual. Comienza en la cuarta-quinta década de vida con disminución de la agudeza visual y generalmente se relaciona con mutaciones en el gen *PRPH2* (Boon et al. 2008). Por último, la **distrofia macular anular concéntrica benigna** (MIM #153870, ORPHA:251287) se caracteriza por presentar inicialmente buena agudeza visual con hipopigmentación parafoveal, compatible con el patrón angiográfico en ojo de buey. Aunque el término “benigno” fue aplicado por su descubridor, posteriormente se observó que algunos casos evolucionaban a una atrofia macular con afectación de fotorreceptores, disminución de la agudeza visual y discromatopsia.

2.1.3. Distrofias mixtas

Las distrofias retinianas mixtas o distrofias generalizadas de la retina se caracterizan por una degeneración simultánea de bastones y conos. La mayoría de estos casos presenta un deterioro progresivo y severo.

2.1.3.1. Amaurosis congénita de Leber

La **amaurosis congénita de Leber** (ACL, ORPHA:65) está considerada la DHR más grave, ya que los pacientes manifiestan una pérdida visual severa durante el primer año de vida. Afecta aproximadamente a 1 por cada 50.000 individuos, pero representa el 5% de todas las DHR y el 20% de los casos de ceguera infantil (Koenekoop 2004). Clínicamente, la ACL se caracteriza por nictalopía, fotofobia y

nistagmus. Algunos de ellos también presentan el signo oculodigital, que consiste en presionar y frotar los ojos, queratocono y cataratas. Las respuestas fotópicas y escotópicas del electroretinograma (ERG) son, característicamente, no detectables o gravemente reducidas antes del primer año de vida (Franceschetti and Dieterle 1956). El aspecto del fondo de ojo puede variar desde ser normal al inicio de la enfermedad a una retinopatía pigmentaria con atrofia macular.

La ACL solapa clínica y genéticamente con la RP de inicio temprano. Los pacientes que presentan sintomatología al nacimiento o durante el primer año de vida se clasifican como ACL y los que presentan sintomatología entre los 1-5 años se definen como RP de inicio temprano. Hasta la fecha, se han identificado 26 genes causantes de ACL/RP de inicio temprano, la mayoría de herencia autosómica recesiva (RetNet). Entre ellos, los más frecuentes son *GUCY2D* (10-20%) y *CEP290* (15-20%) (Kumaran et al. 2017).

2.1.4. Otras distrofias de retina

En este grupo se han incluido otras DHR que, aunque afectan a la retina, asocian, además, alteraciones de otras estructuras oculares. Algunas de ellas son: coroideremia, retinosquiasis juvenil ligada al X, albinismo ocular y oculocutáneo, atrofia girata y síndrome de Goldmann-Favre. Se destacan las dos enfermedades más frecuentes dentro de este grupo:

2.1.4.1. Coroideremia

La **coroideremia** (MIM #303100, ORPHA:180) es una enfermedad progresiva de herencia ligada al cromosoma X que da lugar a la degeneración de la coroides, el EPR y los fotorreceptores. Tiene una prevalencia de 1:50.000 - 1:100.000 (<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/choroideremia>, noviembre 2019) y está causada por mutaciones en el gen *CHM*. Generalmente afecta a los hombres, aunque también se han descrito casos de degeneración retiniana en mujeres portadoras (Potter et al. 2004). Clínicamente se caracteriza por nictalopía de inicio en la infancia, seguido de disminución concéntrica del campo visual y posterior disminución de la agudeza visual. En general, los pacientes conservan la visión central hasta la década de los 50-60. Típicamente, el fondo de ojo presenta una atrofia coriorretiniana festoneada en la periferia que se extiende hacia la mácula y, en estadios avanzados, la esclerótica se vuelve visible en áreas de atrofia total del EPR y la coroides (Roberts et al. 2002).

2.1.4.2. Retinosquiasis ligada al X

La **retinosquiasis ligada al X** (MIM #312700, ORPHA:792) es una degeneración vitreoretiniana debida a mutaciones en el gen *RS1*, con una prevalencia estimada entre 1:5.000 y 1:25.000 (The Retinoschisis Consortium 1998). Puede manifestarse en la infancia temprana, con nistagmus y pérdida severa de la visión, o durante la edad escolar con disminución de la agudeza visual. El curso de la enfermedad generalmente es estable hasta los 40 años, a partir de entonces, la agudeza visual disminuye progresivamente pudiendo alcanzar la ceguera legal en la sexta o séptima década. El fondo de ojo característico de la retinosquiasis es una maculopatía quística en forma de rueda de carro (esquiasis foveal). Además, se estima que del 5-22% de los individuos afectados puede haber un desprendimiento de retina y entre el 4-40% de los pacientes afectados desarrollan una hemorragia vítrea (Molday, Kellner, and Weber 2012). Las mujeres portadoras generalmente son asintomáticas, aunque se han descrito casos de portadoras con anomalías en el ERG con fondo de ojo normal (Kim et al. 2007).

2.2. DHR sindrómicas

Aproximadamente, el 20-30% de los pacientes con RP presentan formas sindrómicas con anomalías extraoculares y efectos pleiotrópicos, dando lugar a más de 30 síndromes diferentes (Ayuso and Millan 2010). Hay que tener en cuenta que no todas las anomalías extraoculares indican enfermedad sindrómica, estas alteraciones deben coincidir con el gen implicado, y que hay genes que pueden causar RP sindrómica y no sindrómica (ej. *BBS1*, *CLRN1*, *USH2A*).

El **síndrome de Usher** (USH, ORPHA:886) es la forma sindrómica de RP más frecuente, en el que la RP se asocia a hipoacusia neurosensorial y, en ocasiones, a alteración vestibular. Supone aproximadamente el 15-20% de los casos de RP y tiene una prevalencia aproximada de 4:100.000-6:100.000 (Boughman, Vernon, and Shaver 1983; Espinós et al. 1998). Es una enfermedad autosómica recesiva en la que se han identificado más de 13 genes asociados a 3 formas clínicas: tipo 1, tipo 2, tipo 3, diferenciadas según la severidad y progresión de la enfermedad (RetNet, Davenport and Omenn 1977). La forma clínica más frecuente es la USH2 que supone el 50% de los casos con síndrome de Usher (Spandau and Rohrschneider 2002) y dentro de este subtipo, el gen más mutado es el *USH2A*, responsable del 75-90% de los casos (Pieke-Dahl et al. 1996). Además, como ya se ha comentado, *USH2A* es responsable del 10-15% de los casos RP AR (Fahim, Daiger, and Weleber 2000).

La segunda forma sindrómica de DHR más frecuente es el **síndrome de Bardet-Bield** (SBB, ORPHA:110), ya que supone el 5% de las DHR y tiene una prevalencia aproximada de 1:160.000 (Klein and Ammann 1969). En esta enfermedad la distrofia de la retina comienza en la infancia temprana alcanzando la ceguera legal antes de la segunda década de la vida. Se han descrito casos tanto de distrofia de bastones-conos como distrofia de conos-bastones asociados al SBB (Beales et al. 1999). Las características extraoculares principales de este síndrome son: polidactilia, obesidad, hipogonadismo, insuficiencia renal y discapacidad intelectual (Forsythe and Beales 2013). Hasta la fecha, se han identificado 19 genes responsables de esta enfermedad, que suponen el 80% de los casos con SBB. De estos genes, los mutados con mayor frecuencia son *BBS1* (23%) y *BBS10* (20%) (Katsanis 2004)

2.3. Heterogeneidad clínica y genética

Como hemos visto, las DHR son clínicamente muy heterogéneas, ej. la RP es clínicamente diferente a otras DHR, como la distrofia de conos-bastones, las distrofias maculares y enfermedades generalmente no progresivas como la acromatopsia congénita o ceguera nocturna estacionaria. También, un porcentaje no despreciable de pacientes presentan, además de la distrofia de retina, alteraciones extraoculares. Todas estas enfermedades en conjunto solapan parcialmente en cuanto a las características clínicas y/o hallazgos genéticos. Este solapamiento complica el diagnóstico de los pacientes con DHR.

La heterogeneidad clínica de las DHR deriva en un considerable solapamiento entre las distintas entidades clínicas, ya que una enfermedad puede solaparse con otra dependiendo del tipo de fotorreceptor que se encuentre inicialmente afectado y el grado de progresión de la enfermedad en el momento del diagnóstico clínico (Figura I.6).

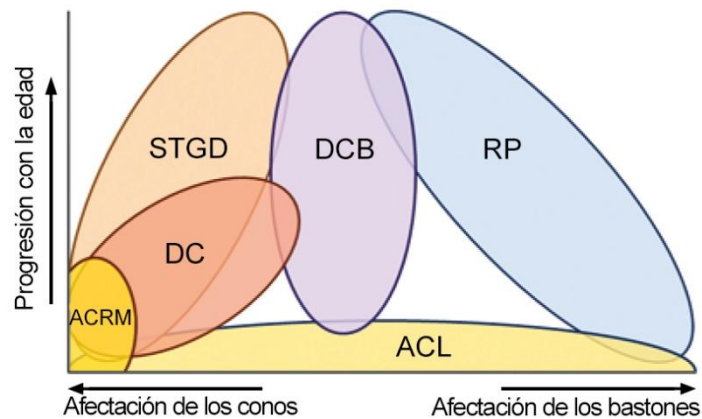


Figura I.6 Solapamiento clínico entre las distintas distrofias de retina. Abreviaciones: ACL: amaurosis congénita de Leber; ACRM: acromatopsia congénita; DC: distrofia de conos; DCB: distrofia de conos-bastones; RP: retinosis pigmentaria; STGD: enfermedad de Stargardt. Modificada de (Den Hollander et al. 2010).

La gran heterogeneidad genética que caracteriza las DHR se ilustra en la cantidad de genes implicados. Hasta la fecha, se han identificado 271 genes relacionados con DHR síndromica y no síndromica (RetNet, <https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm#A-genes> noviembre, 2019), sin embargo, la contribución de cada uno de estos genes a la prevalencia general de la enfermedad es relativamente pequeña, y para muchos de ellos, se han reportado mutaciones patógenas en solo unas pocas familias en todo el mundo. Además, existe una alta heterogeneidad alélica, es decir, mutaciones en un mismo gen pueden dar lugar a distintas entidades clínicas, y variabilidad clínica, es decir, una misma mutación puede presentar diferentes grados de severidad de la enfermedad entre individuos o dar lugar a distintas entidades clínicas, incluso entre miembros de la misma familia (González-Del Pozo et al. 2014). (Figura I.7). Asimismo, en aproximadamente el 30% de los pacientes con DHR, los genes subyacentes aún no se han encontrado (Duncan et al. 2018). Todos estos factores hacen que el diagnóstico genético de las DHR sea muy desafiante.

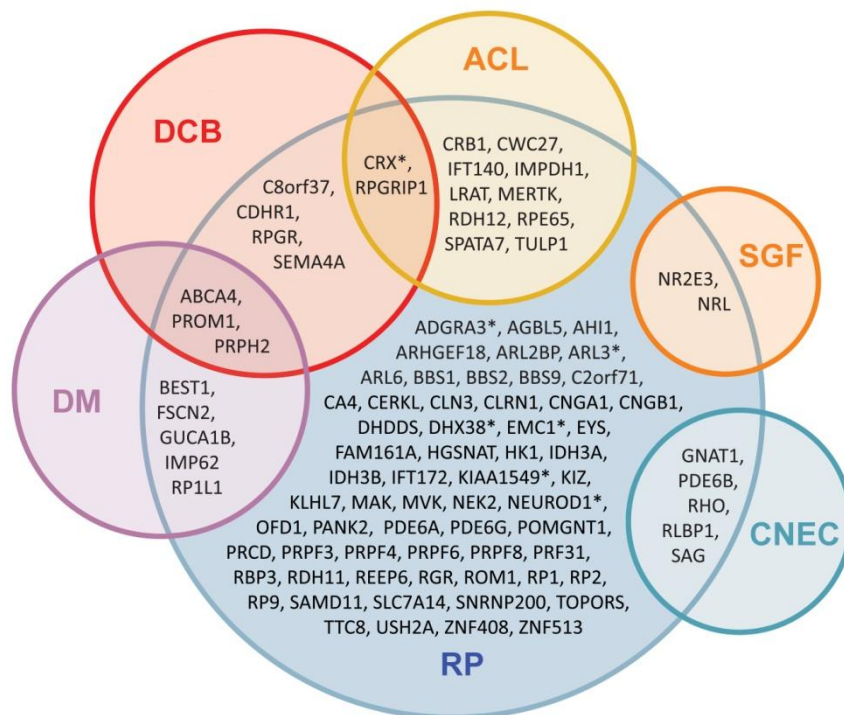
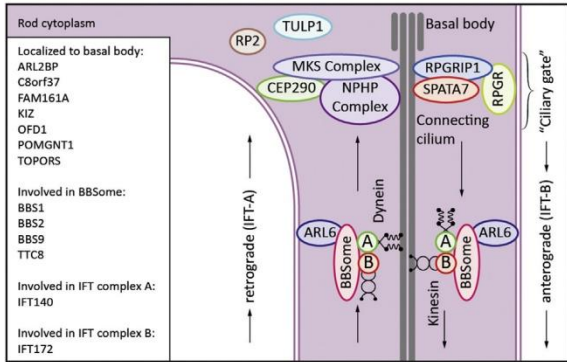


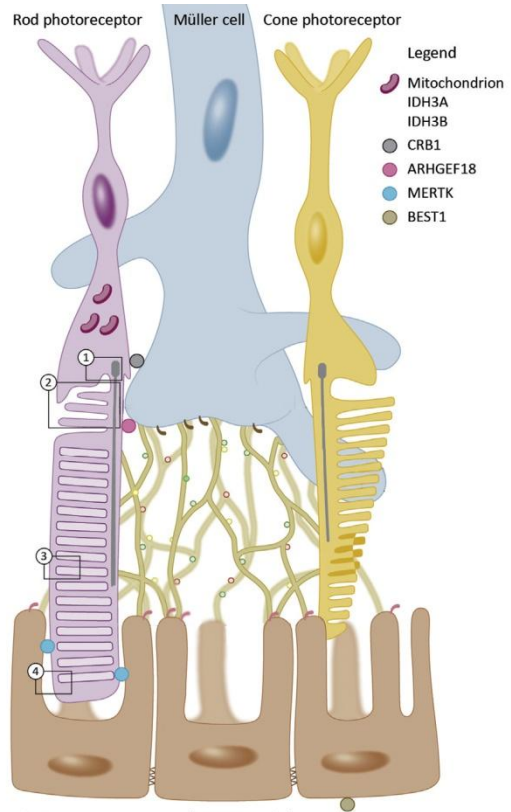
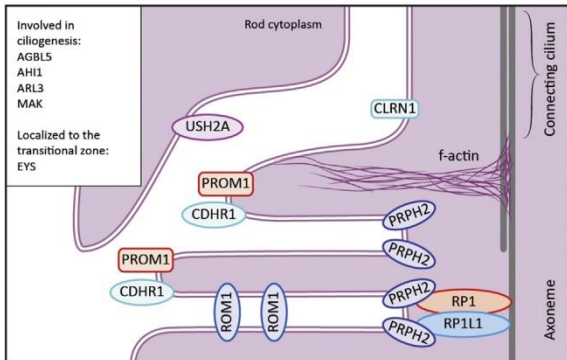
Figura I.7 Representación del solapamiento genético entre la RP y otras DHR. Abreviaciones: ACL: amaurosis congénita de Leber; CNEC: ceguera nocturna estacionaria congénita; DM: distrofia macular; DCB: distrofia de conos-bastones; RP: retinosis pigmentaria; SGF: síndrome de Goldmann Favre. Modificada de (Verbakel et al. 2018).

Cada uno de los genes implicados en estas enfermedades codifica para una proteína que juega un papel en el correcto funcionamiento de la neuroretina y/o el EPR. Las principales vías metabólicas afectadas en las DHR y algunos de los genes implicados en ellas están representados en la Figura I.8.

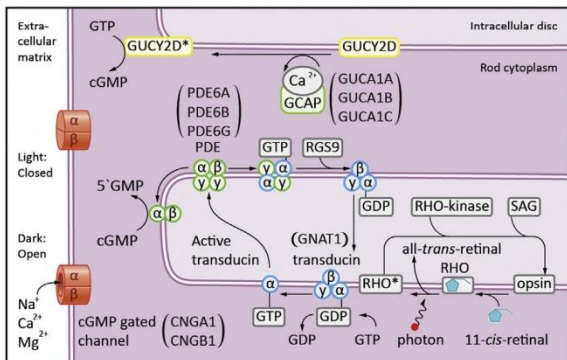
1.- Transporte ciliar en bastones y conos



2.- Estructura ciliar



3.- Fototransducción



4.- Ciclo visual

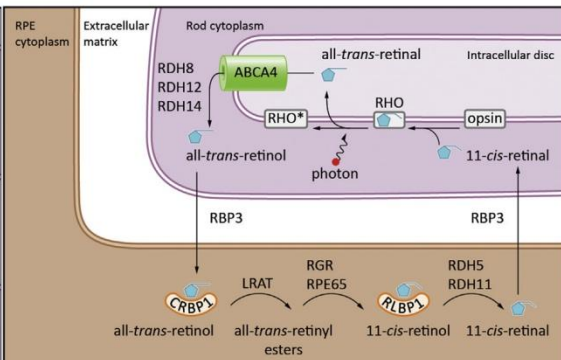


Figura I.8 Representación esquemática de los tres procesos principales que tienen lugar en fotorreceptores y células del EPR. Representación esquemática de los tres procesos principales que tienen lugar en fotorreceptores y células del EPR. (A) El ciclo visual tiene lugar entre los fotorreceptores y el EPR, en él están implicados genes que codifican para las proteínas representadas, como *ABCA4*, *RPE65*, *RBP3* y *RDH5*. (B) La cascada de fototransducción tiene lugar en el segmento externo de los fotorreceptores, y en ella participan *RHO*, *GNTA1*, *CNGA1* y *PDE6A*, entre otros. (C) El transporte ciliar tiene lugar a lo largo del cilio conector, en él están implicados genes como *CEP290*, *RP1*, *RPGR* y *RPGRIP1*. Hay otras proteínas también representadas que forman parte de la estructura del fotorreceptor, como son Usherina (producto de *USH2A*), *EYS*, *PROM1*. Modificada de (Verbakel et al. 2018).

3. DIAGNÓSTICO ELECTROFISIOLÓGICO DE LAS DHR

Para el diagnóstico de las DHR es importante estudiar el paso de la corriente eléctrica generada en los fotorreceptores y transmitida a través del nervio óptico a la corteza visual. En los pacientes, esta medida se realiza a través de pruebas electrofisiológicas, para lo que se recomienda seguir los estándares de la Sociedad Internacional de Electrofisiología Clínica y Visión con el fin de que los resultados pueden ser comparables y reproducibles (McCulloch et al. 2015).

3.1. Potencial evocado visual

El PEV (potencial evocado visual) mide la respuesta eléctrica de la corteza visual ante estímulos luminosos. Desde que un estímulo visual llega al ojo hasta que el cerebro lo procesa pasa un tiempo concreto, del orden de milisegundos. Las variaciones en ese tiempo o en la forma de la respuesta obtenida informan si hay un problema en la vía de comunicación nerviosa entre el ojo y el cerebro. Esta prueba es solo la confirmación del paso de señal luminosa de por la vía visual (Figura I.9). Dependiendo del estímulo hay dos tipos de prueba:

- PEV con estímulo Flash o haz de luz difusa.
- PEV con estímulo Pattern o dámetro reversible (PEVP).

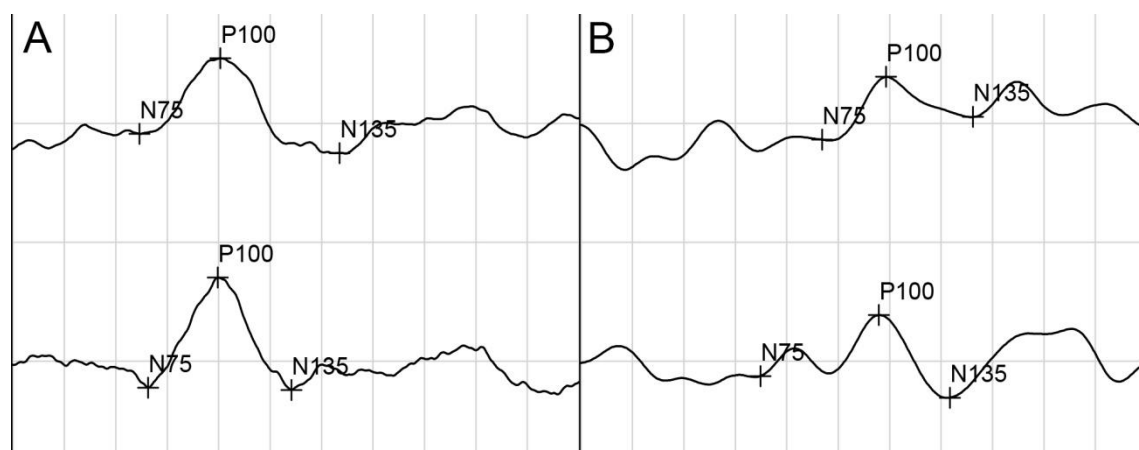


Figura I.9 Potencial evocado visual con estímulo Pattern. (A) De una persona sana, (B) de un paciente con retinosis pigmentaria. Se obtiene una gráfica con tres puntos de inflexión N75, P100 y N145, que indican la polaridad N: negativo, P: positivo y con el número, el tiempo en milisegundos que tarda en aparecer dicho punto.

3.2. Electroretinograma

El electroretinograma (ERG) mide los cambios de potencial eléctrico en la retina tras un estímulo luminoso. Hay distintos tipos de ERG según sea el estimulador (Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica para las Distrofias Hereditarias 2017):

- ERG de campo lleno (Ganzfeld) o campo completo (ERG-G).
- ERG con damero alternante (Pettern) (ERG-P).
- ERG multifocal (ERG-mf).

El **ERG-G** se manifiesta como una onda cuyos componentes representan la respuesta de los fotorreceptores: **onda a negativa** (debido a la hiperpolarización de los fotorreceptores tras el estímulo luminoso) que se origina en los fotorreceptores, seguida de una **onda b positiva** (por la despolarización de las células de la retina interna) que procede de la actividad de células bipolares y de Müller. Sobre la rama ascendente de la onda b veremos unos pequeños picos de onda, los **potenciales oscilatorios**, que reflejan la actividad a nivel de la capa plexiforme interna (Figura I.10). Según las frecuencias de estimulación empleadas y las condiciones de adaptación a luz u oscuridad se obtienen distintas respuestas: i) respuesta de bastones y ii) respuesta mixta: conos y bastones, obtenidas en condiciones escotópicas; iii) potenciales oscilatorios, iv) respuesta de conos y v) respuesta flicker, obtenidas en condiciones fotópicas. El ERG-G permite diferenciar si son principalmente los conos o los bastones los que están alterados.

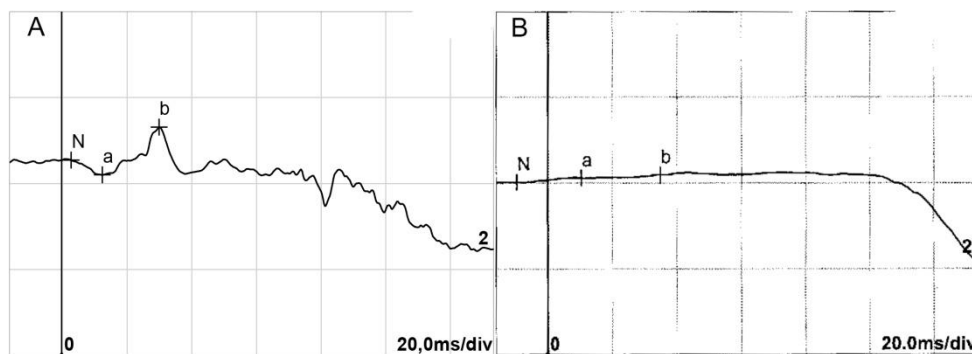


Figura I.10 Electroretinograma de campo completo. (A) De una persona sana y (B) de un paciente con retinosis pigmentaria. Onda a: desde la línea de base hasta el valle; onda b: desde el valle de la onda a hasta el pico de la onda b.

El **ERG-P** es un potencial generado en las células ganglionares como respuesta a un estímulo de damero o barras alternante. Nos informa de la actividad de las células de la retina interna y de la mácula de manera selectiva. Un ERG-P podría estar completamente alterado en un paciente con un ERG-G normal, por lo que se aconseja realizar esta prueba ante la sospecha de una enfermedad macular. La morfología de la

respuesta registrada del ERG-P es una onda negativa a 35 ms (N35), una onda positiva a 50 ms (P50) seguida de un componente alargado a los 95 ms (N95). La onda P50 se origina en las células ganglionares que recogen la respuesta de los conos maculares. La onda N95 tiene su origen en axones de células ganglionares. Si P50 es normal y N95 está abolida lo más probable es que estemos ante una neuropatía óptica que ha producido una pérdida selectiva de células ganglionares. Sin embargo, si el PERG es plano con pérdida también de la P50 es más probable que se trate de un problema macular.

El **ERG-mf** consiste en la estimulación simultánea de diferentes áreas de la retina central, obteniendo un mapa topográfico de la respuesta de los 30-50° centrales (Figura I.11). La morfología de la respuesta es una onda bifásica con un componente negativo inicial (N1) seguido de un pico positivo (P1). A veces, puede verse una segunda onda negativa (N2). Es una respuesta parecida a la onda del ERG-G: la onda N1 está producida por los fotorreceptores y la P1 por las células bipolares. Al tratarse de una prueba topográfica obtenemos la densidad de la respuesta por unidades de superficie retiniana en cada hexágono, expresada en nanovoltios por grado al cuadrado.

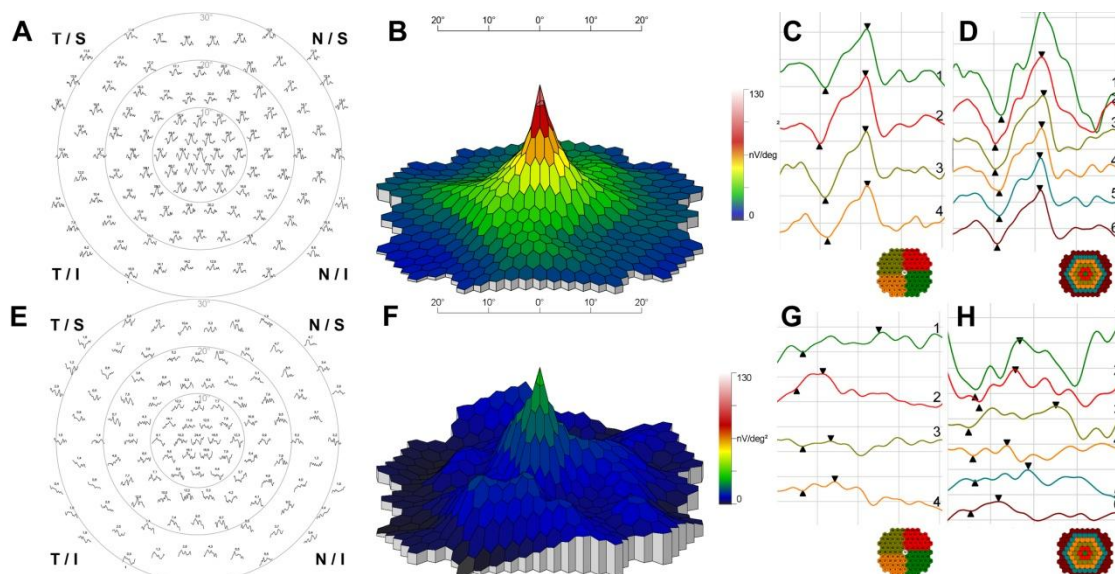


Figura I.11 Electrorretinograma multifocal. De izquierda a derecha: Mapa de ondas, figura tridimensional, densidad de amplitudes por sectores y densidad de amplitudes por anillos de una persona sana (A-D) y de una persona con retinosis pigmentaria (E-H).

3.3. Electrooculograma

En condiciones normales existe una diferencia de potencial entre la córnea y el polo posterior del ojo, conocido como potencial de reposo, que depende, fundamentalmente, del estado funcional del EPR. Su evaluación se obtiene haciendo

un ratio entre el menor valor del potencial de reposo en oscuridad y el máximo en la luz, lo que se conoce como Índice de Arden (mm con luz / mm en oscuridad) cuyo valor de normalidad ≥ 1.5 . Es básicamente útil en la enfermedad de Best, en la que de forma casi patognomónica aparece un electrooculograma (EOG) alterado con ERG-G normal tanto en enfermos como en portadores. En las enfermedades retinianas extensas siempre está alterado junto con el ERG.

4. DIAGNÓSTICO OFTALMOLÓGICO DE LAS DHR

A continuación se describen las pruebas de diagnóstico oftalmológico y seguimiento más habituales de las DHR (Hassenstein and Meyer 2009; García Aguado et al. 2016).

-Anamnesis: es importante anotar todos los datos clínicos actuales del paciente, hábitos, antecedentes personales y familiares.

-Agudeza visual (AV): es la capacidad del sistema visual para diferenciar dos puntos próximos entre sí separados por un ángulo determinado. La medida de la agudeza visual se realiza mediante optotipos de distintos tamaños y situando al observador a una distancia determinada. Las escalas de medida más utilizadas son la decimal, la de Snellen y la logMAR. Una visión normal correspondería a 1,00 (escala decimal), 20/20 (escala de Snellen a 20 pies) y 0,0 (logMAR).

-Test de colores: esta prueba se realiza para verificar la capacidad para distinguir entre diferentes colores. Alguno de los métodos empleados son el test de Ishihara o test de Farnsworth.

-Perimetría o campimetría: se utiliza para valorar el campo visual con el objetivo de examinar la integridad sensorial de la retina y la conductividad de las vías ópticas hasta la corteza occipital (Ver ejemplos en Figura I.12). Se considera ceguera legal un campo visual $<10^\circ$.

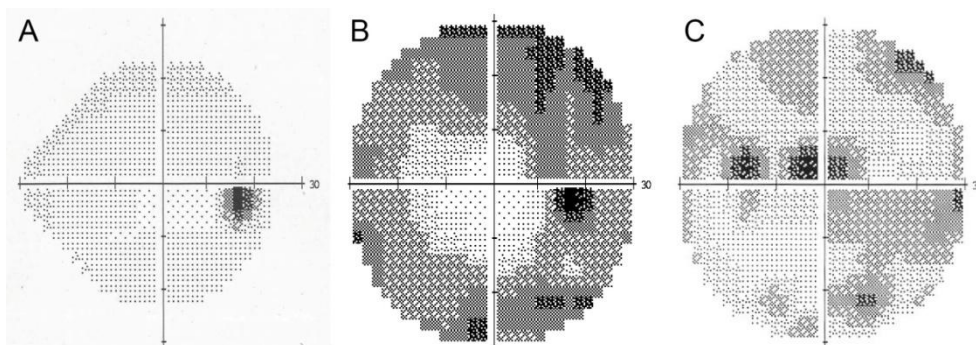


Figura I.12 Campos visuales del ojo derecho. (A) De una persona sana, (B) de un paciente con retinosis pigmentaria y (C) de un paciente con Enfermedad de Stargardt.

-Fondo de ojo (FO): nos permite observar a través de la pupila el interior del globo ocular y valorar la retina, disco óptico, coroides y vasos. Se puede realizar mediante oftalmoscopia, el médico observa la retina usando un instrumento similar a una linterna, o mediante retinografía, prueba sencilla que permite obtener fotos en color de la retina. Es recomendable dilatar previamente la pupila. En una sola captura, la

fotografía convencional de FO cubre un campo visual de 30-50° de la retina (Ver ejemplos en Figura I.13).



Figura I.13 Imágenes de fondo de ojo a color del ojo izquierdo. (A) De una persona sana, (B) de un paciente con retinosis pigmentaria y (C) de un paciente con Enfermedad de Stargardt.

-Autofluorescencia (*fundus autofluorescence*, FAF): permite la visualización de las alteraciones a nivel del EPR. Se basa en la fluorescencia natural que se produce en las capas retinianas al incidir una luz azul. La principal fuente de fluorescencia es la lipofuscina que se acumula en el EPR de manera fisiológica con la edad y de manera patológica en algunas DHR. El patrón topográfico de las intensidades de FAF depende de la acumulación o pérdida de lipofuscina en el EPR (Ver ejemplos en Figura I.14).

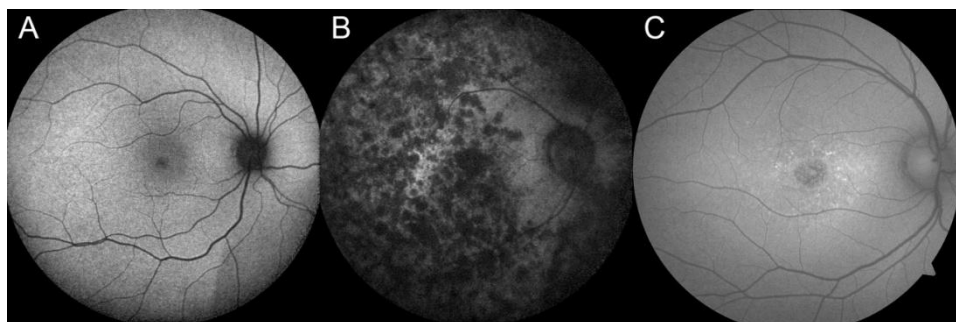


Figura I.14 Imágenes de fondo de ojo con autofluorescencia. (A) De una persona sana, (B) de un paciente con retinosis pigmentaria y (C) de un paciente con Enfermedad de Stargardt.

-Angiofluorescencia (*fluorescein angiography*, FA): permite estudiar el sistema vascular de la coroides y la retina, alteraciones del EPR y la aparición de neovascularización coroidea. Para realizar esta prueba se inyecta al paciente fluoresceína como contraste. Al igual que en la FAF, se emite una luz, pero en este caso de longitud de onda diferente para bloquear la fluorescencia natural de la EPR.

-Tomografía de coherencia óptica (*optical coherence tomography*, OCT): técnica de imagen óptica de alta resolución que permite obtener imágenes de las distintas capas

de la retina y determinar si existe alguna anomalía en su estructura. Actualmente, es la técnica de elección para el diagnóstico de las maculopatías (Ver ejemplos en Figura I.15).

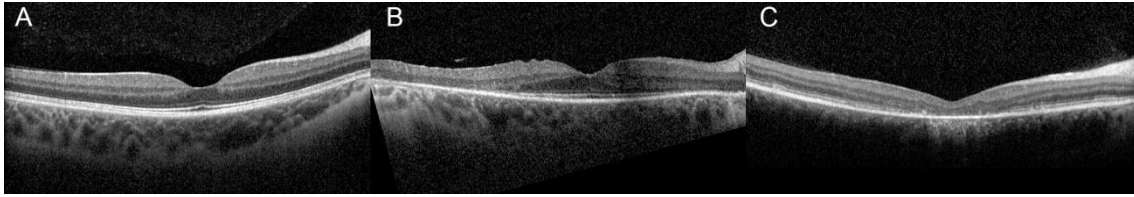


Figura I.15 Imágenes de tomografía de coherencia óptica. (A) De una persona sana, (B) de un paciente con retinosis pigmentaria y (C) de un paciente con Enfermedad de Stargardt.

5. DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE LAS DHR

La secuenciación Sanger ha sido tradicionalmente la técnica empleada para llevar a cabo el diagnóstico genético de las DHR. Según la sospecha clínica y el modo de herencia, se priorizaban secuencialmente aquellos genes con mayor prevalencia. Sin embargo, esta técnica requiere una gran inversión de tiempo y dinero, dada la elevada heterogeneidad genética y solapamiento clínico de estas enfermedades.

En la última década, se ha desarrollado una nueva técnica de secuenciación conocida como secuenciación de nueva generación (*Next generation sequencing*, NGS), también llamada secuenciación masiva, ya que es capaz de secuenciar paralelamente millones de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) en un único proceso de secuenciación, reduciendo así tiempo y costes (Metzker 2010). Hay diferentes plataformas de secuenciación procedentes de varias compañías, entre ellas Life Technologies (ej. Ion Torrent PGM, SOLiD 5500xl) e Illumina (ej. HiSeq, MiSeq, NextSeq), cada una con distintos mecanismos químicos de secuenciación (ej. detección de protones, detección de fluoróforos), ratios de falsos positivos, capacidad de análisis, longitud de lecturas y formas de obtención de la imagen (Neveling et al. 2013).

Estos estudios plantean otros problemas, como el almacenamiento de datos, el análisis bioinformático de las secuencias, la correcta interpretación de las variantes obtenidas, los hallazgos inesperados y el abordaje ético-legal. A pesar de ello, el conocimiento generado por la NGS y su aplicación en la clínica ha supuesto un gran avance en el abordaje diagnóstico de las DHR.

En función de la región del genoma que se quiera estudiar se pueden diferenciar tres tipos de aproximaciones disponibles (Tsang and Sharma 2018b):

-Secuenciación dirigida o panel de genes. La secuenciación de un gran número de genes o regiones concretas del genoma suele utilizarse para diagnosticar una determinada enfermedad o un número limitado de éstas. Al ser un diseño personalizado, tiene la ventaja de, además de incluir las regiones exónicas, poder incluir regiones no exónicas en las que previamente se han descrito mutaciones causantes de enfermedad. Actualmente, es la opción más empleada para el diagnóstico de enfermedades hereditarias ya que su tamaño relativamente pequeño permite disminuir el coste por muestra secuenciada, facilita el posterior análisis y almacenamiento de los datos y reduce las implicaciones éticas al disminuir notablemente el número de hallazgos inesperados (Consugar et al. 2015). Sin

embargo, hay que tener en cuenta que analizar un número tan concreto de genes tiene la necesidad de una actualización periódica de los genes incluidos y requiere de un diagnóstico clínico previo lo más certero posible. Además, el panel de genes es poco específico en regiones repetitivas del genoma y en la detección de variantes estructurales (translocaciones, inversiones, deleciones y duplicaciones) (Stone et al. 2017). Actualmente, la tasa diagnóstica de las DHR mediante esta aproximación es 50-70% (Bernardis et al. 2016; Bravo-Gil et al. 2016; Birtel et al. 2018).

-Secuenciación del exoma completo (*whole exome sequencing*, WES). El exoma es la región codificante del genoma que supone aproximadamente el 2% del genoma de un individuo y contiene alrededor del 85% de las mutaciones causantes de patología (Ayuso, Millán, and Dal-Ré 2013). También presenta un alto impacto en el diagnóstico molecular de las enfermedades hereditarias y, actualmente, suele ser la aproximación de elección para la búsqueda de nuevos genes causantes de enfermedad. Sin embargo, la WES es más cara que el panel de genes y tiene mayor dificultad que éste en la detección de mutaciones en las regiones repetitivas y variantes estructurales (Fromer and Purcell 2014; X.-F. Huang et al. 2015). Además, al no ser un diseño personalizado, no permite analizar regiones no exónicas de interés para una enfermedad concreta. A pesar de que la mayoría de las mutaciones están en regiones codificantes del genoma, se cree que un elevado porcentaje de casos que quedan sin resolver tras la WES pueden ser portadores de una mutación en regiones no codificantes (Carss et al. 2017). Hasta la fecha, la WES ofrece un diagnóstico molecular en el 50-70% de los casos con DHR (Xu et al. 2014; Haer-Wigman et al. 2017; Riera et al. 2017).

-Secuenciación del genoma completo (*whole genome sequencing*, WGS). La WGS nos permite obtener las variaciones tanto de la región codificante como las regiones no codificantes. Tiene mayor exactitud en la detección de variantes estructurales que la WES y es importante en la detección de mutaciones en regiones repetitivas y variantes no codificantes en regiones reguladoras (Suzuki et al. 2014). Sin embargo, debido a la enorme variación del *background* genético en las regiones no codificantes y el actual desconocimiento sobre la función de la mayoría de secuencias no exónicas, las variantes patogénicas de un solo nucleótido quedan camufladas entre las aproximadamente 4 millones de variantes que podemos encontrar a la hora de secuenciar un genoma. Al menos que nuestro análisis vaya dirigido a 1 o 2 genes (por ejemplo, pacientes con un solo alelo mutado en enfermedades AR) y podamos realizar algún estudio funcional que nos permita validar los resultados (Braun et al. 2013; Small et al. 2016). Por tanto, debido a la complejidad del procesamiento de datos, al alto

coste y las implicaciones ético-legales, la WGS no es, por ahora, el método de elección para el diagnóstico genético de las DHR, sin embargo, sí es una potente herramienta que nos permitiría completar el diagnóstico molecular de aquellos casos no resueltos por las estrategias anteriores.

Como ya se ha comentado, una de las principales limitaciones de la NGS es el análisis, interpretación y procesamiento de datos. Por ello se requiere de distintas herramientas bioinformáticas que nos permitan realizar un control de calidad de la secuenciación, alineamiento de las lecturas frente al genoma de referencia, identificación de las variantes y anotación de las mismas. Gracias a la NGS, se han desarrollado diversos proyectos de secuenciación del exoma o genoma humano (1000 genomas, Exome Variant Server, Exome Aggregation Consortium) que nos dan información sobre la frecuencia alélica de una variante en la población, lo que nos permite hacer una priorización de las variantes identificadas en nuestro paciente a estudio. Una vez seleccionadas las variantes candidatas, se recomienda seguir las guías de interpretación clínica para identificar la variante o variantes causantes de la enfermedad (Richards et al. 2015).

Debido a la falta de estandarización, sobre todo en el campo de la clínica, hace que hoy en día siga siendo necesaria la validación de las variantes identificadas mediante secuenciación Sanger y el empleo de MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*) o array de CGH (*Comparative Genomic Hybridization array*) para la validación de CNV (*Copy Number Variants*).

Un resultado positivo puede mejorar, confirmar o reclasificar el diagnóstico clínico y el pronóstico de la enfermedad, guiar a la familia con respecto al riesgo de recurrencia de la misma y cribar pacientes como sujetos para ensayos clínicos.

Mutaciones en genes concretos nos alertan de la necesidad de un seguimiento del paciente más exhaustivo, por ejemplo: i) la anticipación a otras alteraciones (formas sindrómicas) o su descarte; ii) medidas preventivas como evitar la ingesta de suplementos de vitamina A en pacientes con mutaciones en *ABCA4*; o iii) pacientes con síndrome de Usher podrían beneficiarse de un implante coclear (Tsang and Sharma 2018b).

5.1. Estudio funcional de las mutaciones que afectan al *splicing*

El *splicing* es parte del proceso de maduración del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que tiene lugar en el núcleo de las células eucariotas, entre los procesos de

transcripción del ADN a ARN y su posterior traducción a proteína. Este mecanismo celular consiste en la eliminación de los intrones del pre-ARNm (precursor de ARN mensajero) y unión de los exones, dando lugar a la molécula de ARN maduro, que una vez en el citoplasma se traducirá dando lugar a la proteína. Dependiendo de la localización del tejido y / o etapa de desarrollo, los transcritos de pre-ARNm pueden ser procesados de diferentes maneras, lo que permite construir varios transcritos y, por lo tanto, diferentes proteínas para ser sintetizadas a partir del mismo gen. Este proceso se llama *splicing* alternativo y se estima que más del 70% de los genes codificantes humanos son procesados mediante este mecanismo (Maniatis and Tasic 2002).

El *splicing* se lleva a cabo mediante un complejo dinámico ARN-proteína conocido como espliceosoma, formado por 5 unidades de ribonucleoproteína o snRNP (*small nuclear ribonucleoproteins*): U1 y U2, las cuales tienen la función de reconocer los puntos de corte y unión, y U4/U6/U5, que son el *core* catalítico, el cual tiene la función de corte y unión (Figura I.16). El espliceosoma reconoce en la secuencia de pre-ARNm secuencias específicas que definen los límites exón/intrón y otros elementos necesarios para llevar a cabo el proceso. Estas secuencias son el sitio aceptor o 3' *splice site* (3'ss) y el sitio donador o 5' *splice site* (5'ss), que consisten en una secuencia de bases determinada en los extremos 5' y 3' de los intrones que determinan el punto de corte, y el *branch point*, que es una secuencia intrónica localizada a una distancia de 20-50 pb del sitio de *splicing* 3', donde se une la snRNP U2 del espliceosoma. Los sitios de reconocimiento del espliceosoma son críticos para que se dé el proceso de *splicing* de manera correcta (Taneri, Asilmaz, and Gaasterland 2012; Lee and Rio 2015). Además de estas secuencias intrónicas, en el procesamiento de ARNm también pueden intervenir otras secuencias reguladoras que actúan tanto a nivel de intrón como exón, conocidas como elementos reguladores del *splicing* o SER (*splicing regulatory elements*). Se diferencian en intrónicas o exónicas y si potencian o inhiben la inclusión del exón (*exonic splicing enhancers*, ESE; *exonic splicing silencers*, ESS; *intronic splicing enhancers*, ISE; *intronic splicing silencers*, ISS) (Figura I.17).

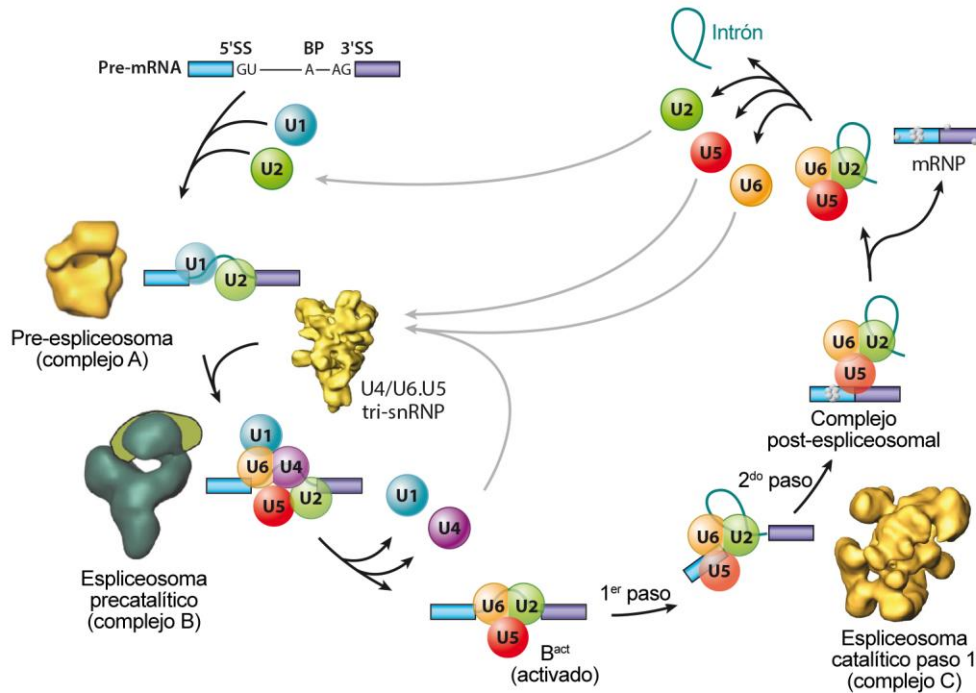


Figura I.16 Ciclo de acoplamiento y desacoplamiento del espliceosoma. La imagen representa la interacción gradual de las cinco unidades de snRNP (círculos de colores) en la eliminación de un intrón de un pre-ARNm (*pre-mRNA*) que contiene dos exones (azul y morado). Abreviaturas: SS (*splice site*), BP (*branch point*). Modificada de (Lee and Rio 2015).

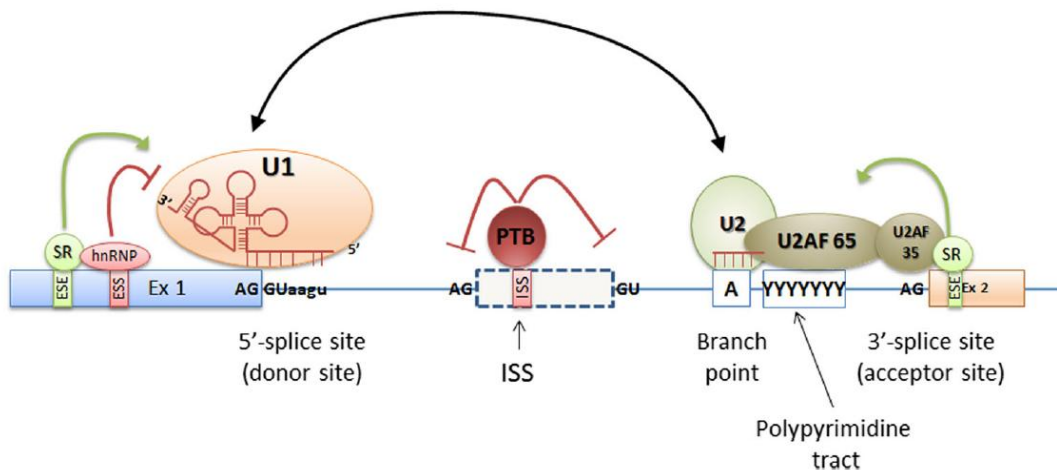


Figura I.17 Localización esquemática de los elementos de *splicing cis* y trans. Los elementos *cis* son las secuencias de ADN que incluyen los sitios de *splicing* donador (5') y aceptor (3'), *branch point* y secuencia de polipirimidinas, y silenciadores y potenciadores de *splicing*. Los sitios donador y aceptor están conservados evolutivamente y generalmente están definidos por los nucleótidos GT y AG en los extremos 5' y 3' del intrón, respectivamente. El sitio *branch point* y la secuencia de polipirimidina están altamente degeneradas y junto con los sitios donador y aceptor son reconocidos por los elementos del complejo de *splicing* llamado espliceosoma. Las proteínas del espliceosoma junto con los represores y activadores de empalme reconocen los elementos de *splicing cis* y se denominan elementos de *splicing trans*. Modificada de (Anna and Monika 2018).

Es importante conocer cómo se regula el *splicing*, ya que se estima que las variantes genéticas que causan un *splicing* aberrante podrían representar hasta el 50% de todas las mutaciones que dan lugar a una disfunción del gen (Cartegni, Chew, and Krainer 2002). Las variantes que alteran los 5'ss o 3'ss pueden dar lugar a distintos eventos, aislados o combinados, como: la pérdida del sitio natural aceptor/donador, la creación de un nuevo sitio aceptor/donador o la activación de un sitio críptico de *splicing*. Como consecuencia de estos eventos podríamos observar un salto de exón (*exon skipping*), la delección parcial de un exón o la retención del intrón en el ARN maduro. Otros mecanismos que también podrían alterar el *splicing* son la ruptura de las secuencias potenciadoras (ESEs/ISEs) o la creación de secuencias inhibitoras (ESSs/ISSs) (Figura I.17). El resultado final sería una proteína truncada por un nuevo codón de parada prematuro o una proteína disfuncional por la ausencia de algún dominio importante (Fraile-Bethencourt et al. 2019).

En pacientes afectados de DHR no solo se han descrito mutaciones en las secuencias canónicas de *splicing*: AG-aceptor (-1, -2) y GT-donor (+1, +2) (Fuster-García et al. 2018), sino también en secuencias no canónicas, consideradas como el primer y los 3 últimos nucleótidos de un exón, así como los nucleótidos de -3 a -14 y de +3 a +6 (Sangermano et al. 2018; Fadaie et al. 2019). De hecho, se estima que la prevalencia de variantes de *splicing* en sitios no canónicos en pacientes con DHR es del 3,5% (Soens et al. 2017). Ejemplo de ello son las mutaciones recientemente identificadas: c.1299+5_1299+8del en *EYS* y c.1921-9C>G en *PDE6B* (Pierrache et al. 2019; Tatour et al. 2019). También son causante de patologías las mutaciones en regiones exónicas no cercanas a los sitios de *splicing* 3' y 5', ej. la mutación sinónima c.102C>T p.Gly34Gly en *BEST1* (Davidson et al. 2010), o mutaciones intrónicas profundas, ej. 1055+706A>G en *OFD1*, c.8845+628C>T en *USH2A* (Webb et al. 2012; Liquori et al. 2016).

Es difícil predecir el efecto que las variantes tienen sobre el *splicing*. Para ello, existen diferentes algoritmos bioinformáticos que pueden ayudarnos: HSF y MaxEnt, incluidos en Human splicing finder 3.1, (<http://www.umd.be/HSF/index.html>) (Desmet et al. 2009), GeneSplicer (http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml) (Perteau 2001), NNSPLICE (https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) (Reese et al. 1997) y el predictor de nueva generación spliceAI (<https://mobidetails.iurc.montp.inserm.fr/MD/>) (Jaganathan et al. 2019), entre otros. Sin embargo, estos algoritmos no dejan de ser predictores y se requiere de otros métodos para confirmar el efecto de las variantes a estudio sobre el *splicing*. Lo ideal sería estudiar directamente el ARN del paciente. Sin

embargo, la mayoría de genes implicados en las DHR solo se expresan en la retina u otros tejidos también de difícil acceso, lo que dificulta su estudio.

Por tanto, para el estudio del efecto de estas variantes se recurre a ensayos *in vitro* como los minigenes (Bauwens et al. 2019). La verificación experimental con minigenes es esencial para fines diagnósticos, así como para revelar los mecanismos de la enfermedad y diseñar intervenciones terapéuticas. Los minigenes son vectores informadores de *splicing* que permiten confirmar el efecto de las mutaciones en el procesamiento del ARNm, indicado cuando las muestras de pacientes para estudios de ARN no están disponibles. El vector contiene dos exones constitutivos entre los que vamos a incluir nuestra secuencia con la mutación a estudiar. El exón portador de la mutación a estudio se clona junto con su secuencia intrónica flanqueante, tanto en su versión de secuencia tipo mutante como la secuencia *wildtype*. Las construcciones resultantes se transfectan en líneas celulares establecidas, se analiza el patrón de *splicing* del vector y se compara el alelo *wildtype* con el mutante. En condiciones ideales, el minigen de tipo *wildtype* da como resultado una inclusión correcta del exón, mientras que la construcción mutante da como resultado el salto u omisión del exón, u otros resultados aberrantes (Cooper 2005; Aparisi et al. 2013) (Figura I.18).

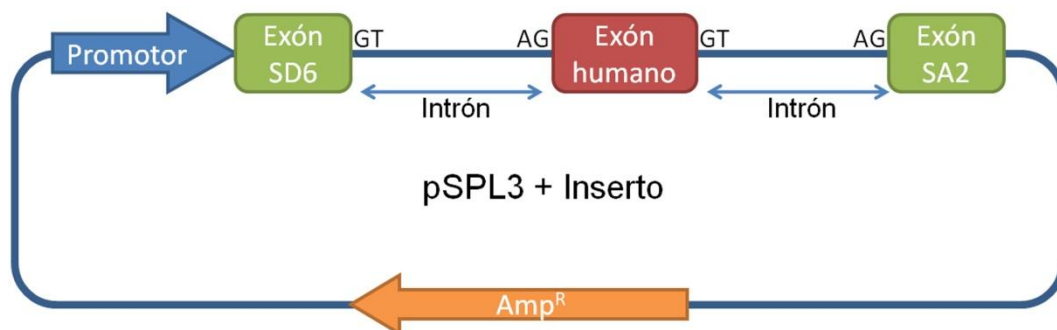


Figura I.18 Esquema de un minigen.

6. APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS DE LAS DHR

Actualmente, las DHR no tienen tratamiento que revierta la pérdida visual o frene la degeneración de la retina. Sin embargo, el ojo es un órgano privilegiado debido a sus características anatómicas (fácil accesibilidad, barrera hematorretiniana) que hace que el desarrollo de terapias para las DHR sea muy prometedor. Se están desarrollando diferentes aproximaciones terapéuticas, pero la indicación de cada una de ellas dependerá del estado de degeneración en el que se encuentre la retina en el momento de su aplicación. A continuación, se describen las aproximaciones terapéuticas más relevantes ordenadas según el momento de su aplicación, de estadios más tempranos de la enfermedad a más tardíos (Figura I.19).

-Terapia farmacológica. Está enfocada a reducir el estrés oxidativo y los procesos inflamatorios derivados de la apoptosis de las células del EPR y fotorreceptores. Este tipo de terapia estaría indicada solamente para aquellos casos que conserven parte de los fotorreceptores de la retina y es independiente del genotipo que pueda tener el paciente. Se han llevado a cabo estudios con vitamina A, ácidos grasos poliinsaturados (ácido docosahexaenoico, DHA), ácido valproico, derivados de prostaglandinas o factores neurotróficos (Hoffman et al. 2004; Rotenstreich et al. 2013).

-Terapia génica. Está limitada a aquellos pacientes en los que se conoce la causa genética de la enfermedad y requiere de la presencia de las células a las que va dirigido el tratamiento, normalmente fotorreceptores o células del EPR. La finalidad de esta aproximación es restaurar la expresión *wildtype* del gen mutado, para lo que se pueden emplear distintas estrategias:

- Suplementación génica: consiste en introducir una copia de ADNc correspondiente al gen mutado en las células diana del paciente mediante inyección intravítrea o subretiniana. Para llevar a cabo este proceso se utilizan adenovirus y diferentes tipos de nanopartículas. En 2008, se publicaron los primeros estudios realizados en pacientes con ACL y RP de inicio temprano con mutaciones en el gen *RPE65* basados en terapia génica, y en diciembre de 2017, la *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó por primera vez el uso de la terapia génica en estos pacientes (Bainbridge et al. 2008; Hauswirth et al. 2008; Maguire et al. 2008). Estudios similares se están llevando a cabo para otras DHR como coroideremia (MacLaren et al. 2014), RP asociado a *MERTK*

(Ghazi et al. 2016), acromatopsia, RP asociado a *RPGR*, retinosquiasis y STGD (ver <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>).

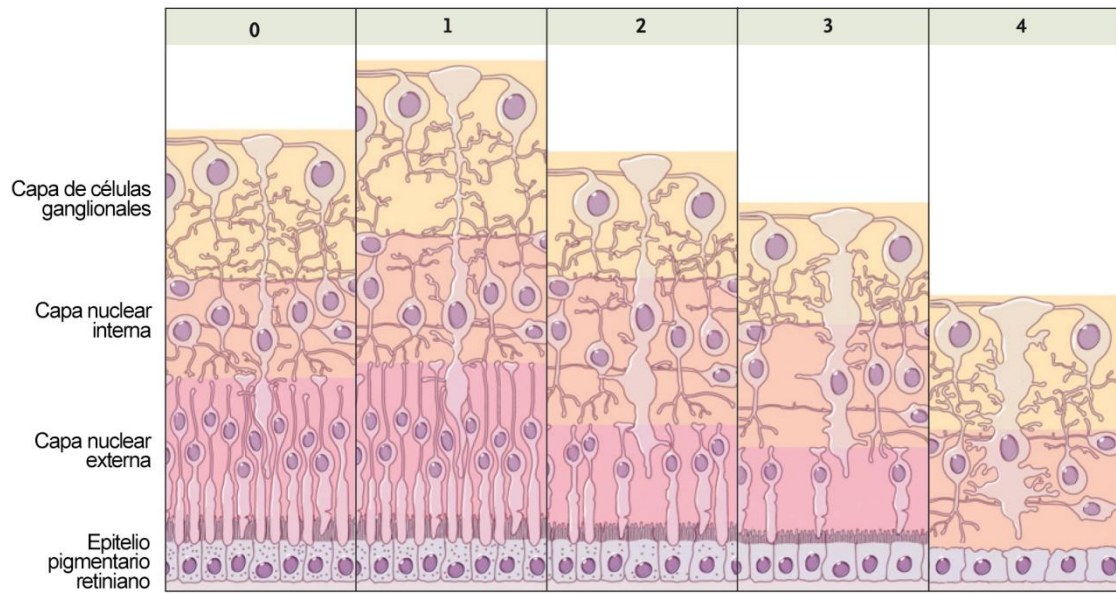
- **Edición génica.** Actualmente, la técnica de edición génica más empleada es el sistema CRISPR (*Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeat*) asociado a distintos tipos de nucleasas. Esta técnica se ha empleado en el tratamiento *ex vivo* de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs de inglés, *induced pluripotent stem cells*) derivadas de pacientes con distintos tipos de DHR e, *in vivo*, en modelos murinos de RP (Bassuk et al. 2016; Bakondi et al. 2016; W.-H. Wu et al. 2016). Aunque todavía el sistema CRISPR no está optimizado, se espera que tenga un alto impacto en el campo de las DHR.
- **Oligonucleótidos antisentido (AON,** del inglés *antisense oligonucleotides*). Como se ha comentado, la presencia de mutaciones que afectan al *splicing* dan lugar a un ARNm aberrante pudiendo causar enfermedad. La aproximación terapéutica emergente más prometedora para este tipo de mutaciones son los AON, que consisten en pequeñas moléculas de ARN o ADN diseñadas contra la mutación. Mediante el bloqueo de los sitios de reconocimiento de *splicing*, los AON podrían recuperar el *splicing* normal y obtener una proteína funcional. Los primeros estudios de AON en DHR fueron dirigidos a la mutación c.2991+1655A>G en el gen *CEP290* que activa un sitio crítico de *splicing* e introduce un pseudoexón con codón de parada prematura en el mRNA (R. W. Collin et al. 2012; Gerard et al. 2012). Esta aproximación terapéutica ha demostrado eficacia en modelos celulares y murinos portadores de dicha mutación (Parfitt et al. 2016a; Garanto et al. 2016). El primer ensayo clínico en fase I/II con AON en pacientes portadores de la mutación intrónica profunda en *CEP290* ha demostrado que es seguro y que mejora la visión (Cideciyan et al. 2019).

-Terapia celular. Está basada en la administración en el vítreo o espacio subretiniano de células progenitoras retinianas (*retinal progenitor cells*, RPCs) o células madre no derivadas del ojo como células madre embrionarias (*embryonic stem cells*, ESCs), iPSCs o células madre mesenquimales (*mesenchymal stromal cells*, MSCs). Cada uno de estos tipos celulares tiene sus ventajas e inconvenientes (Tang et al. 2017). Esta aproximación terapéutica podría tener un papel importante en la restauración visual reemplazando las células retinianas degeneradas y/o rescatando las células restantes. Actualmente, se están llevando a cabo varios ensayos clínicos en fase I/II utilizando RPCs y ESCs en pacientes con DHR para evaluar la seguridad *in vivo*, supervivencia a largo plazo y función del injerto (ver <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>). También se

llevó a cabo un estudio piloto ([UMIN000011929](#)) con iPSCs diferenciadas a células del EPR procedentes de fibroblastos de una paciente con degeneración macular asociada a la edad (Kamao et al. 2014). Un año después de la cirugía, el injerto permaneció intacto y la agudeza visual de la paciente no había cambiado. Sin embargo, detectaron varias mutaciones en las iPSCs que no identificaron en los fibroblastos originales por lo que suspendieron el ensayo (Garber 2015; Mandai et al. 2017). Aunque la eficacia y eficiencia de la terapia basada en células progenitoras para las DHR está generalmente restringida por la baja tasa de proliferación y /o diferenciación *in vitro* y la pobre supervivencia celular, migración, integración y función *in vivo*, representa una futura aproximación prometedora para pacientes con DHR avanzada.

-Optogenética. Consiste en la expresión transgénica de canales iónicos sensibles a la luz en la membrana de las células neuronales que forman las capas internas de la retina, restaurando la fotosensibilidad. Se han llevado a cabo varios estudios pre-clínicos en modelos murinos de RP y canino de ACL (Thyagarajan et al. 2010; Busskamp et al. 2010; Ameline et al. 2017). En 2015 se inició el primer ensayo clínico en fase I/II basado en optogenética para pacientes con RP avanzada ([NCT02556736](#)), del cual todavía no hay resultados publicados.

-Implantes retinianos electrónicos. Están indicados para pacientes en un estadio final de la enfermedad con mínima o nula percepción de luz. Se basan en la estimulación de las capas internas de la retina mediante fotosensores artificiales, por lo que requiere que éstas estén conservadas. Actualmente, hay dos implantes diferentes aprobados por la FDA: Argus II (Second Sight Medical Products, Sylmar, California) y Alpha AMS (Retina Implant AG, Alemania) (da Cruz et al. 2016; Stingl et al. 2017).



Posibilidades terapéuticas

Terapia farmacológica	✓	✓	✓	✓	
Terapia génica	✓	✓	✓	✓	
Terapia celular				✓	✓
Optogenética				✓	✓
Implantes retinianos electrónicos				✓	✓

Figura I.19 Posibilidades terapéuticas para los diferentes estadios de la retinosis pigmentaria. Los cambios en la arquitectura retiniana durante la progresión de la RP podrían dividirse en cinco estadios. El estadio 0 representa la arquitectura normal de la retina. El estadio 1 representa la anomalía detectable más temprana: un engrosamiento de la retina con organización de las capas y función normal. En los estadios 2 y 3 la enfermedad se vuelve clínicamente evidente con la pérdida del núcleo del fotorreceptor, acortamiento del segmento interno y externo del fotorreceptor y despigmentación del EPR. El estadio 4 es el más avanzado de la enfermedad y se caracteriza por un adelgazamiento de la retina, en la que hay muerte celular neuronal importante y pérdida de la arquitectura laminar. Las cinco categorías de las posibles aproximaciones terapéuticas actuales se enumeran en la tabla, con marcas de verificación indicando las etapas de la enfermedad durante las cuales pueden ser más aplicables. Modificada de (Jacobson and Cideciyan 2010).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

- 1- Las DHR presentan un gran solapamiento clínico. Sin embargo, tanto las técnicas de diagnóstico oftalmológico como las de diagnóstico molecular han avanzado enormemente en los últimos años, permitiendo que, actualmente, los pacientes puedan tener un diagnóstico clínico y genético más preciso. Por ello, llevar a cabo un estudio de las DHR no sindrómicas en su conjunto, permitiría obtener una mayor eficacia diagnóstica en comparación con las estrategias empleadas anteriormente, dirigidas a una entidad clínica o un número reducido de genes.
- 2- El número de genes que se considere analizar mediante técnicas de NGS para una determinada enfermedad, es directamente proporcional al coste e inversión de tiempo en el análisis e interpretación de datos. Aunque las DHR se caracterizan por presentar una alta heterogeneidad genética con más de 250 genes asociados hasta la fecha, muchas mutaciones en estos genes son privadas de una sola familia. Por ello, un panel de genes priorizando aquéllos más frecuentemente mutados podría abaratar y facilitar el análisis sin comprometer su rendimiento diagnóstico.
- 3- La aplicación del panel de genes a una cohorte de pacientes permitiría confirmar el diagnóstico clínico preliminar, realizar un correcto asesoramiento genético-reproductivo, posibilitar el acceso de estos pacientes a futuros ensayos clínicos basados en terapia génica e identificar familias susceptibles de analizar mediante WES y/o WGS para descubrir nuevos genes implicados en DHR.
- 4- Se estima que más de un tercio de las mutaciones identificadas en los pacientes con DHR se clasifican como *significado clínico desconocido*. Por ello, llevar a cabo estudios funcionales que demuestren el papel de estas mutaciones en la enfermedad nos permitiría alcanzar un diagnóstico más certero y profundizar sobre la fisiopatología de las DHR.

2. OBJETIVOS

- 1- Diseñar, validar e implementar en la práctica clínica una estrategia de secuenciación masiva basada en un panel de genes, previamente identificados, para el diagnóstico genético de las DHR no sindrómicas.
- 2- Establecer correlaciones fenotipo-genotipo y crear una base de datos clínico-genética para la inclusión de pacientes en futuros ensayos clínicos.
- 3- Identificar familias candidatas para su estudio del exoma o genoma completo, con la finalidad de identificar nuevos genes implicados en DHR.
- 4- Evaluar la patogenicidad de las nuevas variantes identificadas mediante estudios de co-segregación, poblacionales, bioinformáticos y, si es posible, ensayos funcionales.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. SUJETOS DEL ESTUDIO

Se han incluido un total de 208 pacientes, procedentes de 124 familias no relacionadas, diagnosticados clínicamente de distrofia hereditaria de retina no sindrómica (DHR-NS) y de los que se desconocía la causa genética de la enfermedad (Tabla III.1). También se han incluido 8 pacientes con DHR-NS, en los que previamente se había identificado la mutación causante, como controles para la validación del panel (Tabla III.2), y un total de 261 familiares para el estudio de segregación familiar. Los pacientes proceden sobre todo de la asociación de pacientes “Retina Comunidad Valenciana” (<http://www.retinacv.es/>) y del departamento de salud Valencia La Fe. Todos los individuos son de origen español excepto dos familias que proceden de Venezuela (fRPN-216 y fRPN-217) y una procedente de Rumanía (fRPN-206).

Tabla III.1 Clasificación clínica de los pacientes incluidos en el estudio.

	n	Esporádicos	AR	AD	LX
Retinosis pigmentaria	72	33	17	19	3
Amaurosis congénita de Leber	6	5	1	-	-
Fundus albipunctatus	1	1	-	-	-
Distrofia de conos y bastones	8	7	1	-	-
Acromatopsia congénita	1	-	1	-	-
Enfermedad de Stargardt	21	17	4	-	-
Distrofia macular STGD-like	3	-	-	3	-
Distrofia coroidea areolar central	1	-	1	-	-
Distrofia coroidea anular concéntrica benigna	1	1	-	-	-
Enfermedad de Best	7	5	1	1	-
Distrofia foveomacular viteliforme del adulto	2	1	-	1	-
Distrofia en patrón del EPR	1	1	-	-	-
Total	124	71	26	24	3

Abreviaturas: AD: autosómico dominante, AR: autosómico recesivo, LX: ligado al cromosoma X, n: número total de casos no relacionados.

Tabla III.2 Mutaciones de los pacientes control.

ID paciente	Gen	Tipo heren.	Alelo 1		Alelo 2	
			Nucleótido	Proteína	Nucleótido	Proteína
RP-102	<i>PRPH2</i>	AD	c.518A>T	p.(Asp173Val)	-	-
RPN-74	<i>PRPF8</i>	AD	c.6943del	p.(Leu2315fs*2358)	-	-
RPN-12	<i>RHO</i>	AD	c.644C>T	p.(Pro215Leu)	-	-
RPN-97	<i>CHM</i>	LX	c.671_672del	p.(Arg214fs*221)	-	-
RPN-1	<i>RPGR</i>	LX	c.2323_2324del	p.(Arg775Glufs*59)	-	-
RP-604	<i>ABCA4</i>	AR	c.2041C>T	p.(Arg681*)	c.5882G>A	p.(Gly1961Glu)
RP-22	<i>NR2E3</i>	AR	c.119-2A>C	p.?	c.119-2A>C	p.?
RP-1638	<i>USH2A</i>	AR	c.5540dup	p.(Asn1848Glufs*20)	del ex. 5-9	p.(Gly262Valfs*2)

Abreviaturas: AD: autosómico dominante, AR: autosómico recesivo, LX: ligado al cromosoma X.

El diagnóstico oftalmológico y electrofisiológico se realizó en el hospital La Fe, hospital de Manises y hospital General de Valencia. Todos los pacientes fueron examinados por un oftalmólogo con las siguientes pruebas: medida de la agudeza visual (escala decimal) y biomicroscopía con lámpara de hendidura del segmento anterior y del fondo de ojo dilatado. De algunos pacientes se obtuvieron imágenes de fondo de ojo a color (Topcon 3D OCT, Topcon Corporation, Tokyo, Japón), imágenes de autofluorescencia utilizando lentes de 30° o 55° y un oftalmoscopio láser de escaneo confocal (HRA + OCT Spectralis, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Alemania), imágenes de tomografía de coherencia óptica de dominio espectral (*spectral-domain optical coherence tomography*, SD-OCT) (HRA + OCT Spectralis, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Alemania; Topcon 3D OCT, Topcon Corporation, Tokyo, Japón; CIRRUS HD-OCT Zeiss, Oberkochen, Alemania) y perimetría (Carl Zeiss Humphrey Field Analyzer, Germany, Oberkochen). Las pruebas electrofisiológicas incluyen: PEV, ERG y EOG (Roland RETI-port/scan21, Germany), realizadas según los estándares de la *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision standards* (McCulloch et al. 2015). Todos estos datos clínicos recopilados de los pacientes afectados se detallan en Anexos, Tabla VIII.1.

Todos los pacientes fueron entrevistados en la consulta de asesoramiento genético del hospital la Fe o mediante comunicación telefónica, para la recogida de datos clínicos y antecedentes familiares, siguiendo el cuestionario adjunto (Anexos, apartado 2). Se recogieron muestras de sangre periférica de todos los participantes del estudio o, en su defecto, saliva, junto al consentimiento informado firmado por cada uno de ellos o por sus tutores legales (Anexos, apartado 3).

2. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

El ADN de los pacientes, controles y familiares se extrajo a partir de linfocitos de sangre periférica o células de la mucosa bucal, mediante el extractor automático de ADN MagNA Pure Compact Instrument (Roche, Basilea, Suiza), siguiendo el protocolo del fabricante.

La calidad y cantidad de los ácidos nucleicos se midieron mediante espectrofotometría UV/VIS con el Nanodrop ND-100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts). Además, el ADN de los pacientes secuenciados mediante NGS se midió previamente por fluorimetría con el Qubit 4 fluorometer (Thermo Fisher Scientific) empleando el kit Qubit dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific) y se corrió en un gel de agarosa al 1% para comprobar su integridad.

3. DISEÑO DEL PANEL DE GENES

Se diseñó un panel de secuenciación masiva mediante la herramienta informática SureDesign (Agilent Technologies, Santa Clara, California) para la plataforma de secuenciación de Illumina (San Diego, California). En el diseño se incluyeron 117 genes causantes de DHR-NS (RetNet, <https://sph.uth.edu/retnet/>) y algunas regiones intrónicas de los genes *USH2A*, *ABCA4*, *CEP290*, *OFD1* y *PRPF31* en las que previamente se habían descrito mutaciones patogénicas (Tabla III.3, Tabla III.4). El diseño incluye todos los exones codificantes incluidos en todas las isoformas de los 117 genes y 25 pb de las regiones intrónicas adyacentes. Además, enriquecimos el diseño en la región ORF15 del gen *RPGR* aumentando el número de sondas. Las sondas se diseñaron según la secuencia de referencia *H.sapiens*, hg19, GRCh37, febrero 2009. El tamaño total de la región capturada fue de 490kbp y el número de sondas de 11.282.

Tabla III.3 Regiones incluidas en el diseño del panel.

<i>ABCA4</i>	<i>CDHR1</i>	<i>FAM161A</i>	<i>LCA5</i>	<i>POC1B</i>	<i>RGS9BP</i>	<i>TOPORS</i>
<i>ADAM9</i>	<i>CEP290</i>	<i>FLVCR1</i>	<i>LRAT</i>	<i>PRCD</i>	<i>RHO</i>	<i>TTC8</i>
<i>ADAMTS18</i>	<i>CERKL</i>	<i>FSCN2</i>	<i>MAK</i>	<i>PROM1</i>	<i>RIMS1</i>	<i>TLL5</i>
<i>AIPL1</i>	<i>CHM</i>	<i>GDF6</i>	<i>MERTK</i>	<i>PRPF3</i>	<i>RLBP1</i>	<i>TULP1</i>
<i>ARL2BP</i>	<i>CLRN1</i>	<i>GNAT2</i>	<i>MVK</i>	<i>PRPF31</i>	<i>ROM1</i>	<i>UNC119</i>
<i>ARL6</i>	<i>CNGA1</i>	<i>GUCA1A</i>	<i>NEK2</i>	<i>PRPF4</i>	<i>RP1</i>	<i>USH1C</i>
<i>BBS1</i>	<i>CNGA3</i>	<i>GUCA1B</i>	<i>NEUROD1</i>	<i>PRPF6</i>	<i>RP1L1</i>	<i>USH2A</i>
<i>BBS2</i>	<i>CNGB1</i>	<i>GUCY2D</i>	<i>NMNAT1</i>	<i>PRPF8</i>	<i>RP2</i>	<i>ZNF408</i>
<i>BEST1</i>	<i>CNGB3</i>	<i>HK1</i>	<i>NR2E3</i>	<i>PRPH2</i>	<i>RP9</i>	<i>ZNF513</i>
<i>C1QTNF5</i>	<i>CNNM4</i>	<i>IDH3B</i>	<i>NRL</i>	<i>RAB28</i>	<i>RPE65</i>	chr1:216064520-216064560
<i>C21orf2</i>	<i>CRB1</i>	<i>IMPDH1</i>	<i>OFD1</i>	<i>RAX2</i>	<i>RPGR</i>	chr1:94492980-94493020
<i>C2ORF71</i>	<i>CRX</i>	<i>IMPG1</i>	<i>OTX2</i>	<i>RBP3</i>	<i>RPGRIP1</i>	chr12:88494940-88494980
<i>C8orf37</i>	<i>DHDDS</i>	<i>IMPG2</i>	<i>PDE6A</i>	<i>RBP4</i>	<i>SAG</i>	chr19:54633379-54633419
<i>CA4</i>	<i>DRAM2</i>	<i>IQCB1</i>	<i>PDE6B</i>	<i>RD3</i>	<i>SEMA4A</i>	chrX:13770172-13770212
<i>CABP4</i>	<i>DTHD1</i>	<i>KCNJ13</i>	<i>PDE6C</i>	<i>RDH12</i>	<i>SLC7A14</i>	
<i>CACNA1F</i>	<i>EFEMP1</i>	<i>KCNV2</i>	<i>PDE6G</i>	<i>RDH5</i>	<i>SNRNP200</i>	
<i>CACNA2D4</i>	<i>ELOVL4</i>	<i>KIZ</i>	<i>PDE6H</i>	<i>RGR</i>	<i>SPATA7</i>	
<i>CDH3</i>	<i>EYS</i>	<i>KLHL7</i>	<i>PITPNM3</i>	<i>RGS9</i>	<i>TIMP3</i>	

Tabla III.4 Mutaciones intrónicas profundas incluidas en el diseño del panel.

Región del panel	Gen (intrón)	Mutación	Referencia
chr1:94492980-94493020	<i>ABCA4</i> (i30)	c.4539+2001G>A	(Bauwens et al. 2015)
		c.4539+2028G>A	(Braun et al. 2013)
chr1:216064520-216064560	<i>USH2A</i> (i40)	c.7595-2144A>G	(Vaché et al. 2012)
chr12:88494940-88494980	<i>CEP290</i> (i26)	c.2991+1655A>G	(den Hollander et al. 2006)
chr19:54633379-54633419	<i>PRPF31</i> (i13)	c.1374+654C>G	(Rio Frio et al. 2009)
chrX:13770172-13770212	<i>OFD1</i> (i9)	c.1055+706A>G	(Webb et al. 2012)

4. PREPARACIÓN DE LA LIBRERÍA

Para la preparación de la librería se eligió el protocolo SureSelect^{QXT} (Agilent Technologies) que consta de las siguientes etapas (Figura III.1):

-Tagmentación: partimos de 50 ng de ADN que se fragmenta mediante transposasas, proceso conocido como tagmentación. Estas enzimas, a la vez que fragmentan al azar el ADN añaden los adaptadores universales de Illumina en ambos extremos del fragmento. A continuación, se purifica la librería mediante las esferas magnéticas Agencourt AMPure XP Kit (Beckman Coulter, Pasadena, California).

-Amplificación de la librería y posterior purificación (AMPure XP).

-Medida de la cantidad/calidad de la librería: se utiliza 1 μ L de cada librería para realizar electroforesis capilar en el chip ScreenTape D1000 (Agilent Technologies) mediante la plataforma TapeStation (Agilent Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. El tamaño de la librería deberá estar entre 245-325 bp.

-Hibridación: se incuba la librería con las sondas diseñadas para las regiones de interés. Estas sondas están marcadas con biotina (Ver programa de termociclador en Tabla III.5).

Tabla III.5 Programa del termociclador para la hibridación.

Nº ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	5 min
1	65°C	10 min
1	65°C	1 min
60	65°C	1 min
	37°C	3 seg
1	65°C	infinito

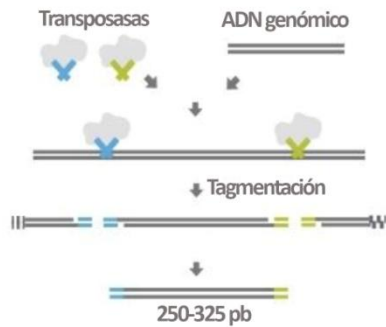
-Captura: se incuba la librería hibridada con unas esferas magnéticas unidas a estreptavidina, Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Thermo Fisher Scientific). Los fragmentos hibridados se unirán a las esferas magnéticas mediante la unión específica biotina-estreptavidina. Posteriormente, mediante un soporte magnético conseguimos separar las regiones que queremos estudiar del resto del genoma.

-Amplificación y unión de los índices: se amplifican las regiones capturadas y las muestras se identifican individualmente mediante la combinación de 2 oligonucleótidos específicos (índex), permitiéndonos secuenciar más de un paciente en la misma carrera de secuenciación. A continuación se purifica la librería mediante esferas magnéticas (AMPure XP).

-Medida de la cantidad/calidad de la librería: en este caso se utilizan 2 μL de cada librería y el chip ScreenTape High Sensitivity D1000 (Agilent Technologies). El tamaño de la librería deberá estar entre 325-450 pb.

-Mezcla de librerías: por último, se mezclan las librerías que serán secuenciadas en la misma carrera en cantidades equimolares.

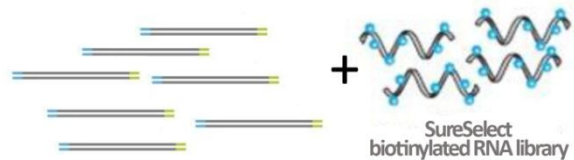
1. Tagmentación



2. Amplificación



3. Hibridación



4. Captura

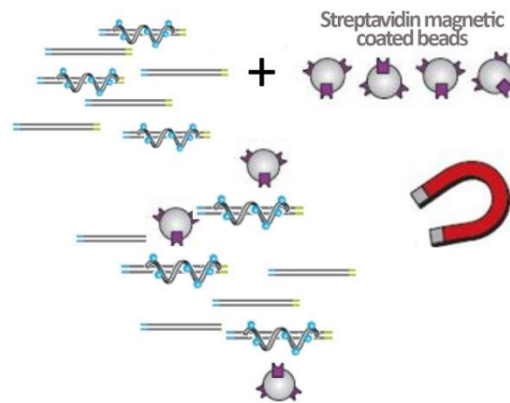


Figura III.1 Esquema de la preparación de la librería, según el protocolo SureSelect^{QXT} (Agilent Technologies).

5. SECUENCIACIÓN

Las librerías generadas se secuenciaron en la plataforma MiSeq (Illumina) con el reactivo MiSeq v2 de 300 ciclos (2x150) (Illumina). El proceso de secuenciación consta de una primera fase de *clustering* o generación de clones antes de la secuenciación propiamente dicha (Figura III.2).

La formación de *clusters* es el proceso en el que cada fragmento de librería es amplificada, formando clones de un mismo fragmento. Para ello se requiere de un medio de soporte, en este caso se utiliza una *flow cell*, que es un cristal cubierto de 2 tipos de oligonucleótidos, cada uno complementario de uno de los dos extremos de la librería. Las librerías se unen al azar a la superficie de la *flow cell* mediante los adaptadores complementarios. Una vez unidas por un extremo, las cadenas se doblan y se unen por su otro extremo opuesto libre al oligonucleótido complementario unido a la superficie, formando un puente. A continuación, se amplifica la cadena complementaria formando fragmentos de doble cadena y posteriormente se desnaturalizan. Esta amplificación se repite hasta formar *clusters* compuestos de unas 1000 copias del mismo fragmento a lo largo de toda la *flow cell*. Después de la formación de *clusters*, se liberan todas las cadenas reversas, permaneciendo unidas solo las directas (Figura III.2).

La secuenciación empieza con la unión del *primer* de secuenciación que se une al extremo libre del fragmento unido a la *flow cell* y dará lugar a la primera lectura. En cada ciclo de secuenciación los nucleótidos marcados cada uno con un fluoróforo diferente, compiten por unirse a la cadena, pero solo se unirá el complementario a la cadena molde. La *flow cell* se lava para eliminar los nucleótidos no unidos y, posteriormente, los *clusters* se excitan con un láser. Cada *cluster* emitirá una señal fluorescente correspondiente al nucleótido recién incorporado. El número de ciclos de secuenciación determinará la longitud de la lectura. A este proceso se le conoce como secuenciación mediante síntesis (Figura III.2).

Una de las características del reactivo empleado es que la construcción de las lecturas es pareada (*paired-end*), es decir, en lugar de secuenciar 300 nucleótidos en una dirección, se secuencian 150 nucleótidos a partir de un extremo y 150 a partir del otro extremo del mismo fragmento. Las lecturas pareadas proporcionan ventajas en el alineamiento contra el genoma, sobretodo en regiones repetitivas, y ayuda en la detección de reordenamientos como inserciones, deleciones e inversiones.

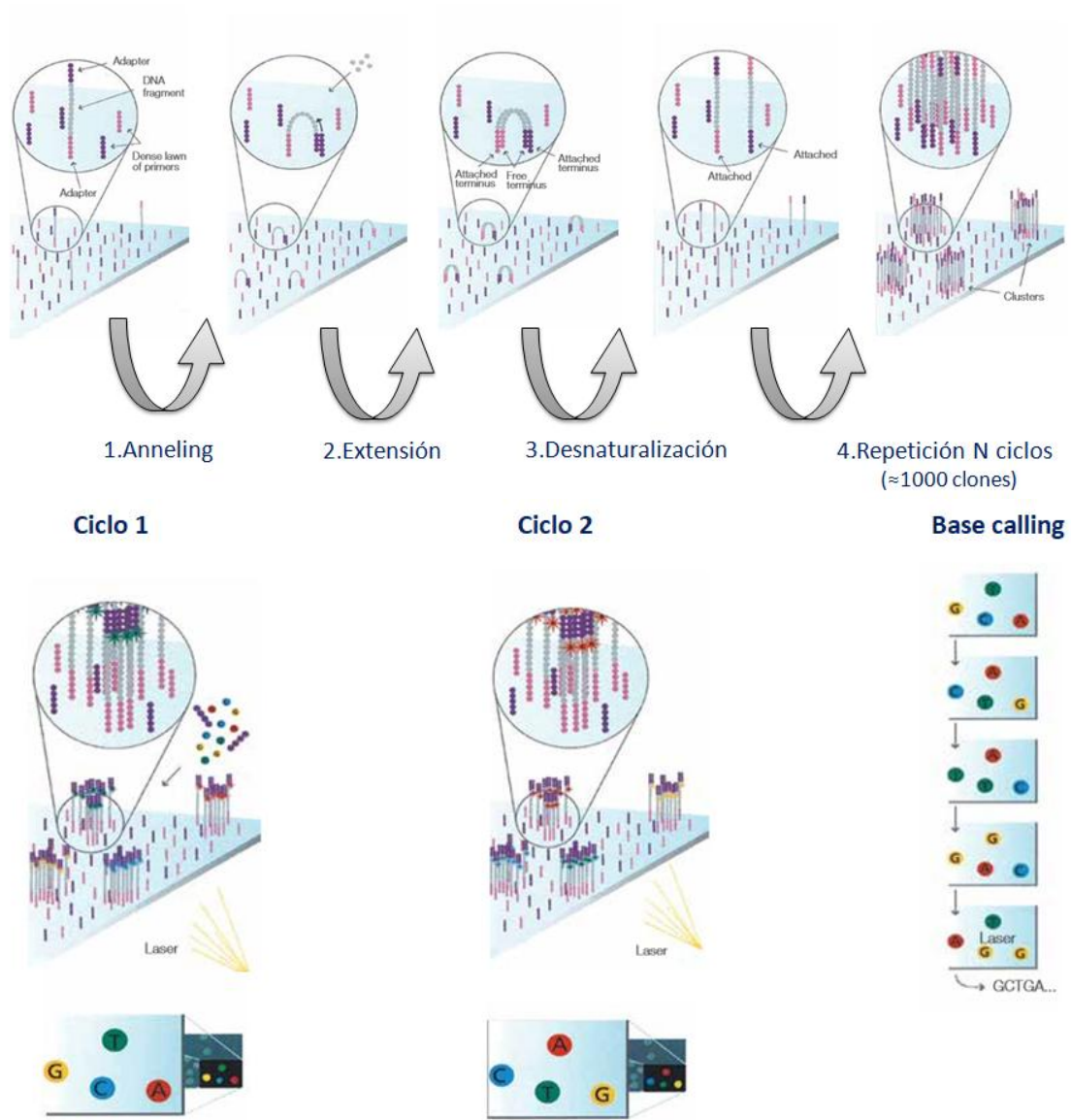


Figura III.2 Esquema de la secuenciación con Illumina. Formación de *clusters* (arriba) y secuenciación mediante síntesis (abajo). Modificada de <http://seqanswers.com/forums/showthread.php?t=21>.

6. ANÁLISIS DE DATOS

En primer lugar, se evaluaron los parámetros de calidad de la secuenciación mediante la aplicación de Illumina Real-Time Analysis (RTA) software. Las plataformas de secuenciación generan unos valores de probabilidad de error por base llamados valores de calidad o *quality scores*. Estos parámetros se miden según “valores de calidad de Phred” o *Phred Quality Score* (Q score). El parámetro más empleado para evaluar la exactitud de la plataforma de secuenciación es la “exactitud de llamada de base” o *base calling accuracy* e indica la probabilidad de que la lectura de una base sea incorrecta. En NGS se considera valor de referencia un Q score de 30 (Q30) que equivale a la probabilidad de que 1 entre 1000 bases leídas sea incorrecta y un *base call accuracy* de 99,9%.

El secuenciador genera millones de lecturas que podemos desmultiplexar gracias a la identificación de las secuencias mediante los índices. Una vez tuvimos todas las lecturas agrupadas para cada paciente, se alinearon con el genoma de referencia (GRCh37/hg19) y se identificaron las variantes genéticas mediante el programa SureCall (Agilent Technologies, USA). Las variantes identificadas se anotaron con el programa wANNOVAR (<http://wannovar.wglab.org/>) (Figura III.3).

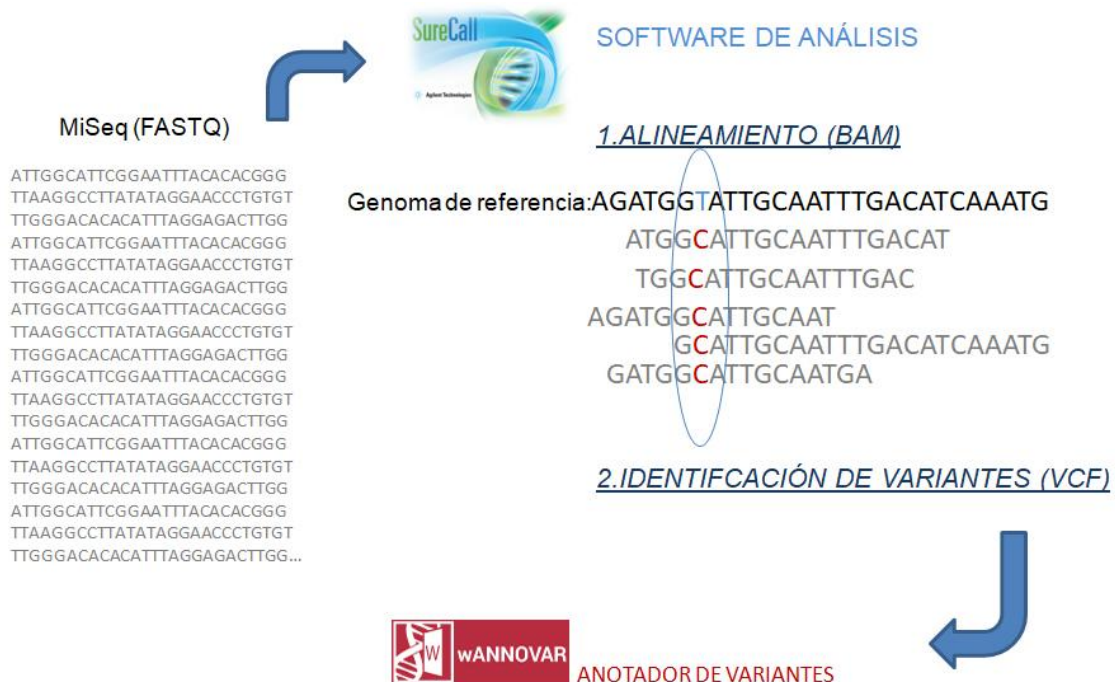


Figura III.3 Esquema representativo del análisis de las lecturas.

7. INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS

Se evaluaron las variantes con una frecuencia del alelo menor ≤ 0.01 en Exome Aggregation Consortium (ExAC) y Genome Aggregation Database (GnomAD). El significado clínico de las variantes se estudió siguiendo los criterios de la *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (Richards et al. 2015), para ello se emplearon: la herramienta de búsqueda VarSome <https://varsome.com/>, que incluye varias bases de datos genómicas y predictores de patogenicidad, y las bases de datos Human Gene Mutation Database (HGMD Professional 2018.3) (www.hgmd.cf.ac.uk) y Locus Specific Mutation Databases (http://grenada.lumc.nl/LSDB_list). El potencial efecto sobre el *splicing* de las variantes identificadas se evaluó utilizando los algoritmos de Human Splicing Finder 3.1 (HSF y MaxEntScan) (<http://www.umd.be/HSF/>) y spliceAI (<https://mobidetails.iurc.montp.inserm.fr/MD/>).

8. SECUENCIACIÓN SANGER

La validación de las variantes identificadas mediante el panel de genes y los análisis de segregación familiar se realizaron mediante secuenciación Sanger.

Los cebadores para la amplificación de cada fragmento se diseñaron utilizando la herramienta Primer 3 Plus (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) (Rozen and Skaletsky 2000) (Anexos, Tabla VIII.2). La amplificación del ADN genómico se realizó utilizando la Biotools DNA polimerase (5 U/ μ L) (Biotools, Madrid, España) siguiendo las recomendaciones del fabricante (Tabla III.6).

Tabla III.6 Condiciones de PCR para la Biotools DNA polimerase (5 U/ μ L).

Reactivo	Volumen	Nº ciclos	T	t
H ₂ O (μ L)	Hasta Vf= 25	1	94°C	5 min
10x reaction buffer (μ L)	2,5		94°C	5 seg
MgCl ₂ (25mM) (μ L)	0,75	35	X°C	30 seg
dNTP (2 mM cada uno) (μ L)	3		72°C	60 seg/Kb
Cebador D (10 μ M) (μ L)	1	1	72°C	5 min
Cebador R (10 μ M) (μ L)		1	4°C	infinito
Polimerasa (μ L)	0,25			
ADN (ng)	100			

A la izquierda, el volumen necesario de cada reactivo para la preparación de la máster mix. A la derecha, el programa de termociclador. Abreviaturas: D: directo; R: reverso; T: temperatura; t: tiempo; X: depende de cada pareja de cebadores; Vf: volumen final.

Los productos de PCR se purificaron mezclando 5 μ L del producto de reacción post-PCR con 2 μ L del reactivo ExoSAP-IT (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts). La mezcla se incubó en primer lugar durante 15 minutos a 37°C y seguidamente durante 15 min a 80°C.

La reacción de secuenciación se llevó a cabo utilizando los cebadores empleados en la amplificación de cada fragmento (Anexos, Tabla VIII.2) y el kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems), siguiendo las recomendaciones del fabricante (Tabla III.7).

Tabla III.7 Condiciones de la reacción de secuenciación para kit BigDye® Terminator v3.1.

Reactivo	Volumen	Nº ciclos	T	t
H ₂ O (μ L)	Hasta Vf= 10	1	96°C	3 min
5x sequencing buffer (μ L)	2		96°C	10 seg
Cebador D (3,2 μ M) (μ L)	1	35	50°C	5 seg
Cebador R (3,2 μ M) (μ L)	1		60°C	2 min
Bigdye (μ L)	1	1	4°C	infinito
PCR purif. (μ L)	2			

A la izquierda, el volumen necesario de cada reactivo para la preparación de la máster mix. A la derecha, el programa de termociclador. Abreviaturas: D: directo, R: reverso, T: temperatura, t: tiempo; Vf: volumen final.

La reacción de secuenciación se purificó mediante filtración utilizando el kit Preforma DTR V3 96-Well Short Plate (EdgeBio, Gaithersburg, Maryland). Para ello, se llevó a cabo una primera centrifugación de la placa de 3 minutos a 850 G, con la finalidad de eliminar el tampón que hidrata las columnas de la placa. A continuación, se transfirió el total del volumen de la reacción de secuenciación (aproximadamente 10 µL) en el centro de cada pocillo de la placa y se centrifugó durante 5 minutos a 850 G. Por último, se añadió 10 µL de formamida (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems) a cada reacción de secuenciación purificada. Finalmente, las secuencias se leyeron en la plataforma de secuenciación ABI 3500xL Dx Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

8.1. Análisis de variantes intrónicas profundas no incluidas en el panel

Se secuenciaron las mutaciones en regiones intrónicas profundas descritas antes de la fecha de finalización de este trabajo y no incluidas en el panel, en aquellos pacientes con ninguno o solo un alelo mutado y fenotipo acorde a la mutación a estudio (Tabla III.8). Las condiciones de secuenciación se detallan en las Tablas III.6 y III.7, y los cebadores en Anexos (Tabla VIII.3).

Tabla III.8 Mutaciones intrónicas profundas no incluidas en el panel.

Gen	Intrón	Mutación	Referencia
<i>ABCA4</i>	(i36)	c.5196+1056A>G	(Braun et al. 2013)
		c.5196+1137G>A	
		c.5196+1216C>A	
<i>USH2A</i>	(i27)	c.5573-843A>G	(Liquori et al. 2016)
	(i44)	c.8845+628C>T	
	(i50)	c.9959-4159A>G	
	(i64)	c.14134-3169A>G	
<i>PROM1</i>	(i18)	c.2077-521A>G	(Mayer et al. 2016)

9. ANÁLISIS DE VARIANTES DE NÚMERO DE COPIAS

Las duplicaciones y deleciones se cribaron en todos los probandos mediante la herramienta bioinformática DECoN tool v1.0.2 (Fowler et al. 2016). Las CNV identificadas se validaron en los pacientes y familiares mediante MLPA: genes *EYS* (salsa P328), *ABCA4* (salsas P151 y P152) y *PRPF31* (salsa P235) o mediante *array* genómico (*Affymetrix CytoScan 750K array*).

10. ESTUDIOS FUNCIONALES MEDIANTE MINIGENES

Para evaluar el efecto de las variantes identificadas en el procesamiento del ARNm y el reconocimiento de los sitios donador y aceptor, en primer lugar, se llevaron a cabo estudios *in silico*. Para ello se utilizaron dos algoritmos diferentes (HSF y MaxEnt) incluidos en la herramienta de predictor de *splicing* Human Splicing Finder 3.1 (<http://www.umd.be/HSF/index.html>) (Desmet et al. 2009). Las mutaciones seleccionadas para el ensayo *in vitro* se analizaron también mediante el predictor de nueva generación spliceAI (<https://mobidetails.iurc.montp.inserm.fr/MD/>) (Jaganathan et al. 2019). Posteriormente, para evaluar el impacto de las variantes seleccionadas en el proceso de *splicing* se realizaron ensayos *in vitro* con minigenes.

10.1. Diseño de los minigenes

Se diseñaron cebadores para la amplificación del fragmento genómico que contiene la mutación a estudio, incluyendo aproximadamente 200 nucleótidos de las regiones intrónicas adyacentes al exón regulado. Se seleccionaron las enzimas de restricción *XhoI* (sitio 3') y *NheI* (sitio 5'), compatibles con el vector pSPL3. Se comprobó mediante la aplicación NEBcutter de New England BioLabs (Ipswich, Massachusetts) (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) que dichas enzimas de restricción no cortasen dentro de nuestro diseño. Además, se añadieron en los extremos 5' de los cebadores unas secuencias de reconocimiento específicas para las enzimas de restricción: CTCGAG para *XhoI* y GCTAGC para *NheI*, y una secuencia de seis nucleótidos (AAGAAT) para aumentar la eficiencia de corte de las enzimas (Anexos, Tabla VIII.4).

10.2. Amplificación y purificación del fragmento genómico

La amplificación de la región a estudio, delimitada por los cebadores diseñados en el paso anterior, se llevó a cabo a partir del ADN genómico del paciente portador de la mutación a estudio, mediante PCR. Se utilizó la Phusion High-Fidelity DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante (Tabla III.9). El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1%, se cortó la banda correspondiente al minigen y se purificó con el kit E.Z.N.A.® Gel Extration (Omega Bio-tek, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Tabla III.9 Condiciones de PCR para la Phusion High-Fidelity DNA polimerase.

Reactivo	Volumen	Nº ciclos	T	t
H ₂ O (µL)	Hasta Vf= 50	1	98°C	30 seg
5x Phusion HF buffer (µL)	10		98°C	10 seg
dNTP (2 mM cada uno) (µL)	6	35	60°C	30 seg
Cebador D (10 µM) (µL)	2		72°C	30 seg/Kb
Cebador R (10 µM) (µL)	2	1	72°C	7 min
Polimerasa (µL)	0,5	1	4°C	infinito
ADN (ng)	100			

A la izquierda, el volumen necesario de cada reactivo para la preparación de la máster mix. A la derecha, el programa de termociclador. Abreviaturas: D: directo, R: reverso, T: temperatura, t: tiempo; Vf: volumen final.

10.3. Doble digestión y purificación

La doble digestión del plásmido y de los amplicones purificados se realizó utilizando las enzimas de restricción FastDigest XhoI y FastDigest NheI, y el FastDigest Buffer (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla III.10). A continuación, se purificó la digestión con el kit MinElute PCR Purification (QIAGEN, Düsseldorf, Germany).

Tabla III.10 Condiciones del ensayo de doble digestión.

Reactivo	Volumen	Temperatura	tiempo
H ₂ O (µL)	Hasta Vf= 50	37°C	15 min
FastDigest buffer (µL)	5		
XhoI (µL)	1		
NheI (µL)	1		
ADN (µg)	1		

A la izquierda, el volumen necesario de cada reactivo para la preparación de la máster mix. A la derecha, el programa de termociclador. Abreviaturas: Vf: volumen final.

10.4. Ligación

La ligación del inserto al plásmido (pSPL3), previamente digeridos, se realizó mediante la enzima T4 ligasa (Thermo Fisher Scientific) y el 10x T4 DNA Ligase buffer (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla III.11). La cantidad de inserto empleada en la reacción de ligación se calculó teniendo en cuenta un ratio molar vector/inserto 1:3 (ver fórmula 1), siendo el tamaño del inserto según los cebadores diseñados (Anexos, Tabla VIII.4) y el tamaño del vector 6,031 Kb.

Fórmula 1:

$$\frac{100 \text{ ng vector} \times \text{tamaño del inserto (Kb)}}{\text{tamaño del vector (Kb)}} \times \frac{3}{1} = \text{ng del inserto}$$

Tabla III.11 Condiciones del ensayo de ligación.

Reactivo	Volumen	Temperatura	tiempo
H ₂ O (μL)	Hasta Vf= 20	ambiente	1 h
10x T4 DNA Ligase buffer (μL)	2		
Vector (ng)	100		
Inserto (μL)	Según fórmula 1		
T4 Ligasa (μL)	1		

A la izquierda, el volumen necesario de cada reactivo para la preparación de la máster mix. A la derecha, el programa de termociclador. Abreviaturas: Vf: volumen final.

10.5. Transformación

El plásmido generado se introduce en bacterias electrocompetentes *Escherichia coli* (XL1-Blue Supercompetent Cells, Agilent Technologies) mediante choque térmico. El protocolo de transformación mediante choque térmico consiste en tres incubaciones seriadas (Tabla III.12) de la mezcla de 2,5μL del producto de ligación y 50μL de bacterias electrocompetentes. Una vez concluidas las incubaciones de la transformación, se resuspende la mezcla en 450 μL de medio de cultivo líquido (triptona 1%, NaCl 1% y extracto de levadura 0,5%) y se incuba durante 1 h a 37°C en agitación a 220 rpm. Finalmente, las bacterias transformadas, se incubaron durante toda la noche en placas de medio de cultivo con ampicilina (agar-agar 2%, triptona 1%, NaCl 1%, extracto de levadura 0,5% y ampicilina 0,1%) a 37°C (el plásmido pSPL3 tiene resistencia a ampicilina).

Tabla III.12 Condiciones de incubación en la transformación por choque térmico.

Incubación	Temperatura	tiempo
1 ^a	en hielo	30 min
2 ^a	42°C	45 seg
3 ^a	en hielo	1 min

10.6. Selección de colonias

Al día siguiente, se seleccionaron las colonias que contenían el plásmido con el inserto de interés. Para ello, se picaron aproximadamente 20 colonias de cada minigen y se resuspendieron en 50 μL de H₂O. Se realizó una PCR con 2 μL de las colonias resuspendidas, los cebadores del vector pSPL3: pSPL3_D y pSPL3_R (Anexos, Tabla VIII.5) y la ADN polimerasa (5U/μL) de Biotools (condiciones de PCR ver Tabla III.6). Mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% se seleccionaron aquellos clones con el tamaño correspondiente a la construcción deseada y se incubaron en 4 mL de medio de cultivo líquido con 4 μL de ampicilina (50ng/μL) durante toda la noche a 37°C, en agitación a 220 rpm. Al día siguiente, se realizaron minipreps, utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN), de aquellos cultivos que presentaron turbidez, con la finalidad de obtener el plásmido purificado. A continuación, se secuenciaron las

minipreps con la finalidad de conseguir un clon con la secuencia *wildtype* y otro con la secuencia mutada a estudio.

10.7. Transfección en células HEK293

Se sembraron $2,5 \times 10^5$ células por pocillo en placas de seis pocillos en 2 mL de medio Gibco DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Thermo Fisher Scientific) suplementado al 10% con suero bovino fetal y 1% de penicilina/streptomina (Sigma Aldrich, San Luis, Misuri). Tras 24 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se cambió el medio a las células y se transfectaron con 1 µg de cada minigen y Lipofectamine 3000 reagent (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla III.15).

Tabla III.13 Componentes de la transfección.

	Mix 1	Mix 2 (por duplicado)
Opti-MEM ^a	250µL	125 µL
Lipofectamina	10µL	-
P3000 reagent	-	2µL
ADN	-	1µg

^a Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium (Life Technologies).

Volúmenes calculados para un minigen en su versión *wildtype* y mutado (2 pocillos).

Tras 24 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se recogieron las células mediante raspado en 350 µL de tampón de lisis (RNeasy Mini Kit, QIAGEN) y 3,5 µL de β-mercaptoetanol. Las células se guardaron a -80°C hasta que se procedió a la extracción del ARN.

10.8. Extracción del ARN, RT-PCR y amplificación del transcrito

El ARN se extrajo de las células HEK293 transfectadas mediante el kit RNeasy Mini (QIAGEN) incluyendo el paso de la digestión con ADNasa, siguiendo las instrucciones del fabricante. La retrotranscripción se realizó con PrimeScript RT Reagent Kit (TaKaRa, Kusatsu, Japón), siguiendo las indicaciones del fabricante partiendo de 500 ng de ARN (Tabla III.16).

Tabla III.14 Condiciones del ensayo de retrotranscripción.

Reactivo	Volumen	Programa	
		Temperatura	Tiempo
H2O (μL)	Hasta Vf= 10	37°C	15 min
5x primer buffer (μL)	2	85°C	5 seg
Oligo dT primer (μL)	0,5	4°C	infinito
Random 6 mers (μL)	2		
Enzima (μL)	0,5		
ARN (μg)	0,5		

A la izquierda, el volumen necesario de cada reactivo para la preparación de la máster mix. A la derecha, el programa de termociclador. Abreviaturas: Vf: volumen final.

La amplificación del ADN codificante se realizó mediante PCR utilizando la polimerasa (5U/μL) de Biotools y los cebadores localizados en los exones constitutivos del plásmido pSPL3, SD6_D y SA2_R (Anexos, Tabla VIII.5). Los amplicones se corrieron en un gel de agarosa al 1%, se purificaron con ExoSAP-IT y finalmente se secuenciaron (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing) para comprobar si había habido alguna alteración en el *splicing* (Ver condiciones de PCR y secuenciación en apartado: 8. Secuenciación Sanger).

10.9. Interpretación de los ensayos con minigenes

Para la correcta anotación de los transcritos alterados por una mutación de *splicing*, obtenidos tras los ensayos con minigenes, y proteínas resultantes, se empleó la herramienta Name Checker de Mutalyzer 2.032 (<https://www.mutalyzer.nl/name-checker>). También se empleó el predictor bioinformático NMDEscPredictor (<https://nmdprediction.shinyapps.io/nmdescpredictor/>) para comprobar si el nuevo transcrito mutado podría ser degradado por la vía de degradación del ARNm mediada por mutaciones terminadoras, más conocida por sus siglas en inglés: NMD (Nonsense Mediated Decay). Por otra parte, se consultaron los dominios de las proteínas afectadas en la base de datos Conserved domains de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?>) y las posibles modificaciones post-trascripcionales de la proteína en la base de datos cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>).

IV. RESULTADOS

1. VALIDACIÓN DEL PANEL DE GENES

En primer lugar, se evaluaron los parámetros de calidad obtenidos de la secuenciación de los 8 individuos control (Tabla IV.1). Nuestra estrategia diagnóstica detectó todas las mutaciones previamente identificadas en estos pacientes, incluyendo una delección de 5 exones en el gen *USH2A* y una *frameshift* en la región ORF15 del gen *RPGR*. Por tanto, la sensibilidad de nuestro panel NGS para estas variantes fue del 100%. De media, un 67% de las lecturas obtenidas en cada paciente fueron alineadas en las regiones de interés, con una media de profundidad de las lecturas de 158x. De media, el 99% de las bases se cubrieron con más de 20 lecturas y el 97% a más de 50x. El porcentaje medio de duplicados obtenidos fue del 15%.

Una vez secuenciado todos los probandos incluidos en el estudio, la media de la cobertura total obtenida por paciente fue 156x, con 99,18% de las bases cubiertas más de 20x, 96,99% más de 50x y 88,81% más de 100x. Las regiones codificantes con una cobertura <50x están informadas en Anexos, Tabla VIII.6.

Tabla IV.1 Resumen de los parámetros de calidad obtenidos en la secuenciación de los controles y pacientes.

	Duplicados (%)	Lecturas en regiones cubiertas (%)	Profundidad media de lectura en las regiones	Porcentaje de bases con:				
				>5x	>20x	>50x	>100x	>200x
Controles	15,00	66,59	158,30	99,75	99,21	97,70	91,12	59,00
Pacientes	19,66	68,63	156,15	99,81	99,18	96,99	88,81	58,62

2. VARIANTES GENÉTICAS

Tras la secuenciación del panel, se identificaron entre 700 y 800 variantes por paciente. Una vez descartadas las variantes con una $MAF > 0,01$, la media de variantes por pacientes fue de aproximadamente 80. Se analizaron todas las variantes genéticas con una $MAF < 0,01$. En anexos se adjunta la clasificación según los criterios de la ACMG de todas las variantes exónicas, excepto las de tipo sinónima, analizadas en los pacientes estudiados mediante NGS (Anexos, Tabla VIII.7). Se informan un total de 624 variantes, 468 variantes únicas, de las cuales 308 eran novel en el momento de la redacción de esta tesis. Del total de variantes únicas, un 1% (5) se clasificaron como benignas, 33% (155) como probablemente benignas, 39% (183) como variantes de significado clínico incierto, 11% (50) como probablemente patogénicas y 16% (75) como patogénicas (Figura IV.1).

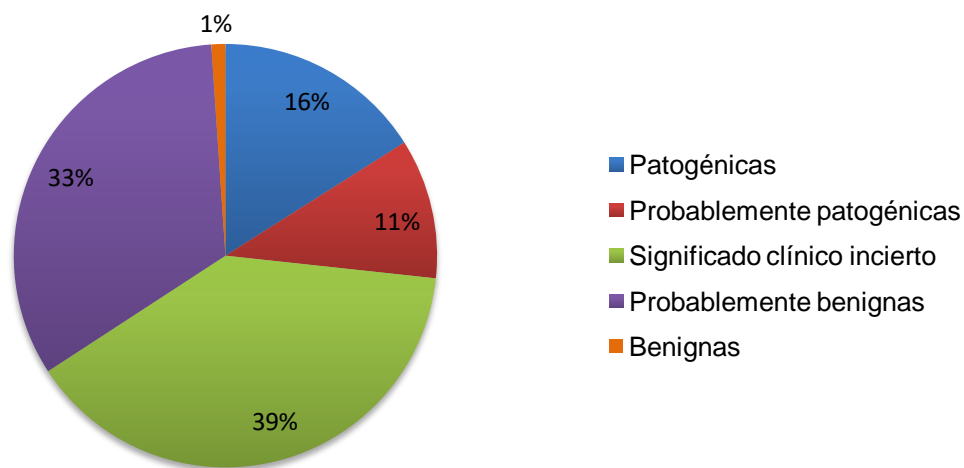


Figura IV.1 Representación del porcentaje del tipo de variantes identificadas en los pacientes.

Se han encontrado variantes patogénicas o probablemente patogénicas en el 73% (90) de los 124 probandos secuenciados. Sin embargo, se obtuvo un diagnóstico genético completo en el 60% (75) del total de casos, ya que el 12% (15) presentaban una sola mutación en genes de herencia AR. Además, destacamos que el 13% (16) de los pacientes tenían variantes patogénicas o probablemente patogénicas en más de un gen.

En los pacientes con diagnóstico genético completo, las mutaciones responsables de la enfermedad se distribuyen en 30 genes diferentes: 20 genes con herencia autosómica recesiva (55), 8 genes con herencia autosómica dominante (15) y 2 genes con herencia ligada al X (8) (las familias fRPN-142, fRPN-169, fRPN-194 y fRPN-NB presentaron mutaciones responsables de patología en 2 genes diferentes) (Figura

IV.2). De los 75 casos con diagnóstico genético completo, los genes mutados con mayor frecuencia fueron *ABCA4* (n= 18, 24%), seguido de *USH2A* (n= 8, 11%), *RPGR* (n= 7, 9%) y *PRPH2* (4= 5%). Mutaciones en estos 4 genes explicarían casi la mitad de los casos resueltos de nuestra cohorte (37 de 75, 49%).

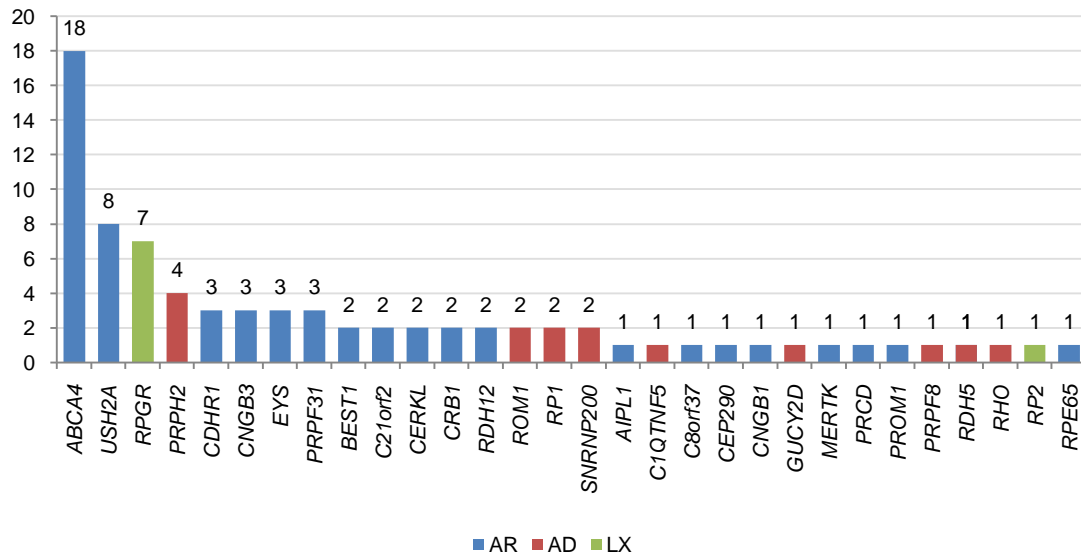


Figura IV.2 Número de casos resueltos con mutaciones en los genes representados.

En los pacientes resueltos, se identificaron 152 variantes patogénicas o probablemente patogénicas, de las cuales 113 eran variantes únicas y, de éstas, 38 mutaciones eran noveles. Del total de mutaciones únicas, 45% (51) eran de cambio de sentido o *missense*, 18% (20) de cambio de marco de lectura o *frameshift*, 16% (18) sin sentido o *nonsense*, 12% (14) que afectan al *splicing*, 7% (8) CNV y 2% (2) deleciones o duplicaciones que no alteran el marco de lectura (*in frame del/dup*) (Figura IV.3).

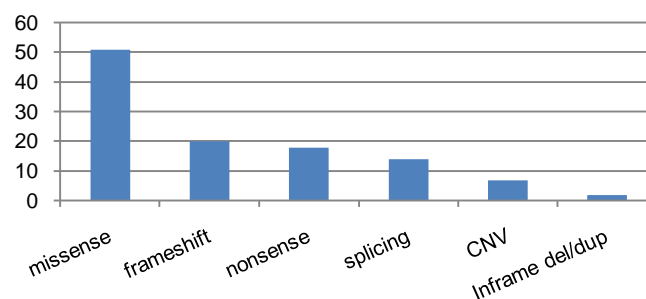


Figura IV.3 Tipo de mutaciones identificadas en los pacientes resueltos.

El análisis de coberturas mediante el programa bioinformático DECoN sugirió deleciones en siete pacientes y duplicaciones en dos pacientes (Tabla IV.2).

Tabla IV.2 CNV identificadas mediante el programa DECoN.

Paciente	Tipo de mutación	Región	Gen	Exón
RP-632	Delección	chr6:64776188-64791961	<i>EYS</i>	32-33
RPN-443	Delección	chr6:66005724-66006043	<i>EYS</i>	12
RPN-602	Delección	chr6:65531457-65622655	<i>EYS</i>	16-21
RPN-317	Delección	chr1:94520629-94520908	<i>ABCA4</i>	16
RPN-335	Delección	chr19:54631372-54631835	<i>PRPF31</i>	10-11
RPN-442	Delección	chr2:112656243-112786484	<i>MERTK</i>	Completo
RPN-434	Delección	chr1:197237478-197447041	<i>CRB1</i>	Completo
RPN-297	Duplicación	chr11:62380729-62382341	<i>ROM1</i>	Completo
RPN-461	Duplicación			

Las deleciones en los genes *EYS*, *ABCA4* y *PRPF31* se confirmaron en los pacientes y se segregaron en los familiares mediante MLPA. La delección en heterocigosis del gen completo *MERTK* en la paciente RPN-442 y la delección en heterocigosis del gen completo *CRB1* en el paciente RPN-434 fueron confirmadas mediante array genómico. La paciente RPN-442 presentó una delección de 1,8 Mb (chr2:111371701-113132395), incluyendo los genes *BUB1*, *BCL2L11*, *ANAPC1*, *MERTK*, *FBLN7*, *RGPD8* y *RGPD5*. Excepto *MERTK*, el resto de genes no se asocian a ninguna DHR. El paciente RPN-434 presentó dos deleciones, una de 418 Kb (chr1:197209166-197627439) que afecta los genes *CRB1* y *DENND1B*, y otra de 391 Kb (chr9:2392405-2783187) que afecta a los genes *FLJ35024*, *VLDLR* y *KCNV2*, con significado clínico desconocido para el resto de genes implicados. De los cinco genes delecionados, *CRB1* y *KCNV2* se asocian con RP y distrofia de conos, respectivamente, ambas de herencia AR. El resto de genes delecionados no se asocian con DHR.

3. RECLASIFICACIÓN DE PACIENTES

De acuerdo con los resultados de la secuenciación, se diagnosticaron genéticamente 16 (48%) de las 33 familias inicialmente clasificadas como sRP (retinosis pigmentaria esporádica). De las cuales, 13 presentaron mutaciones en genes con herencia AR, 2 con herencia AD (fRPN-175 y fRPN-233 con mutaciones en *PRPF31*) y 1 ligada al X (fRPN-158 con mutación en *RPGR*). De las 17 familias inicialmente clasificadas como arRP se resolvieron el 65% (11) (Tabla IV.3) y se reclasificó una de ellas a adRP (fRPN-168 con mutación en *PRPF31*) (Anexos, Tabla VIII.8).

De las 19 familias inicialmente clasificadas como adRP se resolvieron el 58% (11), reclasificando a la familia fRPN-110 como arRP por presentar mutaciones en *CNGB1* y a las familias fRPN-8, fRPN-45, fRPN-97 y fRPN-174 en LX-RP por presentar mutaciones en *RPGR* (Anexos, Tabla VIII.8).

De los 21 casos inicialmente clasificados como STGD se resolvieron el 86% (18), de los cuales se reclasificó a la familia fRPN-39 con mutaciones en *BEST1* a DM de Best y a la familia fRPN-100 con mutación en *C1QTNF5* en degeneración retiniana de inicio tardío (DRIT). Respecto a la familia fRPN-125, inicialmente clasificada como DM de Best AD, se reclasificó a distrofia de conos AD por presentar una mutación en *GUCY2D*. Por último, la familia que fue inicialmente clasificada como distrofia coroidea areolar central (fRPN-167) se reclasificó a acromatopsia congénita con mutaciones en *CNGB3* (Anexos, Tabla VIII.8). En total, se reclasificaron, ya sea por el patrón de herencia o por la entidad clínica, el 10% (13) de las 124 familias incluidas.

Tabla IV.3 Clasificación clínica y de modo de herencia de los pacientes después del estudio genético y tasa diagnóstica calculada para cada entidad clínica.

Clasificación	n	(%) Tasa diagnóstica	Resueltos	Incompletos	No resueltos
sRP	33	48	16	4	13
arRP	17	65	11	1	6
adRP	19	58	11	1	7
xRP	3	67	2	0	1
Fundus albipuntatus	1	100	1	0	0
sDCB	7	57	4	2	1
arDCB	1	100	1	0	0
Acromatopsia	1	100	1	0	0
sACL	5	60	3	0	2
arACL	1	100	1	0	0
sSTGD	17	82	14	0	3
arSTGD	4	100	4	0	0
adSTGD	3	67	2	1	0
sBest	5	20	1	3	1
arBest	1	0	0	1	0
adBest	1	100	1	0	0
DFVA	2	50	1	1	0
D. en patrón del EPR	1	0	0	0	1
DCACB	1	0	0	1	0
DCAC	1	100	1	0	0
Total	124		75	15	34

Las letras antes de las abreviaturas indican el modo de herencia: ad: autosómico dominante; ar: autosómico recesivo; x: ligado al X; s: esporádico. Abreviaturas: ACL: amaurosis congénita de Leber; Best: enfermedad de Best; D: distrofia; DCAC: distrofia coroidea areolar central; DCACB: distrofia coroidea anular concéntrica benigna; DCB: distrofia de conos y bastones; DFVA: distrofia foveomacular viteliforme del adulto; RP: retinosis pigmentaria; STGD: enfermedad de Stargardt.

4. CORRELACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO

4.1. Variabilidad fenotípica intra e interfamiliar

Los pacientes RPN-234 y RPN-552 de la familia fRPN-100 fueron diagnosticados de distrofia macular a la edad de 56 y 55 años respectivamente (examen oftalmológico de RPN-552 no disponible). El paciente RPN-234 empezó con disminución de la agudeza visual y nictalopía en la década de los 50. A los 65 años su agudeza visual era de movimiento de manos en ambos ojos, en el examen de fondo de ojo se observó una gran atrofia central que afectaba a la mácula y media periferia de ambos ojos, y la OCT reveló atrofia severa del EPR y coroides con adelgazamiento de la capa sub-EPR (Figura IV.4 B-C). La secuenciación del panel de genes identificó la mutación *C1QTNF5*: p.(Pro188Leu) en RPN-234, no descrita anteriormente y que se clasificó como probablemente patogénica de acuerdo a los criterios de la ACMG. El análisis de segregación familiar identificó la mutación en su madre (RPN-552), en su hermana (RPN-509) y en su hija (RPN-640) (Figura IV.4 A), estas dos últimas no diagnosticadas clínicamente. El examen oftalmológico realizado posteriormente al estudio genético en la paciente RPN-509 a la edad de 63 años mostró una agudeza visual de 0,9/0,7 (OD/OI) y atrofia asimétrica y bilateral de la capa externa de la retina y coroides (Figura IV.4 D-I). El estudio electrofisiológico realizado mostró un PEV-P alterado, ERG-G con severa afectación de predominio en escotópicas y ERG-MF con alteración de predominio periférico, compatible con retinopatía periférica. Dicha paciente afirmó padecer nictalopía y mala visión central en ambos ojos desde hacía 4 años. El examen oftalmológico en la paciente RPN-640 a los 40 años de edad reveló múltiples drusas en el área temporal de la retina en el fondo de ojo, correspondiendo con anomalías del EPR, drusas y atrofia coroidal periférica en la OCT (Figura IV.4 J-O). Sin embargo, la paciente no tenía ninguna molestia visual.

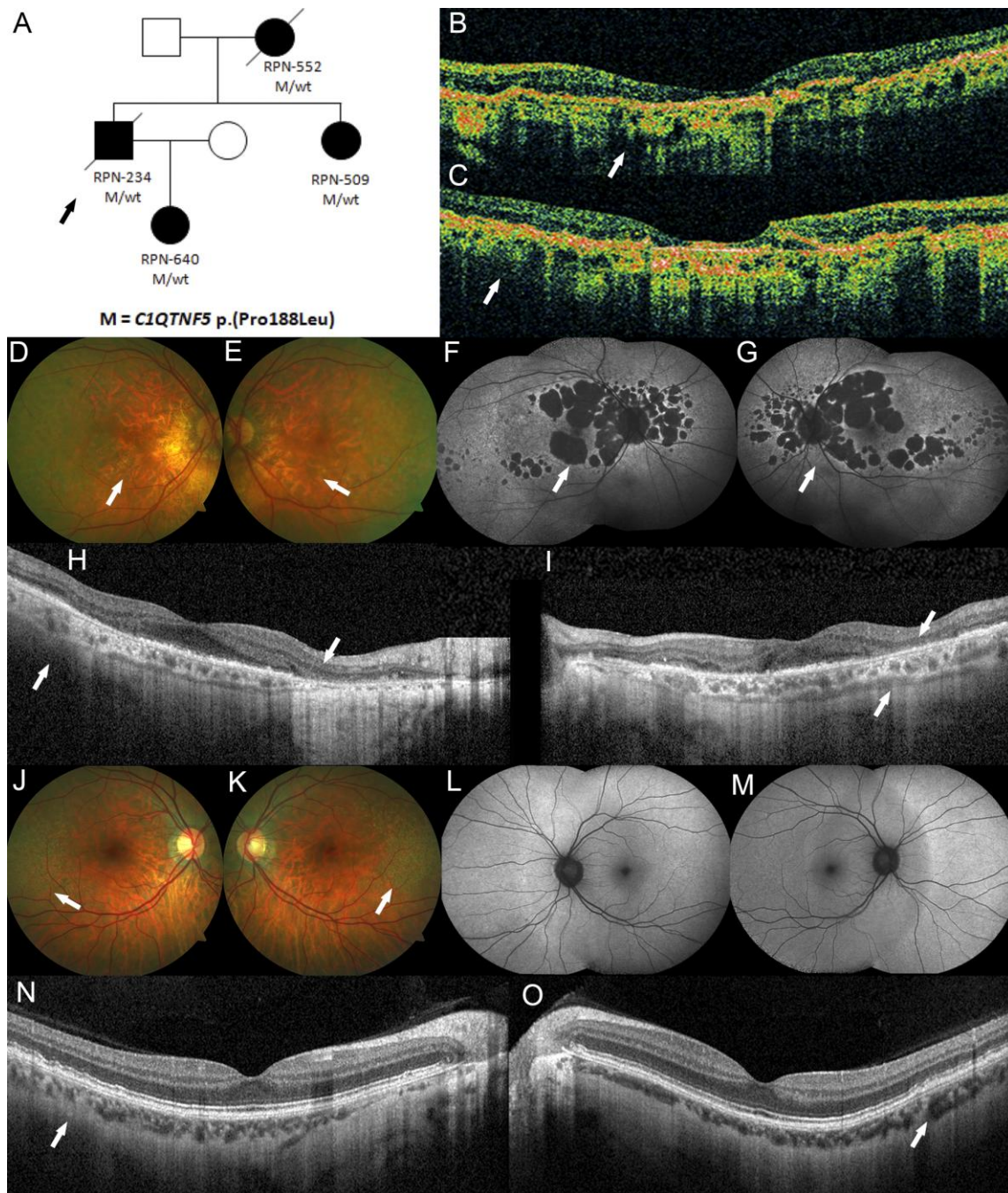


Figura IV.4 Datos clínicos de la familia fRPN-100. (A) Segregación familiar de la mutación en *C1QTNF5* en la familia fRPN-100 (la flecha indica el probando). (B, C) Paciente RPN-234 a los 65 años: la tomografía de coherencia óptica (optical coherence tomography, OCT) muestra atrofia marcada tanto de las capas retinianas como corioidea (flechas). (D, E) Paciente RPN-509 a los 64 años: en las imágenes del fondo de ojo se observan áreas de atrofia retiniana central y peripapilar (flechas); (F, G) las imágenes de autofluorescencia de fondo de ojo muestran áreas de hipoautofluorescencia, serpinginosa-like, afectando la fóvea y coincidiendo con las áreas de atrofia (flechas); (H, I) la OCT revela atrofia asimétrica y bilateral de las capas externas de la retina más marcadas en el ojo izquierdo (segmento interno/ segmento externo, membrana limitante externa y EPR) y coroides (flechas), el ojo derecho respeta levemente la región subfoveal. Paciente RPN-640 a los 39 años: (J, K) las imágenes de fondo de ojo muestran múltiples drusas en el área temporal de la retina en ambos ojos como único hallazgo (flechas), (L, M) las imágenes de autofluorescencia de fondo de ojo son normales, (N, O) la OCT revela anomalías en el EPR correspondiendo con las áreas de la retina con drusas y atrofia corioidea en ambos ojos (flechas).

También se observó variabilidad fenotípica intrafamiliar en las familias fRPN-43 y fRPN-BT. Las hermanas RPN-113 y RPN-114 de la familia fRPN-43 con la mutación *CERKL*: p.(Arg283*) en homocigosis debutaron con síntomas diferentes. La paciente RPN-113 inició en la adolescencia con nictalopía, en la década de los 20 comenzó a notar disminución del campo visual y discromatopsia y alrededor de los 40 años refirió disminución de la agudeza visual. Sin embargo, la paciente RPN-114 manifestó disminución de la agudeza visual y discromatopsia en la década de los 20, y nictalopía con disminución del campo visual a partir de los 40 años. A la pacientes RPN-113 se la clasificó como RP mientras que a la paciente RPN-114 como DCB (Anexos, Tabla VIII.1). Por otra parte, en la familia fRPN-BT, los 3 hermanos afectados manifestaron fotofobia desde la infancia. Sin embargo, los pacientes RPN-543 y RPN-547 refirieron disminución de la agudeza visual en la adolescencia, mientras que el hermano RPN-545 refirió constricción del campo visual. En los 3 hermanos se identificó la mutación *PROM1*: p.(Tyr452Leufs*13) en homocigosis. Los pacientes RPN-543 y RPN-547 se clasificaron como DCB y el paciente RPN-545 como RP (Anexos, Tabla VIII.1).

En los pacientes estudiados, se observó variabilidad fenotípica interfamiliar entre la paciente RPN-113 de la familia fRPN-43 diagnosticada de RP y la paciente de la familia fRPN-211 diagnosticada de DCB, ambas con la mutación *CERKL*: p.(Arg283*) en homocigosis. También ocurrió variabilidad fenotípica interfamiliar entre los pacientes de las familias fRPN-159 y fRPN-185 diagnosticados de DCB y los pacientes de la familia fRPN-217 diagnosticados de RP, las cuales comparten la mutación *CDHR1*: c.1485+2T>C en homocigosis (Anexos, Tabla VIII.1).

4.2. Pacientes con mutaciones en *RPGR*

Entre las 7 familias resueltas con mutaciones en *RPGR* sumaron 25 individuos con variantes patogénicas en este gen: 10 hombres y 15 mujeres. Todos los hombres excepto el paciente RPN-343 presentaban RP de inicio temprano (≤ 10 años de edad). De las mujeres portadoras, el 53% (8) estaban afectadas de RP, 4 de ellas presentaron asimetría interocular (Figuras IV.5 - IV.8), y el resto eran asintomáticas (Tabla IV.4). En la familia fRPN-158, el probando y su madre asintomática tenían la mutación *RPGR*: p.(Asn305Lysfs*41) además de la mutación *RHO*: p.(Cys140Ser), clasificada por los autores como probablemente patogénica (Macke et al 1993). Sin embargo, el examen oftalmológico realizado posteriormente al estudio genético en la portadora asintomática evidenció únicamente miopía magna a la edad de 43 años.

Tabla IV.4 Datos clínicos y genotipo de los pacientes con mutaciones en *RPGR*.

ID familia	ID paciente	Sexo	Edad ^a (años)	Edad ^b (años)	AV (escala decimal)	CV, OD/OI (VFI%, OD/OI)	Fondo de ojo	OCT	Exón	Mutación	Ref.
fRPN-142	RPN-301	H	2	20	0,3/0,4	10°-15° AO (28/27)	Típico de RP	Atrofia con adelgazamiento del NE con afectación central AO			
	RPN-302	H	5	10	0,9/1,0	ND	Disminución transparencia ERP con visualización de la coroides	Atrofia con adelgazamiento del NE con afectación central AO	i3	c.247+2T>A	Novel
	RPN-300	M	40	ND	ND	ND	ND	ND			
	RPN-364	M	A	44	0,4/0,8	(90/97)	Fondo miópico sin RP	SHP			
	RPN-367	M	A	43	PL (ambliope - 8D)/1	(86/99)	Fondo miópico sin RP	SHP			
fRPN-158	RPN-323	H	2	16	1,0/1,0	ND	Placas de atrofia retiniana periférica	Adelgazamiento del NE con afectación central AO	8	p.(Asn305Lysfs*41)	(Carss et al. 2017)
	RPN-412	M	A	43	0,8/0,8	(95/92)	Miopía magna con coroidosis miópica difusa bilateral	SHP			
fRPN-GB	RPN-26	H	4	ND	ND	ND	ND	ND			
	RPN-60	M	40	67	0,8/0,8	>10°/<10° (64/16)	Degeneración retiniana asimétrica	Pérdida de la capa de fotorreceptores a nivel parafoveal OI	12	c.1506+1; p.?	Novel
	RPN-560	M	25	51	0,5/0,5	ND	Alteraciones pigmentarias en periferia media	ND			
	RPN-27	M	A	58	1,0/1,0	ND	SHP	SHP			

ID familia	ID paciente	Sexo	Edad ^a (años)	Edad ^b (años)	AV (escala decimal)	CV, OD/OI (VFI%, OD/OI)	Fondo de ojo	OCT	Exón	Mutación	Ref.
fRPN-139	RPN-296	H	3	15	0,8/0,8	ND	Típico de RP	Pérdida de la capa de fotorreceptores a nivel parafoveal AO			
	RPN-361	H	4	ND	ND	ND	ND	ND			
	RPN-375	H	4	ND	ND	ND	ND	ND	ORF15	p.(Gly766Asnfs*48)	Novel
	RPN-373	M	A	ND	ND	ND	ND	ND			
	RPN-374	M	A	26	1,0/1,0	(100/100)	Espículas aisladas en periferia	Engrosamiento MLI OD			
fRPN-45	RPN-376	M	A	52	1,0/1,0	ND	SHP	SHP			
	RPN-116	H	10	ND	ND	ND	ND	ND			(D. Y. Wang et al. 2005)
	RPN-117	M	39	39	ND	<10°/20°	ND	ND	ORF15	p.(Lys786Thrfs*23)	
fRPN-97	RPN-231	H	8	16	0,8/0,8	10°-15° AO (33/33)	Típico de RP	Atrofia con adelgazamiento del NE con afectación central AO			
	RPN-230	M	15	52	1,0/0,05	Afectación nasal/ 0° (65/0)	Afectación temporal en OD, afectación extensa en OI	Adelgazamiento del NE con afectación central en OI	ORF15	p.(Gly817Lysfs*2)	(Vervoort et al. 2000)
	RPN-437	M	A	ND	ND	ND	ND	ND			
	RPN-440	M	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
fRPN-174	RPN-343	H	25	34	0,3/0,3	ND	Típico de RP	Adelgazamiento severo del NE AO			
	RPN-487	M	ND	67	NPL (ambliope)/ 0,8	ND	Típico de RP	Adelgazamiento del NE en periferia, OD difícil valorar por ambliopía	ORF15	p.(Glu916Lysfs*173)	Novel

^aEdad de inicio de la enfermedad. ^bEdad del paciente en el momento de la exploración. Típico de RP: atenuación vascular, palidez papilar y espículas de pigmento.

Abreviaciones. A: asintomática, AO: ambos ojos, EPR: epitelio pigmentario retiniano, H: hombre, M: mujer, MLI: membrana limitante interna, ND: no disponible, NE: neuroepitelio, NPL: no percibe luz, OD: ojo derecho, OI: ojo izquierdo, PL: percibe luz, SHP: sin hallazgos patológicos, VFI: *visual field index* (índice de campo visual).

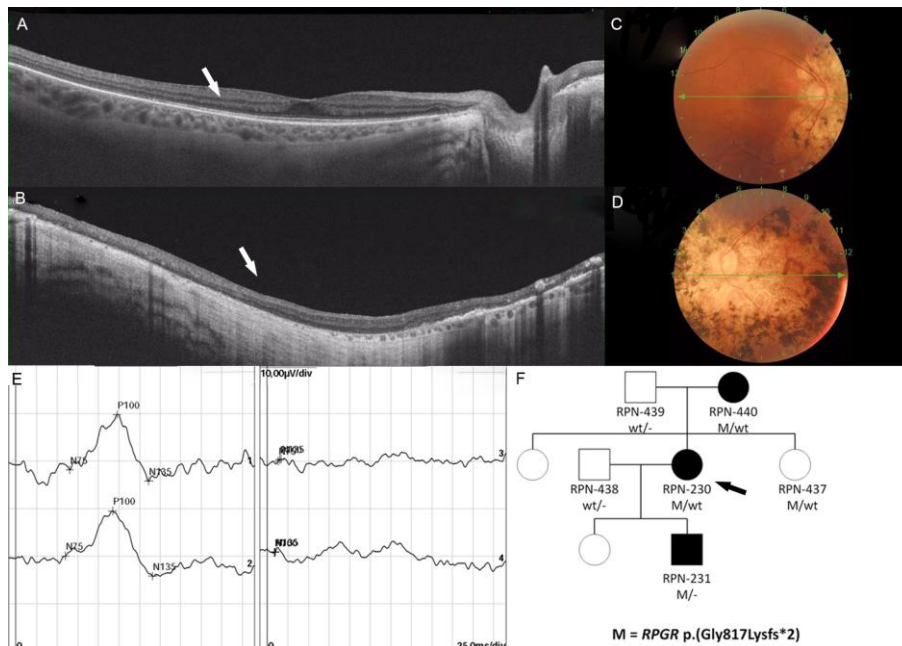


Figura IV.5 Asimetría interocular. Datos clínicos de la paciente RPN-230 a los 52 años. Las imágenes de tomografía de coherencia óptica muestran (A) una histología retiniana preservada en ojo derecho (OD) y (B) una completa atrofia retiniana en ojo izquierdo (OI). Las imágenes de fondo de ojo muestran una clara degeneración retiniana asimétrica entre OD (C) y OI (D), aunque también se observa algo de degeneración retiniana cerca del disco óptico en OD. (E) Los potenciales evocados visuales revelan un ligero retraso en las latencias en OD y sin respuesta valorable para OI. (F) Segregación familiar de la mutación en *RPGR* en la familia fRPN-97.

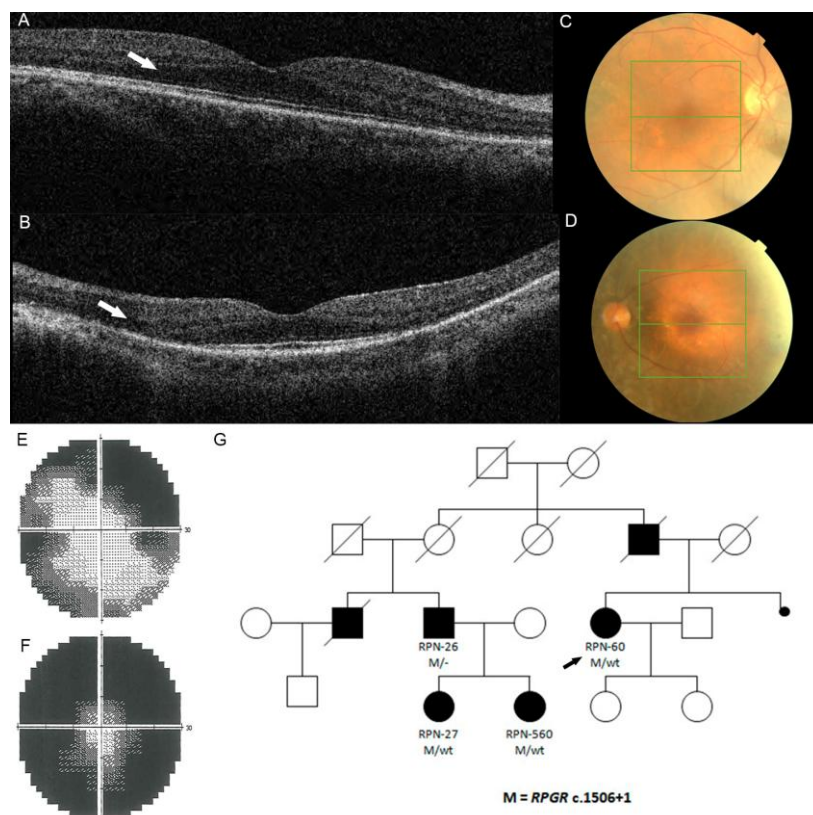


Figura IV.6 Asimetría interocular. Datos clínicos de la paciente RPN-60 a los 57 años. Las imágenes de tomografía de coherencia óptica muestran (A) una histología retiniana preservada en ojo derecho (OD) y (B) pérdida de la capa de fotorreceptores a nivel parafoveal en ojo izquierdo (OI). Las imágenes de fondo de ojo muestran una clara degeneración retiniana asimétrica entre OD (C) y OI (D). Las imágenes

de la campimetría muestran conservación de los 10° centrales en OD (E) y un campo visual <10° en OI (F). (G) Segregación familiar de la mutación en *RPGR* en la familia fRPN-GB.

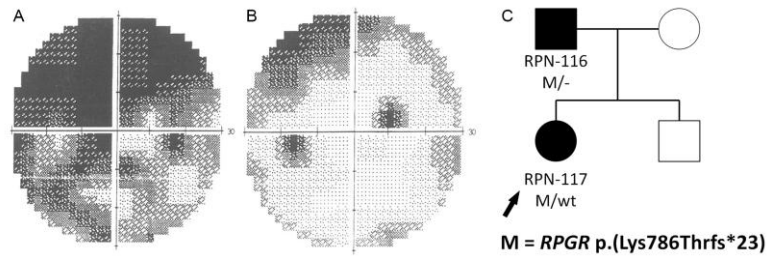


Figura IV.7 Asimetría interocular. Datos clínicos de la paciente RPN-117 a los 39 años. Las imágenes de la campimetría muestran un campo visual reducido <10° en ojo derecho (A) y conservación de los 10° centrales en ojo izquierdo (B). (C) Segregación familiar de la mutación en *RPGR* en la familia fRPN-45.

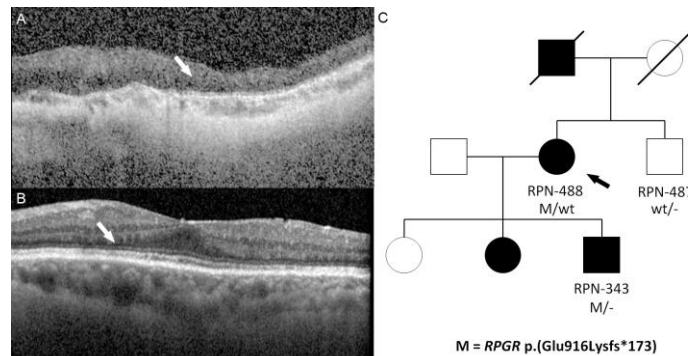


Figura IV.8 Asimetría interocular. Datos clínicos de la paciente RPN-488 a los 67 años. Las imágenes de tomografía de coherencia óptica muestran (A) una completa atrofia retiniana en ojo derecho (OD) y (B) una histología retiniana conservada en ojo izquierdo. (C) Segregación familiar de la mutación en *RPGR* en la familia fRPN-174.

4.3. Pacientes con mutaciones en *ABCA4*

Los pacientes resueltos con mutaciones en *ABCA4* se clasificaron de acuerdo a la edad en la que empezaron a manifestar disminución de la agudeza visual: temprano (≤ 10 años), medio (11-30 años) y tardío (> 30 años), con la finalidad de determinar el subtipo fenotípico y correlacionarlo con alelos *ABCA4* específicos según el modelo de (Maugeri et al. 1999) (Tabla IV.5). Para esta clasificación se tuvieron en cuenta todos los pacientes con mutaciones identificadas en ambos alelos del gen *ABCA4*, es decir, 23 pacientes procedentes de 18 familias no relacionadas. De los 23 pacientes, el 30% (7) tuvieron un inicio temprano de la enfermedad con una media de edad de 6,3 años (2-10), el 44% (10) comenzaron a manifestar sintomatología en una edad media con una media de edad de 16,5 años (13-24) y el 26% (6) tuvieron un inicio tardío con una media de edad de 39,3 años (33-47).

En la Tabla IV.5 se ha asignado a cada alelo identificado en la cohorte de este estudio el subtipo fenotípico según un estudio *in silico* de más de 5.000 variantes en

ABCA4 realizado por (Cornelis et al. 2017) según el modelo de correlación fenotipo-genotipo de Maugeri et al.

El paciente con fenotipo más severo dentro de este grupo fue RPN-478, diagnosticado de DCB de inicio a los 3 años, en el que se identificaron las mutaciones: p.(Tyr856*) y c.4773+1G>T en heterocigosis compuesta. El resto de pacientes fueron diagnosticados de STGD. El alelo mutado más prevalente en estos 23 pacientes fue p.(Arg1129Leu) con una prevalencia del 26% (12/46), seguido del alelo p.(Gly1961Glu) con una prevalencia del 11% (5/46).

Tabla IV.5 Pacientes con mutaciones bialélicas en *ABCA4* clasificados según subtipo fenotípico.

ID familia	ID paciente	^a Edad (años)	Alelo 1	Referencia	Clas.	Alelo 2	Referencia	Clas.
Inicio temprano								
fRPN-51	RPN-129	9	p.(Glu328*)	(Fishman et al. 2003)	-	p.(Arg602Trp)	(Lewis et al. 1999)	S
fRPN-132	RPN-289	9	p.(Pro62Ala)	Novel	-	p.(Arg681*)	(Maugeri et al. 1999)	-
fRPN-132	RPN-587	8	p.(Pro62Ala)	Novel	-	p.(Arg681*)	(Maugeri et al. 1999)	-
fRPN-179	RPN-379	2	p.(Arg1129Leu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)	S	c.5714+1G>A	Novel	-
fRPN-187	RPN-410	10	p.(Gly991Val)	(Fujinami, Zernant, et al. 2013)	-	c.4253+4C>T	(Webster et al. 2001)	-
fRPN-212	RPN-478	3	p.(Tyr856*)	(Fujinami, Zernant, et al. 2013)	-	c.4773+1G>T	(Rosa Riveiro-Alvarez et al. 2013)	-
fRPN-219	RPN-507	3	p.(Arg1129Leu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)	S	p.(Leu1940Pro)	(Paloma et al. 2001)	S
Inicio medio								
fRPN-50	RPN-125	15	p.(Arg1129Leu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)	S	p.(Glu1330*)	(Rosa Riveiro-Alvarez et al. 2013)	S
fRPN-50	RPN-126	15	p.(Arg1129Leu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)	S	p.(Glu1330*)	(Rosa Riveiro-Alvarez et al. 2013)	S
fRPN-126	RPN-283	19	p.(Arg1129Leu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)	S	c.4253+5G>A	(Rivera et al. 2000)	S
fRPN-137	RPN-294	24	p.(Arg1129Leu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)	S	p.(Arg1129Leu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)	S
fRPN-153	RPN-317	13	p.[Arg1129Leu; del ex. 16]	Novel	-	p.(Arg602Trp)	(Lewis et al. 1999)	S
fRPN-162	RPN-327	15	p.(Arg212Cys)	(Gerber et al. 1998)	S	p.(Arg212Cys)	(Gerber et al. 1998)	S
fRPN-173	RPN-342	14	p.(Arg1129Leu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)	S	p.(Ser1116Phe)	Novel	-
fRPN-206	RPN-463	20	p.(Gly1961Glu)	(Rivera et al. 2000)	L	p.(Val1973*)	(Allikmets, Singh, et al. 1997)	S
fRPN-219	RPN-508	15	p.(Arg1129Leu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)	S	p.(Leu1940Pro)	(Paloma et al. 2001)	S
fRPN-220	RPN-510	15	p.[Leu541Pro; p.Ala1038Val]	(Fishman et al. 1999)	M-S	p.(Gly1961Glu)	(Allikmets, Singh, et al. 1997)	L
Inicio tardío								
fRPN-51	RPN-544	36	p.(Glu328*)	(Fishman et al. 2003)	S	p.(Gly1961Glu)	(Allikmets, Singh, et al. 1997)	L
fRPN-51	RPN-128	40	p.(Arg602Trp)	(Lewis et al. 1999)	S	p.(Gly1961Glu)	(Allikmets, Singh, et al. 1997)	L
fRPN-133	RPN-290	33	p.(Pro1486Leu)	(Lewis et al. 1999)	-	p.(Pro1486Leu)	(Lewis et al. 1999)	-
fRPN-134	RPN-291	35	p.(Gly863Ala)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)	L	p.(Leu1104Pro)	Novel	-
fRPN-199	RPN-445	47	p.(Arg1129Leu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)	S	p.(Gly1961Glu)	(Allikmets, Singh, et al. 1997)	L
fRPN-239	RPN-609	45	p.(Arg1129Leu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)	S	p.(Met61Thr)	Novel	-

^a Edad de inicio de la disminución de la agudeza basada en el autoinforme de paciente. Todos los pacientes fueron clínicamente clasificados como STGD a excepción de RPN-478 que fue diagnosticado de DCB. Abreviaciones: Clas.: clasificación según (Cornelis et al. 2017); L: leve; M: moderado; S: severo

5. PACIENTES CON DIAGNÓSTICO GENÉTICO INCOMPLETO

Se identificaron 15 familias con un diagnóstico genético incompleto, de las cuales las familias fRPN-156 y fRPN-161 presentaron mutaciones en dos genes diferentes. De las 13 familias restantes, ocho presentaron mutaciones en genes de herencia AR y cinco en genes que pueden presentar tanto herencia AR como AD (Tabla IV.6). Mediante estudios de MLPA se descartaron grandes deleciones o duplicaciones en los pacientes portadores de una mutación en *ABCA4*, *BEST1* o *USH2A*. También se descartaron mediante secuenciación Sanger las mutaciones intrónicas profundas descritas previas al estudio y no incluidas en el diseño del panel en los pacientes portadores de una mutación en *ABCA4* o *USH2A* (Anexos, Tabla VIII.3).

En la paciente RPN-536 con RP esporádico, se identificaron las mutaciones *CNGA1*:p.(Thr631Met) y *CNGB1*:p.(Phe1051Leufs*12) en heterocigosis compuesta. Curiosamente, las proteínas codificadas por estos genes son miembros del mismo canal iónico. Por otra parte, en las hermanas RP-44 y RP-36, inicialmente clasificadas como adRP, una de ellas con RP unilateral, se identificaron las mutaciones p.(Asn803Ser) y (p.Glu129Lys) en heterocigosis compuesta en el gen *PDE6B*. Sin embargo, un hermano asintomático era también heterocigoto compuesto para ambas mutaciones. Posteriormente, el individuo asintomático fue sometido a un estudio oftalmológico en el que se le descartó la RP, por lo que la familia fRPN-SF continúa sin diagnóstico genético completo.

Tabla IV.6 Mutaciones identificadas en pacientes con diagnóstico genético incompleto.

ID fam	ID pac/ Sexo ^a E	Fenotipo	Gen	Herencia	Alelo 1		Ref
					Nucleótido	Proteína	
fRPN-192	RPN-427/H/23	DCACB	RGS9	AR	c.1546C>T	p.(Arg516*)	Novel
fRPN-156	RPN-320/M/30	DCB	<i>PDE6H</i>	AR	c.35C>G	p.(Ser12*)	(Kohl et al. 2012)
			<i>ABCA4</i>	AR	c.5908C>T	p.(Leu1970Phe)	(Allikmets, Singh, et al. 1997)
fRPN-130	RPN-287/M/5	DMB	CNGA1	AR	c.304dup	p.(Arg102Lysfs*12)	Novel
fRPN-157	RPN-322/H/57	DMB	BEST1	AR/AD	c.393C>A	p.(Tyr131*)	Novel
fRPN-161	RPN-326/H/40	DMB	<i>BEST1</i>	AR/AD	c.698C>A	p.(Pro233Gln)	(Marchant et al. 2007)
			<i>ABCA4</i>	AR	c.5642C>T	p.(Ala1881Val)	(Testa et al. 2012)
fRPN-165	RPN-330/H/36	DMB	<i>ABCA4</i>	AR	c.5882G>A	p.(Gly1961Glu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
fRPN-207	RPN-466/M/6	DMB	<i>BEST1</i>	AR/AD	c.11C>T	p.(Thr4Ile)	(Tian et al. 2014)
fRPN-196	RPN-441/M/ND	DM STGD-like	<i>NR2E3</i>	AR/AD	c.932G>A	p.(Arg311Gln)	(Haider et al. 2000)
fRPN-155	RPN-319/M/6	RP	<i>PROM1</i>	AR/AD	c.1354dup	p.(Tyr452Leufs*13)	(Pras et al. 2009)
fRPN-170	RPN-339/H/34	RP	<i>ABCA4</i>	AR	c.5908C>T	p.(Leu1970Phe)	(Allikmets, Singh, et al. 1997)
			<i>CNGB1</i>	AR	c.3150del	p.(Phe1051Leufs*12)	(Nishiguchi et al. 2013)
fRPN-225	RPN-536/M/ND	RP	Alelo 2: CNGA1	AR	c.1892C>T	p.(Thr631Met)	Novel
fRPN-566	RP-1943/M/ND	RP	<i>USH2A</i>	AR	c.2276G>T	p.(Cys759Phe)	(Rivolta et al. 2000)
fRPN-CO	RP-632/M/20	RP	<i>EYS</i>	AR	Del ex. 32-33	p.?	(Audo et al. 2010)
fRPN-MC	RP-49/H/ND	RP	GUCY2D	AR/AD	c.1991A>G	p.(His664Arg)	Novel
fRPN-SF	RP-44/M/12	RP	PDE6B	AR	c.2408A>G	p.(Asn803Ser)	Novel

^aE: Edad en el momento del diagnóstico de la enfermedad.

Abreviaciones. AR: autosómico recesivo; AD: autosómico dominante; DCACB: distrofia coroidea anular congénita benigna; DCB: distrofia de conos y bastones; DMB: distrofia macular de Best; DM STGD-like: distrofia macular Stargardt like; ID: identificación; ND: no disponible; Ref: referencia; RP: retinosis pigmentaria

6. PACIENTES CON MUTACIONES CONCOMITANTES

El 5% (6) de las familias incluidas en el estudio presentaron mutaciones probablemente patogénicas o patogénicas en dos genes diferentes que podrían ser ambos la causa de la DHR. En el caso de la familia fRPN-51, se trata de una combinación de tres mutaciones diferentes en un mismo gen dentro de la misma familia. A continuación, se describe cada una de ellas.

6.1. Familia fRPN-NB

El estudio genético se inició en el paciente RPN-316 en el cual se identificó la mutación *SNRNP200*: p.(Arg681Cys), previamente descrita, mediante la secuenciación del panel de genes. Mediante secuenciación Sanger se fue ampliando el estudio al resto de familiares afectados, confirmándose la mutación en cada uno de ellos: RP-196, RP-198, RP-199, RP-200, RPN-201 y RPN-196 (Figura IV.9). Sin embargo, no se identificó dicha mutación en el paciente RPN-481. Los pacientes con la mutación en *SNRNP200* presentaban una RP de inicio entre los 12-14 años, mientras que el paciente RPN-481 tenía una RP congénita y mucho más avanzada que sus familiares (Tabla IV.7). Posteriormente, al paciente RPN-481 se le secuenció el panel de genes, identificándose la mutación *RP2*: p.(Arg118Cys), previamente descrita.

Una vez segregadas ambas mutaciones en todos los familiares disponibles se identificaron 13 individuos portadores de la mutación *SNRNP200*: p.(Arg681Cys), de los cuales cuatro (RP-414, RP-417, RP-418 y RPN-575), de edades comprendidas entre 26 y 31 años, no presentaban síntomas de la enfermedad en el momento del estudio, sin embargo, solo se pudo descartar la RP mediante pruebas oftalmológicas a las pacientes RP-418 y RPN-575 (Tabla IV.7).

Por otra parte, se identificó la mutación *RP2*: p.(Arg118Cys) en 11 miembros de la familia fRPN-NB, de los cuales 4 eran varones y 7 mujeres (Figura IV.9). De todas las mujeres portadoras de la mutación en *RP2*, solo la paciente RP-573 tenía RP, al resto se le descartó mediante pruebas oftalmológicas (Tabla IV.7). Sin embargo, la paciente RPN-573 junto a su padre (RPN-572), son los únicos familiares estudiados en los que se le han identificado ambas mutaciones, *SNRNP200*: p.(Arg681Cys) y *RP2*: p.(Arg118Cys).

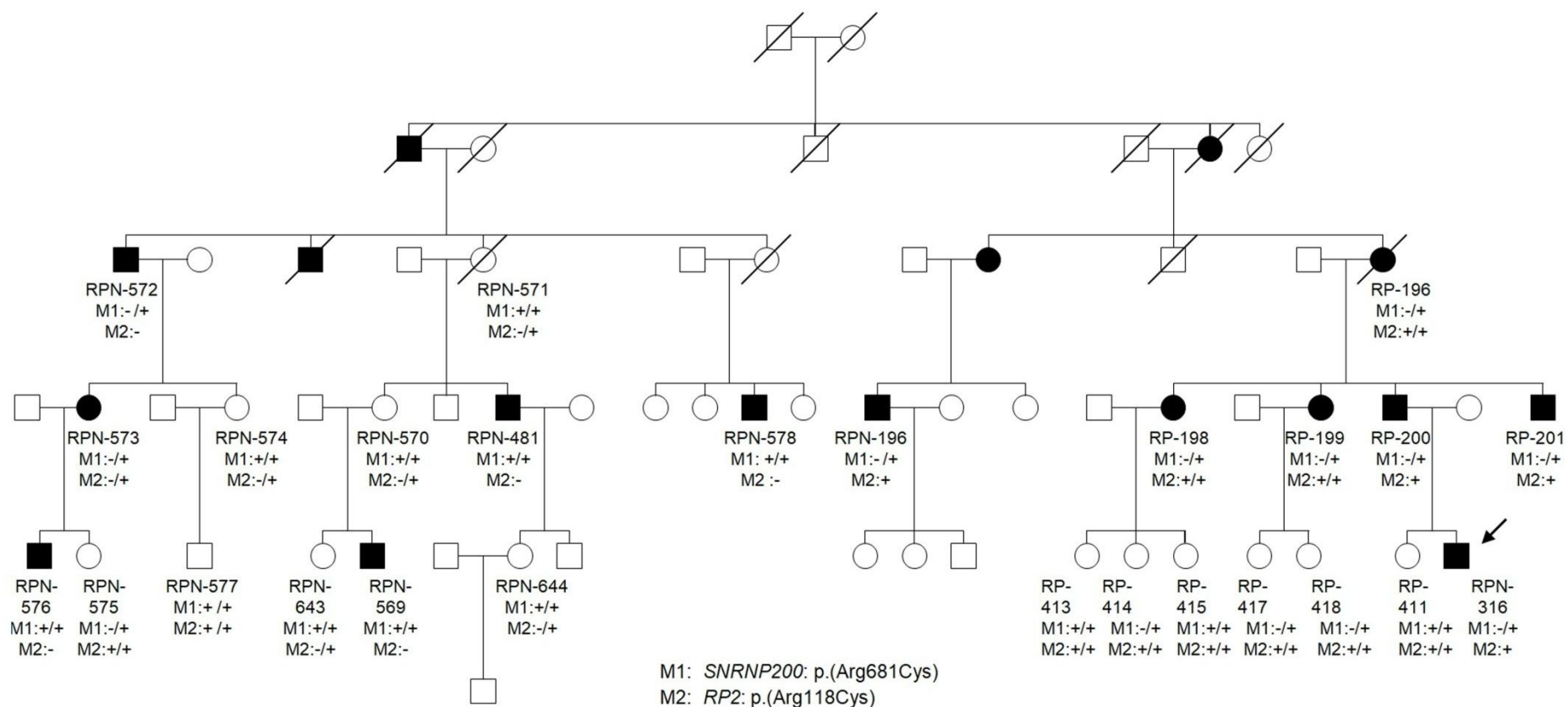


Figura IV.9 Segregación familiar de las mutaciones identificadas en la familia fRPN-NB. +: alelo *wildtype*; -: alelo mutado. La flecha señala al probando.

Tabla IV.7 Datos clínicos y genotipo de los pacientes de la familia fRPN-NB.

ID paciente/ Sexo	^a Edad (años)	^b Edad (años)	AV (escala decimal)	CV, OD/OI (VFI%, OD/OI)	Polo anterior	Fondo de ojo	OCT	PEV-P	ERG-MF	Genotipo
RP-198/M	18	58	CD/0,05	<10°	SHP	Típico de RP	Adelgazamiento del NE, pseudoagujero en OI	Alterado	Afectación de predominio periférico	SNRNP200
RP-199/M	15	56	CD/0,05	<10°	SHP	Típico de RP	Adelgazamiento del NE, EMQ OD	Alterado	Afectación de predominio periférico	SNRNP200
RP-200/H	16	53	0,25/0,25	<10°	SHP, pseudofaquia AO	Típico de RP	Adelgazamiento del NE	Normal	Afectación periférica	SNRNP200
RPN-316/H	15	22	0,5/0,2	20°-30° (70/72)	SHP	Típico de RP	Adelgazamiento del NE, EMQ AO	ND	ND	SNRNP200
RP-418/M	A	30	1,0/1,0	(100/100)	SHP	SHP	SHP	Normal	Normal	SNRNP200
RPN-575/M	A	26	1,0/1,0	(98/97)	SHP	SHP	SHP	ND	ND	SNRNP200
RPN-573/M	6	52	0,3/0,05	<10° (10/11)	Cataratas capsulares AO	RP avanzado	Atrofia con adelgazamiento del NE con afectación central	ND	ND	SNRNP200, RP2
RPN-481/H	2	67	PL/PL	<10°	ND	RP avanzado	ND	ND	ND	RP2
RPN-569/H	ND	38	MM/MM	<10°	SHP	RP avanzado		ND	ND	RP2
RPN-576/H	2	30	0,05/0,05	<10° (10/6)	SHP	Típico de RP	Atrofia con adelgazamiento del NE con afectación central	ND	ND	RP2
RPN-570/M	A			ND	SHP	SHP	SHP	ND	ND	RP2
RPN-574/M	A	57	0,8/0,8	(97/99)	Cámara muy estrecha con iridotomías permeables	SHP		ND	ND	RP2
RPN-643/M	A	41	0,6/0,2	ND	SHP	SHP	SHP	ND	ND	RP2
RPN-644/M	A	35	1,0/0,6	ND	SHP	SHP	SHP	ND	ND	RP2

^aEdad de inicio de la enfermedad. ^bEdad del paciente en el momento de la exploración. Típico de RP: atenuación vascular, palidez papilar y espículas de pigmento
Abreviaciones. A: asintomática, AO: ambos ojos, CD: cuanta dedos, EMQ: edema macular quístico, EPR: epitelio pigmentario retiniano, H: hombre, M: mujer, MLI: membrana limitante interna, MM: movimiento de manos, ND: no disponible, NE: neuroepitelio, OD: ojo derecho, OI: ojo izquierdo, PL: percibe luz, SHP: sin hallazgos patológicos, VFI: *visual field index* (índice de campo visual),

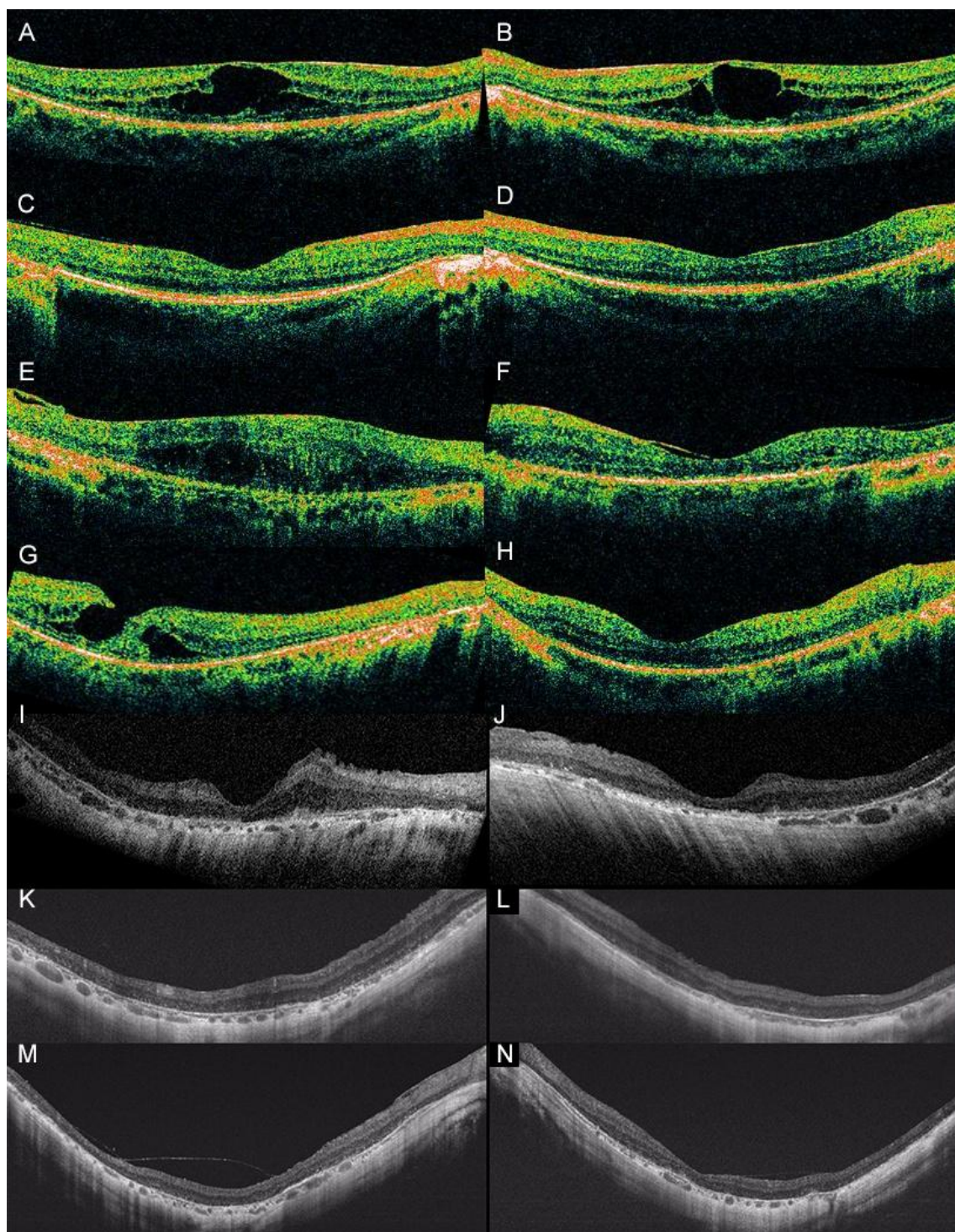


Figura IV.10 Imágenes de OCT de los pacientes de la familia fRPN-NB. Paciente RPN-316 a los 22 años: (A, B) las imágenes de ambos ojos evidencian afectación marcada de la retina a nivel macular con desestructuración de las capas de la retina, además, asocia edema macular quístico (EMQ) en ambos ojos, 411 μm en ojo derecho (OD) (A) y 434 μm en ojo izquierdo (OI) (B) con grandes quistes que son compatibles con la atrofia del tejido retiniano; la agudeza visual del paciente era de 0,5/0,2 (OD/OI). Paciente RP-200 a los 53 años: (C, D) las imágenes de ambos ojos revelan adelgazamiento generalizado de la retina que afecta incluso la zona central de la retina; la agudeza visual del paciente era de 0,25/0,25. Paciente RP-199 a los 56 años: (E, F) las imágenes de ambos ojos revelan atrofia/adelgazamiento muy importante de la retina en el OI y en el OD se evidencia desestructuración de las capas de la retina, además, asocia EMQ en OD (E), 497 μm ; la agudeza visual de la paciente era de CD (cuenta dedos)/0,05. Paciente RP-198 a los 58 años: (G, H) las imágenes de ambos ojos revelan atrofia retiniana muy marcada a nivel central, con imagen de pseudoagujero en OI (H), 310 μm ; la agudeza visual de la paciente era de CD/0,05. Paciente RPN-569 a los 38 años: (I, J) atrofia retiniana muy importante con pérdida casi total de la retina externa, la agudeza visual del paciente era de MM/MM. Paciente RPN-576 a los 30 años: (K, L) atrofia retiniana marcada bilateral. Paciente RPN-573 a los 52 años: (M, N) OCT con adelgazamiento de todas las capas de la retina.

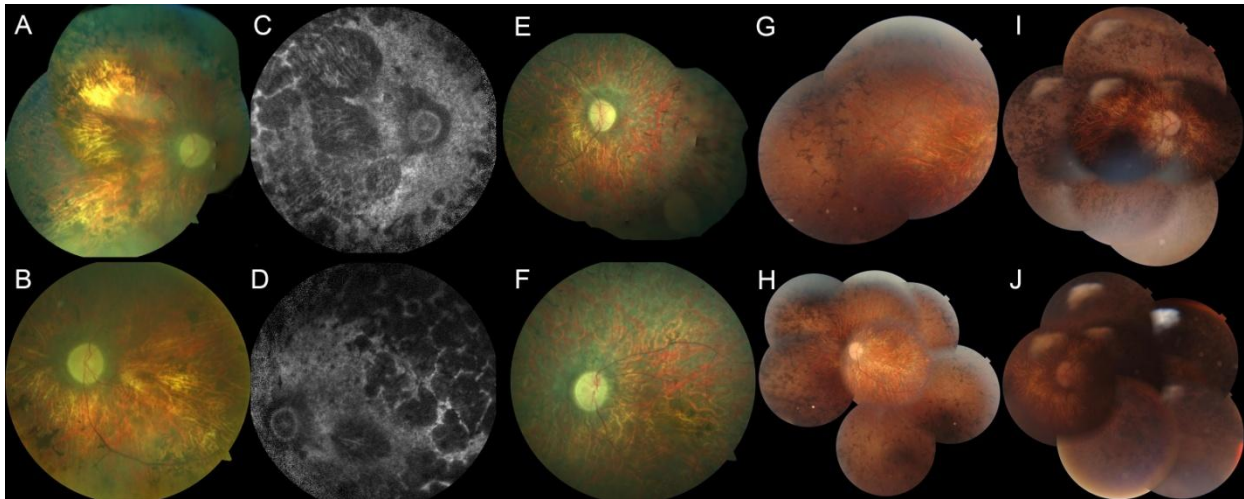


Figura IV.11 Imágenes del fondo de ojo de los pacientes de la familia fRPN-NB. Paciente RPN-481 a los 67 años: (A, B) se observan signos típicos de RP muy avanzada con palidez papilar extrema, casi total ausencia de vascularización retiniana, alteración severa del EPR, espículas óseas de predominio en periferia y atrofia macular; en las imágenes de autofluorescencia (C, D) se observa alteración del EPR con parches de atrofia difusos severos en polo posterior y en periferia retiniana. Paciente RPN-569 a los 38 años: (E, F) se observan signos de RP avanzada con palidez papilar intensa, espículas óseas periféricas y algunas centrales, afilamiento vascular generalizado con vasos muy filiformes y parches de atrofia retiniana periférica. Paciente RPN-576 a los 30 años: (G, H) RP moderada con palidez papilar, espículas óseas periféricas y atrofia retiniana central y periférica. Paciente RPN-573 a los 52 años: (I, J) atrofia retiniana severa que afecta tanto a retina periférica como central bilateral (se ve red coroidea secundaria a atrofia retina) aunque más avanzada en el ojo derecho.

6.2. Familia fRPN-142

Los pacientes RPN-300, RPN-301 y RPN-302 son los únicos afectados de RP en la familia fRPN-142 (Figura IV.12). El paciente RPN-301 fue diagnosticado a los 10 años, cuando ya se observaba afectación incipiente de los 10° grados centrales y espículas de pigmentos en el fondo de ojo. Al diagnóstico, se le realizó un ERG-G, estimulando con luz azul y blanca en condiciones escotópicas y luz blanca y en condiciones fotópicas, en el que no se obtuvieron respuestas valorables ni de bastones, ni mixta, ni de conos. Actualmente, el paciente tiene 20 años de edad y presenta un campo visual residual inferior a 10° grados centrales y una máxima agudeza visual corregida de 0,4/0,5 (OD/OI). En el estudio de fondo de ojo se observa una pigmentación periférica con signos aislados de atrofia y espículas óseas de predominio en periferia media y extrema, palidez papilar y adelgazamiento vascular generalizado. En la OCT se observa un leve adelgazamiento macular central con conservación del perfil foveolar sin aparentes signos de atrofia (Figura IV.13).

El paciente RPN-302 fue diagnosticado de RP a los 6 años, pero refiere nictalopía desde los 5 años. Al diagnóstico presentaba una agudeza visual de 0,3 en ambos ojos, signos de RP en fondo de ojo con transparencia del EPR y visualización de vasos coroideos. En la OCT se observó adelgazamiento de la retina externa incluso a nivel macular. Se le realizaron PEV PATTERN con estímulo damero reversible en el que se obtuvieron respuestas retrasadas en ambos ojos. Se le realizó ERG-G estimulando con luz azul y blanca en condiciones escotópicas y luz blanca en condiciones fotópicas, así como potenciales oscilatorios de forma

simultánea, obteniéndose respuestas prácticamente abolidas en ambos ojos, con mayor afectación en escotópicas. Actualmente el paciente tiene 10 años y presenta una agudeza visual de 0,6 en ambos ojos. En el estudio de fondo de ojo se observa palidez papilar, afinamiento vascular generalizado aunque más acentuado en la periferia donde se llega a ver vasos exangües, atrofia del ERP macular y signos de coroidosis avanzada. La autofluorescencia revela la característica imagen en ojo de buey típica de la alteración del EPR, con hipoautofluorescencia a nivel macular rodeada de un halo de hiperautofluorescencia. En la OCT se evidencia un adelgazamiento de las capas de la retina que afecta a la región central (Figura IV.13).

El estudio del panel de genes en el paciente RPN-301 identificó las mutaciones: c.247+2T>A en *RPGR*, p.(His326GlnfsTer9) en *BEST1* y p.(Tyr199Valfs*2) en *SNRNP200*, las tres se describen por primera vez en este trabajo. El estudio de segregación familiar confirmó la presencia de la mutación en el gen *RPGR* en los otros 2 familiares afectados (RPN-300 y RPN-302). Las hermanas RPN-364 y RPN-367, madres de los pacientes RPN-301 y RPN-302, respectivamente, son también portadoras de la mutación *RPGR*: c.247+2T>A en heterocigosis, sin embargo, a la exploración oftalmológica no presentaron signos de RP, solo una ligera miopía. Por otra parte, el paciente RPN-301 no compartía con sus familiares afectados las mutaciones identificadas en *BEST1* y *SNRNP200*. El estudio de segregación familiar identificó la procedencia paterna de la mutación en *BEST1*, sin embargo, la mutación en *SNRNP200* no se identificó en ninguno de los miembros de la familia, de los que se estudiaron tanto el ADN procedente de sangre periférica como el de saliva.

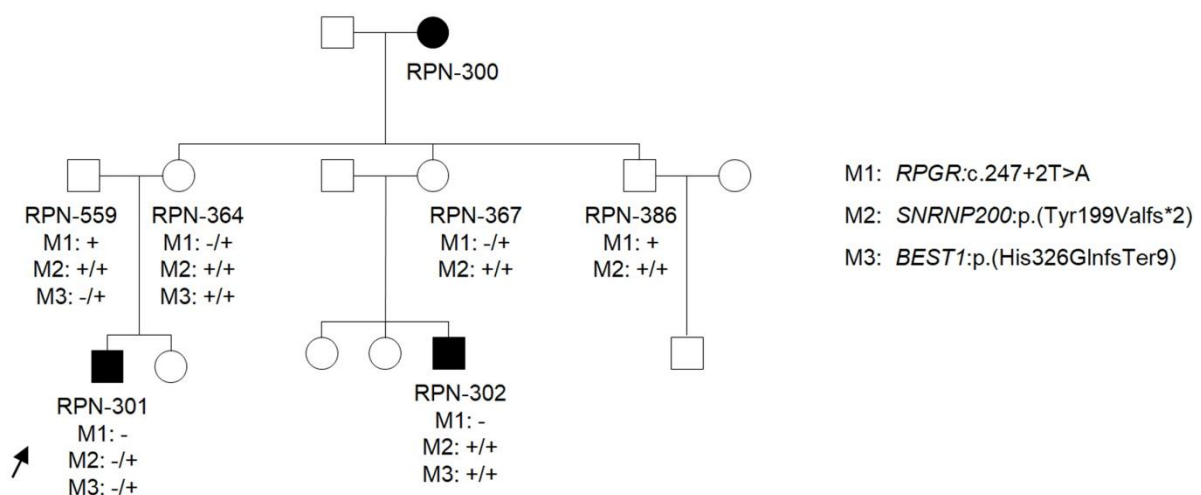


Figura IV.12 Segregación familiar de las mutaciones identificadas en la familia fRPN-142. +: alelo *wildtype*; -: alelo mutado. La flecha señala al probando.

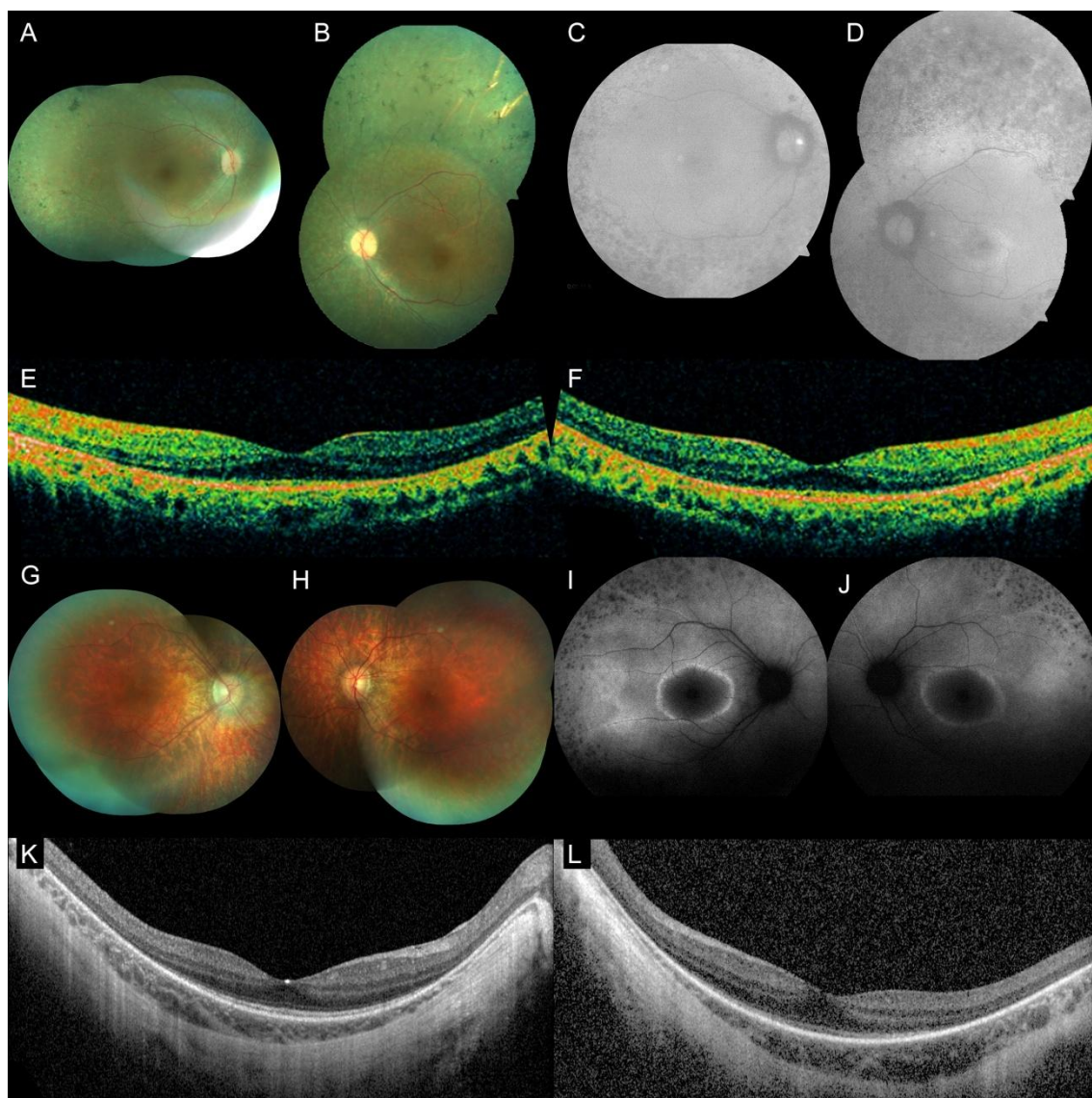


Figura IV.13 Pruebas oftalmoscópicas de los pacientes de la familia fRPN-142. Paciente RPN-301 a los 20 años: tanto en las imágenes de fondo de ojo a color (A, B) como en las de autofluorescencia (C,D) se observa palidez papilar, afilamiento vascular generalizado, espículas óseas de predominio en periferia y signos de atrofia parcheados; la OCT (E, F), que corresponde a una edad del paciente de 15 años, evidencia atrofia con adelgazamiento de la retina que afecta incluso zona central macular; la agudeza visual del paciente era de 0,5/0,5 (OD/OI). Paciente RPN-302 a los 8 años: en el fondo de ojo a color (G, H) se observa palidez papilar, afilamiento vascular generalizado, atrofia del EPR macular y signos de coroidosis avanzada; la autofluorescencia (I, J) muestra una imagen en ojo de buey perifoveal (hipoautofluorescencia rodeada de un halo de hiperautofluorescencia a nivel macular) indicando atrofia del EPR; la OCT (K, M) revela atrofia con adelgazamiento de la retina que, como en el caso anterior, también afecta a la mácula; la agudeza visual del paciente era de 0,6/0,6.

6.3. Familia fRPN-51

En esta familia, tres de los miembros están afectados de enfermedad de STGD (Figura IV.14), con la peculiaridad de que la paciente RPN-129 tiene un inicio temprano (<10 años) y curso severo de la enfermedad, mientras que su padre y su hermano debutaron después de los 30 años de edad. La paciente RPN-129 asiste por primera vez a la consulta del oftalmólogo a los 13 años, presentando en ese momento nistagmus y una agudeza visual de 0,1 en ambos ojos, por lo que se le diagnostica de enfermedad de STGD. Además, refirió pérdida de visión después de ser operada de nistagmus y estrabismo a los 29 años de edad, en ese momento

solo percibía luces y sombras. Sin embargo, su padre (RPN-128) fue diagnosticado a los 43 años, siendo su agudeza visual de 0,6/0,5 (ojo derecho, OD/ojo izquierdo, OI). A los 67 años, se observó en el paciente la formación de cataratas y una agudeza visual de 0,1 en ambos ojos que fue disminuyendo progresivamente, siendo, ya intervenido de cataratas, de 0,05 en ambos ojos a los 69 años (Figura IV.15). Por el contrario, su hermano (RPN-544), debido a los antecedentes familiares, acudió periódicamente a la consulta del oftalmólogo desde los 25 años, siendo la exploración normal y alcanzando una agudeza visual igual a la unidad. A los 31 años se le apreció una leve alteración del EPR foveal, sin embargo, la agudeza visual siguió siendo igual a la unidad. Dos años más tarde, los valores de agudeza visual eran de 0,8 en el OI e igual a la unidad en el OD, manteniéndose la leve alteración macular en ambos ojos. A los 35 años, el paciente RPN-544 presentó una agudeza visual de 0,15 en el OI y maculopatía en ojo de buey en ambos ojos, siendo superior en el OI que en el OD (Figura IV.15).

El estudio del panel de genes identificó en la paciente RPN-129 las mutaciones p.(Glu328*) y p.(Arg602Trp) en el gen *ABCA4*, previamente descritas. Los estudios de segregación familiar confirmaron que ambas mutaciones procedían de distinto progenitor, siendo el paciente RPN-128 portador de la mutación p.(Arg602Trp). En cambio, en el paciente RPN-544, de las dos mutaciones identificadas en su hermana, solo se identificó la mutación p.(Glu328*) en el gen *ABCA4*. Posteriormente, al paciente RPN-544 se le secuenció el panel de genes, hallándose la mutación p.(Glu328*), previamente identificada mediante secuenciación Sanger, y la mutación p.(Gly1961Glu), previamente descrita, ambas en el gen *ABCA4*. Por último, se confirmó mediante secuenciación Sanger la presencia de la mutación p.(Gly1961Glu) en el padre (RPN-128) (Figura IV.14).

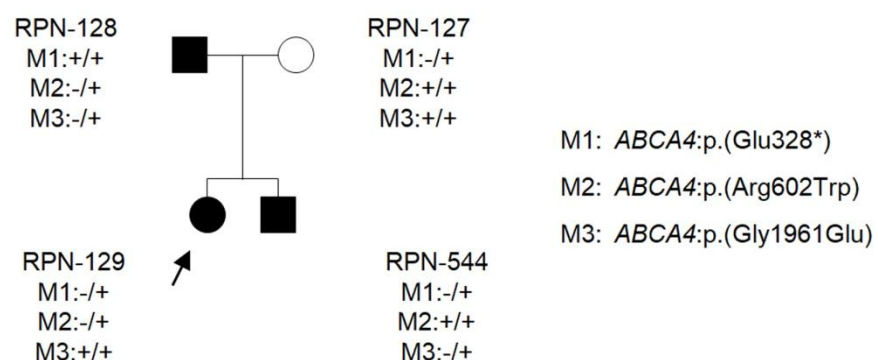


Figura IV.14 Segregación familiar de las mutaciones identificadas en la familia fRPN-51. +: alelo *wildtype*; -: alelo mutado. La flecha señala al probando.



Figura IV.15 Pruebas oftalmoscópicas de los pacientes de la familia fRPN-142. Paciente RPN-129 a los 54 años: (A, B) las imágenes de fondo de ojo corresponden a la retina periférica atrofica; no se muestran fotos centrales por imposibilidad de captar imágenes dada la baja visión del paciente, la agudeza visual de la paciente era de percibe luz en ambos ojos. Paciente RPN-544 a los 43 años: en este caso se observa, tanto en retinografía (C, D) como en autofluorescencia (E, F), que la afectación está limitada a la zona macular con papila y retina media normales; en la OCT (G, H) hay marcada atrofia con desaparición total de la retina externa, incluyendo capa de fotorreceptores y membrana limitante externa; la agudeza visual del paciente era de 0,5/0,3.

6.4. Familia fRPN-219

El paciente RPN-508 acude por primera vez a la consulta del oftalmólogo a los 16 años por pérdida de visión progresiva, presentando una agudeza visual de 0,05/0,15 que no mejora con corrección en ambos ojos, escotoma central en ambos ojos e hipoplasia macular. En la angiofluorescencia se observó defecto ventana perifoveal en ambos ojos. Las respuestas de los PEVP fueron anormales y las del ERG-G dentro del límite de normalidad en ambos ojos. Se le diagnostica de distrofia macular. A los 24 años, el paciente RPN-508 presentó una agudeza visual de 0,05/0,16 con manchas amarillentas centrales en el polo posterior. Sin embargo, su hermana (RPN-507) refirió pérdida visual desde la infancia temprana, y fue diagnosticada de STGD a los 14 años. A los 24 años, los valores de agudeza visual de a paciente eran de 0,05/0,16. Además de estos hallazgos, la paciente presentó un fenotipo de pelo y ojos claros con ligero estrabismo, que no tenía el hermano (Figura IV.16).

Se les realiza a ambos hermanos diferentes estudios genéticos en paralelo. Al paciente RPN-508 se le secuencian el panel de genes, identificándose las mutaciones p.(Arg1129Leu) y p.(Leu1940Pro) en el gen *ABCA4*, previamente descritas. Sin embargo, a la paciente RPN-507 se le secuencian los 5 exones del gen *TYR*, identificándose las mutaciones p.(Arg217Trp) en

heterocigosis y p.(Arg402Gln) en homocigosis. Los estudios de segregación familiar confirmaron que ambas mutaciones del gen *ABCA4* procedían de distinto progenitor y que la paciente RPN-507 también era portadora de las mutaciones en *ABCA4*. Sin embargo, en el paciente RPN-508 solo se identificó una de las dos mutaciones que tenía la hermana en el gen *TYR*, la *missense* p.(Arg402Gln) en heterocigosis (Figura IV.17).

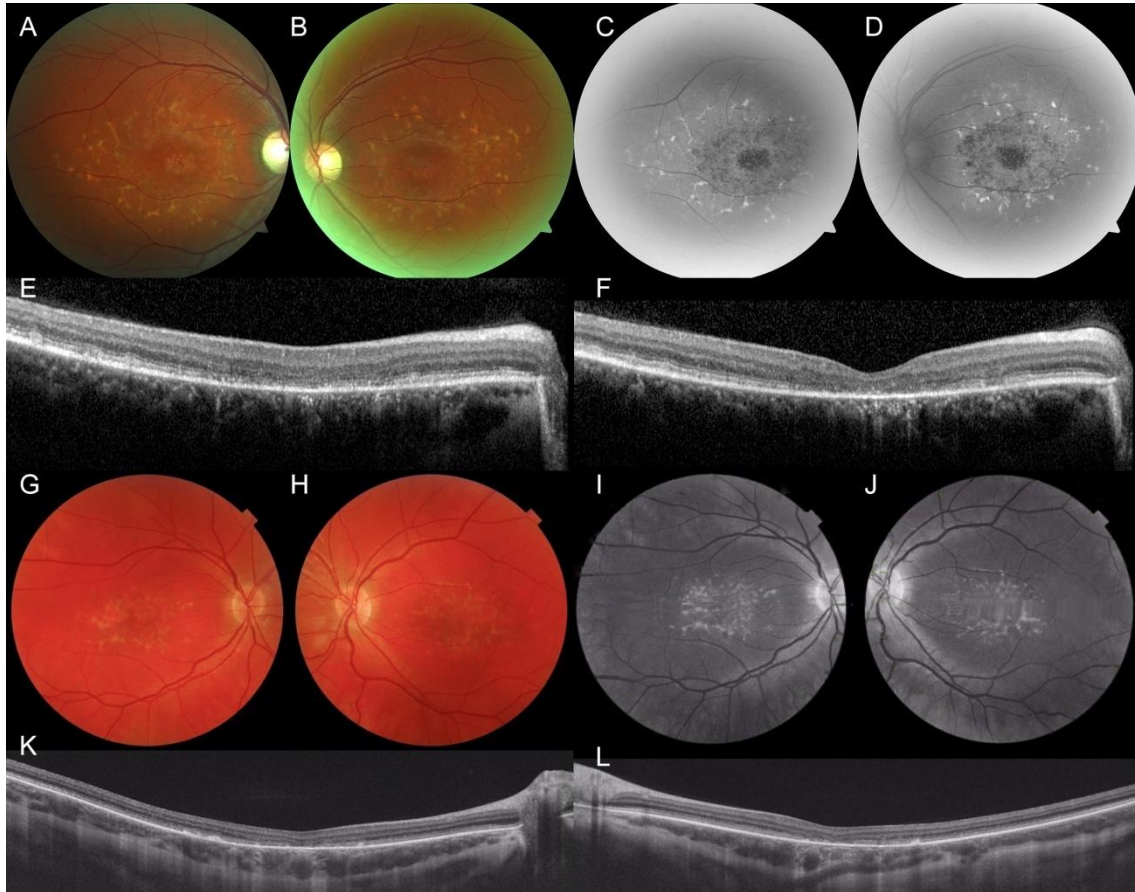


Figura IV.16 Pruebas oftalmoscópicas de los pacientes de la familia fRPN-219. Paciente RPN-508 a los 26 años: en retinografía (A, B) como en autofluorescencia (C, D) se visualizan los cambios del EPR así como acúmulos de lipofucsina; OCT (E, F) con atrofia macular característica de la enfermedad de STGD. Paciente RPN-508 a los 24 años: en retinografía (G, H) como en autofluorescencia (I, J) se visualizan los cambios del EPR así como acúmulos de lipofucsina; OCT (K, L) con atrofia macular característica de la enfermedad de STGD.

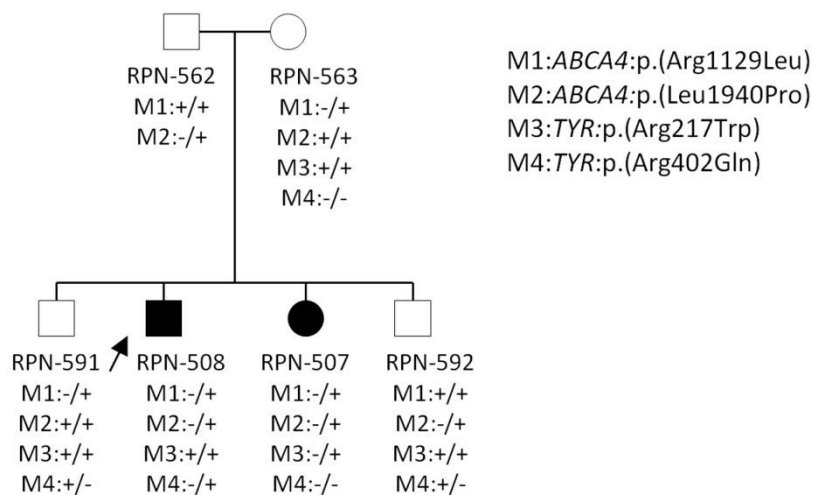


Figura IV.17 Segregación familiar de las mutaciones identificadas en la familia fRPN-219. +: alelo *wildtype*; -: alelo mutado. La flecha señala al probando.

6.5. Familia RPN-194

El paciente RPN-432 refirió nictalopía desde los 8 años de edad. A los 9 años se observó alteración del EPR a nivel periférico con agudeza visual igual a la unidad en ambos ojos. Presentó respuestas de PEVP y EOG alteradas y ERG-G sin respuesta valorable, sin embargo, las respuestas al ERG-P estaban dentro de los límites de normalidad. Las pruebas electrofisiológicas en su conjunto sugirieron una retinopatía periférica. A los 13 años, en la autofluorescencia se observó una imagen en ojo de buey con agudeza visual igual a la unidad. A los 17 años, el paciente refirió nictalopía y estrechamiento del campo visual, con una agudeza visual de 0,8/0,8. En el fondo de ojo se observó marcada atrofia con imágenes pigmentadas sugestivas de RP. La autofluorescencia mostró una imagen en ojo de buey perifoveal correspondiendo con la marcada atrofia y adelgazamiento de la capa de fotorreceptores perifoveal observada en la OCT.

Por otra parte, la paciente RPN-433 a los 5 años presentaba PEVP alterado y ERG-G normal, excepto el coeficiente b/a que era <2, lo que podría sugerir retinosquiasis, sin embargo, la agudeza visual era igual a la unidad en ambos ojos y en el estudio de fondo de ojo no se observó alteración macular, en cambio, sí había una degeneración retiniana periférica. A los 13 años, el fondo de ojo evidenció una atrofia retiniana con visión de vasos coroideos en la periferia media, en cambio, en la OCT se observó una mácula conservada.

El estudio del panel de genes en el paciente RPN-432 identificó la mutación p.(Ala469Thr) y el polimorfismo p.(Thr153Met), descrito como posible inductor de susceptibilidad a enfermedad (Meighan, Peng, and Varnum 2015), en el gen *CNGA3*, y la mutación p.(Pro2301Leu) en *PRPF8*, no descrita previamente. El estudio de segregación familiar confirmó que las variantes en el gen *CNGB3* estaban en diferentes alelos y que la

paciente RPN-433 también era portadora de ambas variantes, sin embargo, la mutación en *PRPF8* no se identificó en ninguno de los miembros de la familia, de los que se estudiaron tanto el ADN procedente de sangre periférica como el de saliva.

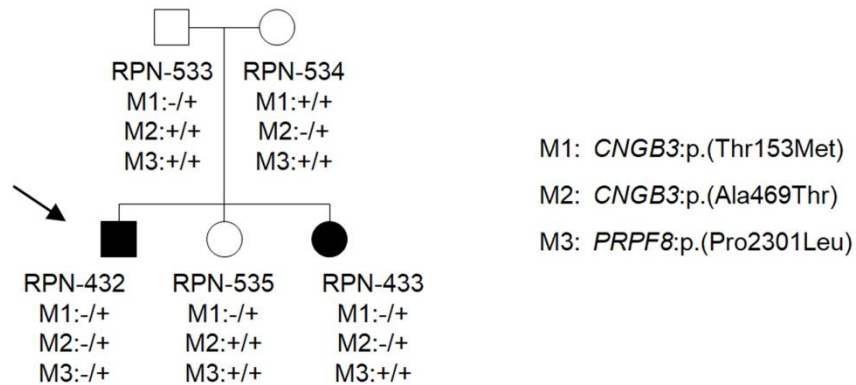


Figura IV.18 Segregación familiar de las mutaciones identificadas en la familia fRPN-194. +: alelo *wildtype*; -: alelo mutado. La flecha señala al probando.

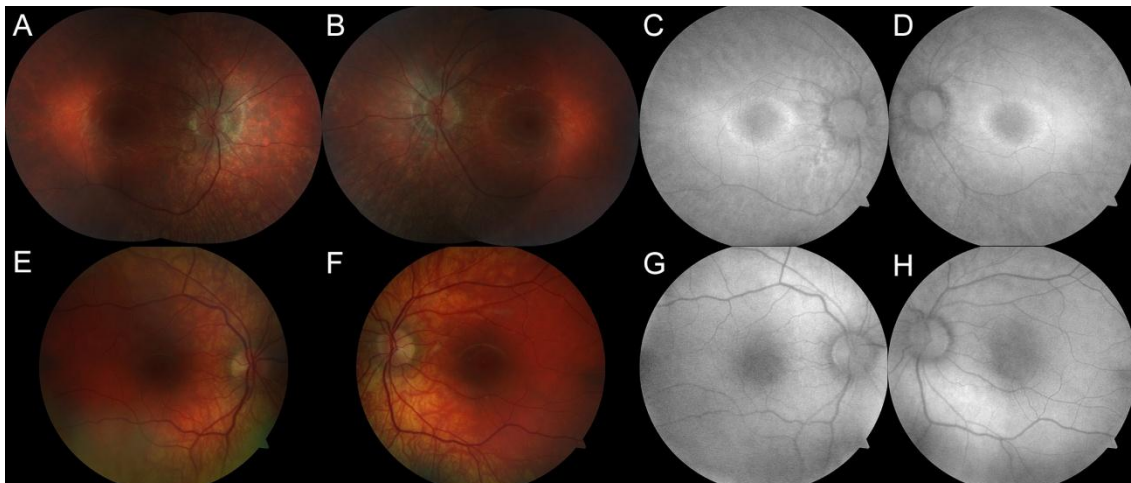


Figura IV.19 Pruebas oftalmoscópicas de los pacientes de la familia fRPN-194. Paciente RPN-432 a los 13 años: (A, B) fondo de ojo a color con imagen característica de ojo de buey más evidente en (C, D) con hipoautofluorescencia rodeada de hiperautofluorescencia; retina peripapilar con atrofia leve. Paciente RPN-432 a los 9 años: (E, F) en este caso es más evidente la atrofia retiniana, ya que solo respeta el polo posterior y permite ver la coroides por transparencia; (G, H) autofluorescencia anodina.

6.6. Familia fRPN-169

La paciente RPN-336 es la única afectada de la familia. Fue diagnosticada a los 11 años de RP. A los 52 años la paciente tenía una agudeza visual e 0,2/0,05 con pérdida del campo visual que fue progresando hasta que a los 60 años solo percibía luces y sombras, además de presentar cataratas en ambos ojos y nistagmus. Estudios electrofisiológicos realizados a los 62 años mostraron un ERG-G sin respuesta para el OI y de muy baja amplitud y retraso para el OD, además, los PEV-flash estaban abolidos.

El estudio del panel de genes en la paciente RPN-336 identificó las mutaciones p.(Thr352Ile) y p.(Glu767Serfs*21) en el gen *USH2A*, previamente descritas, y la mutación

p.(Ile681Asnfs*17) en *RP1*, no descrita previamente. El estudio de segregación familiar confirmó que las mutaciones en *USH2A* estaban en heterocigosis compuesta y que ninguno de sus hijos era portador de la mutación en *RP1* (Figura IV.20).

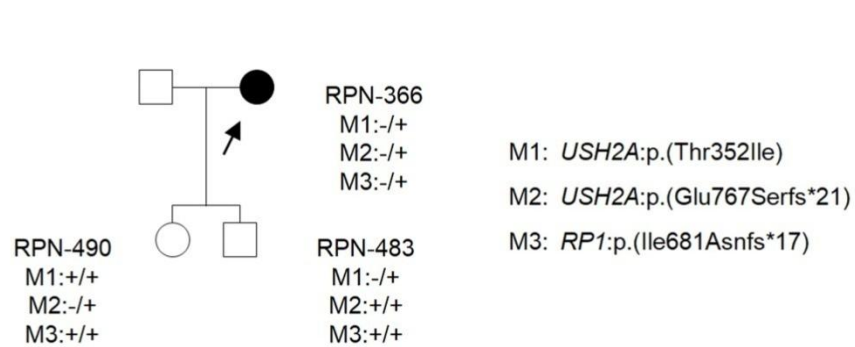


Figura IV.20 Segregación familiar de las mutaciones identificadas en la familia fRPN-169. +: alelo *wildtype*; -: alelo mutado. La flecha señala al probando.

7. ESTUDIOS FUNCIONALES MEDIANTE MINIGENES

Después de aplicar los filtros de MAF, se analizaron las variantes identificadas en los pacientes mediante herramientas bioinformáticas (HSF y MaxEnt), con la finalidad de estudiar el efecto de éstas sobre el mecanismo de *splicing*. De todas ellas, se seleccionaron las variantes con criterios combinados para HSF (valor consenso (VC) >65 y una variación del VC entre WT y MT de +/- 10%) y MaxEnt (VC >3 y una variación del VC entre WT y MT de +/- 30%), además de mutaciones que afectaban a nucleótidos menos conservados con una variación del VC de 7% para variantes en posición +4 y 14% para variantes en posición +3 o +5 (Desmet et al. 2009). En la tabla IV.8 se detallan los resultados obtenidos de los predictores HSF, MaxEnt y SpliceAI para cada una de las variantes seleccionadas. En relación al contexto genómico, solo se han incluido las predicciones acordes al efecto observado.

Para confirmar las predicciones bioinformáticas, se realizaron estudios funcionales con minigenes y se analizaron los diferentes productos de *splicing*. En este ensayo no se incluyeron las mutaciones localizadas en los sitios canónicos de *splicing* (-2,-1, +1, +2). Sin embargo, sí se incluyeron variantes que afectaban al primer nucleótido del exón y que cumplían uno o ninguno de los criterios anteriormente citados: *ABCA4*: c.6148G>C, *BEST1*: c.637_639del e *IDH3B*: c.532A>G (Tabla IV.8). A continuación, se detallan los resultados obtenidos para cada una de las variantes estudiadas *in vitro* mediante minigenes.

Tabla IV.8 Predicciones bioinformáticas de las variantes seleccionadas para el ensayo con minigenes.

Gen	Mutación	SS	Posición	HSF			MaxEnt			spliceAI (*)
				Wt	M	Variación (%)	Wt	M	Variación (%)	
ABCA4	c.2972G>T	D	Exón	64,62	91,45	+41,52	0,41	8,05	+2063,41	DG: 0,09 (2)
ABCA4	c.6148G>C	A	Exón (1ª)	87,36	83,20	-4,76	12,46	9,41	-24,48	AL: 0,00 (0)
BEST1	c.637_639del	A	Exón (1ª-3ª)	93,39	91,03	-2,53				AL: 1,00 (3)
				75,49	91,03	+20,59	11,00	11,68	+6,18	AG: 0,93 (6)
CACNA2D4	c.2153-12_2155del	A	Exón (1ª-3ª)	93,15	57,22	-38,57	8,53	-2,70	-131,65	-
CNNM4	c.2039C>T	D	Exón	55,92	82,75	+47,98	1,89	5,86	+409,52	-
FSCN2	c.1105G>A	D	Exón (última)	69,04	77,38	+12,08				DG: 0,80 (20)
				89,94	79,36	-11,76	9,10	4,04	-55,60	DL:0,47 (0)
IDH3B	c.532A>G	A	Exón (1ª)	88,49	91,62	+3,54	6,89	7,89	+14,51	AG: 0,01 (-8)
MAK	c.755A>G	A	Exón	59,74	88,69	+48,46	-3,58	5,16	+244,13	AG: 0,68 (-1)
				81,74	81,69	-0,06	3,75	-2,2	-158,67	AL: 0,34 (-7)
MERTK	c.1450G>A	D	Exón (última)	90,80	80,22	-11,65	8,94	3,45	-61,41	DG: 0,43 (16)
										DL: 0,67 (0)
PRPF31	c.182C>G	D	Exón (5ª)	62,94	89,77	+42,63	-1,98	6,29	+417,68	DG: 0,00 (-1)
RHO	c.316G>A	A	Exón	64,15	93,10	+45,13	-1,61	6,34	+493,79	AG: 0,00 (2)
RIMS1	c.2544+4A>G	D	Intrón (+4)	82,83	74,49	-10,07	4,44	-1,23	-127,70	-
RPGRIP1	c.930+3A>G	D	Intrón (+3)	96,23	85,39	-11,26	8,40	4,72	-43,81	-

Abreviaciones. A: aceptor, AG: *acceptor gain*, AL: *acceptor loss*, D: donador, DG: *donor gain*, DL: *donor loss*, M: mutante, SS: sitio de *splicing*, Wt: *wildtype*, (*): distancia en pb.
 -: gen no disponible en la web consultada.

7.1. **ABCA4: c.2972G>T, p.(Gly991Val)**

Los algoritmos bioinformáticos HSF y MaxEnt predicen la creación de un nuevo sitio donador (GGGgtaagg), al contrario que el predictor de nueva generación spliceAI que no predice ningún efecto aberrante en el *splicing* para esta variante (Tabla IV.8). Por otra parte, según el predictor hnRNP, esta mutación también crearía un nuevo motivo *silencer* (TAAGGG), con un VC de 80,00 (umbral de impacto >65,48). Esta mutación se identificó en el paciente RPN-410 en *trans* con la mutación c.4253+4C>T, clasificada previamente como patológica (Webster et al. 2001) (Anexos, Tabla VIII.8). El resultado del ensayo con minigenes mostró que tanto el procesamiento de la construcción WT como la MT generaron dos bandas de diferente tamaño: el procesamiento correcto (banda A) y el salto del exón 20 (banda B) (Figura IV.21).

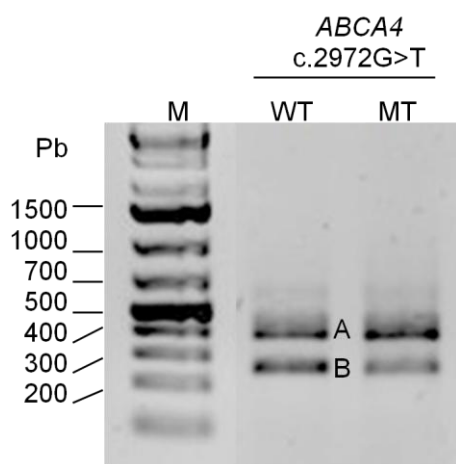


Figura IV.21 Resultados de los minigenes para la variante c.2972G>T de ABCA4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por RT-PCR de las construcciones *wildtype* (WT) y mutado (MT). M: marcador.

7.2. **ABCA4: c.6148G>C, p.(Val2050Leu)**

Según los predictores bioinformáticos, esta mutación daría lugar a un nuevo motivo aceptor (tctctccctagCT) que disminuiría la fuerza del sitio natural, con una variación del VC <10% para HSF e <30% para MaxEnt, con concordancia con los resultados del predictor spliceAI (*acceptor loss*): 0,00 (Tabla IV.8). Esta mutación se identificó en los pacientes RP-44, RPN-191 y RPN-536, diagnosticados de RP (Anexos, Tabla VIII.7). En el ensayo *in vitro* con minigenes no se observaron diferencias entre el procesamiento de las construcciones WT y MT. En ambos casos se obtuvo una banda correspondiente al procesamiento correcto del exón 45 de ABCA4 (Figura IV.22).

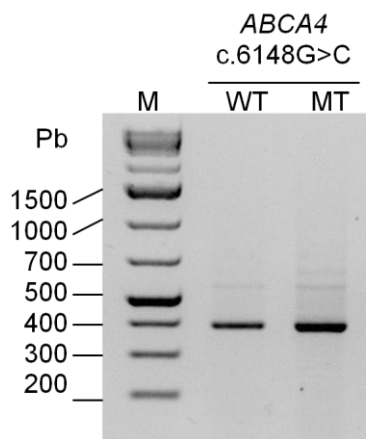


Figura IV.22 Resultados de los minigenes para la variante c.6148G>C de ABCA4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por RT-PCR de las construcciones *wildtype* (WT) y mutado (MT). M: marcador.

7.3. BEST1: c.637 639del, p.(Glu213del)

Los resultados de las herramientas bioinformáticas empleadas predicen la activación de un sitio críptico aceptor con una variación del VC de 20,59% para HSF y 6,18% para MaxEnt. Por otra parte, spliceAI predice una pérdida del sitio aceptor natural (VC: 1,00) y la ganancia de un aceptor (VC: 0,93) (Tabla IV.8). Esta variante se identificó en el paciente RPN-106 en *trans* con p.(Ile201Thr), inicialmente diagnosticado de STGD (Anexos, Tabla VIII.8). El ensayo de los minigenes mostró que el procesamiento de la construcción WT generó dos fragmentos de distinta intensidad (Figura IV.23): el procesamiento correcto (banda A), más intenso, y el salto del exón 6 de *BEST1* (banda B), menos intenso. En el minigen MT se obtuvieron ambas bandas, pero con la intensidad invertida respecto al minigen WT, es decir, la banda correspondiente al *exon skipping* (banda B) es mucho más intensa que la banda correspondiente al procesamiento correcto (banda A). Además, una vez secuenciada la banda A de la construcción MT se observó la ausencia de las tres primeras bases del exón 6, acorde con la mutación a estudio. La delección del exón 6 de *BEST1* daría lugar a la proteína p.(Glu212_Gln238del), con una pérdida de 26 aminoácidos respecto a la proteína *wildtype*. Según el predictor Conserved Domains de NCBI, el dominio bestrofina no desaparecería en la proteína mutada. Sin embargo, según la base de datos dbPTM, el residuo de la posición 227 de la proteína BEST1 estaría fosforilado.

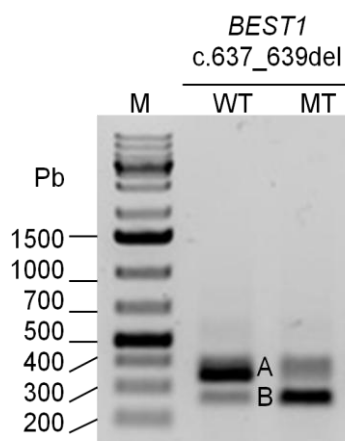


Figura IV.23 Resultados de los minigenes para la variante c.637_639del de *BEST1*. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por RT-PCR de las construcciones *wildtype* (WT) y mutado (MT). M: marcador.

7.4. CACNA2D4: c.2153-12_2155del, p.?

Los algoritmos HSF y MaxEnt predicen una pérdida del sitio natural aceptor (Tabla IV.8). Esta mutación se identificó en heterocigosis en el paciente RPN-424, diagnosticado de DCB, sin variantes potencialmente patogénicas adicionales (Anexos, Tabla VIII.7). Los experimentos *in vitro* mostraron que la construcción WT creó dos transcritos diferentes: uno de ellos corresponde al transcrito correcto (banda A) y el más pequeño corresponde al salto del exón 23 (banda B). Por otra parte, en la construcción MT solo se observó la banda correspondiente al salto de exón (Figura IV.23). El salto del exón 23, daría lugar a la pérdida de la pauta de lectura, pudiendo dar lugar a la degradación del ARNm mediada por mutaciones terminadoras (conocido como *nonsense-mediated mRNA decay*, NMD), apoyado por el predictor NMDEsc. Si no se produjese NMD, se produciría la proteína mutada p.(Cys718Trpfs*19), sin el dominio VGCC-alpha2.

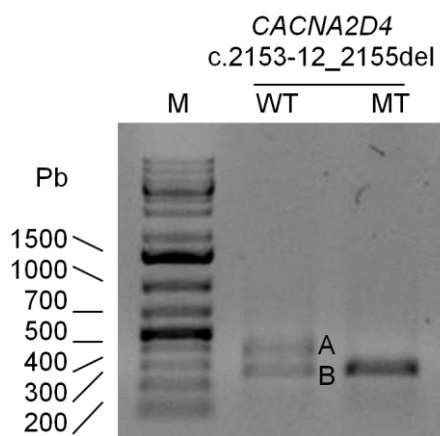


Figura IV.24 Resultados de los minigenes para la variante c.2153-12_2155del de *CACNA2D4*. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por RT-PCR de las construcciones *wildtype* (WT) y mutado (MT). M: marcador.

7.5. **CNNM4: c.2039C>T, p.(Ala680Val)**

Según los predictores bioinformáticos, esta mutación daría lugar a un nuevo sitio donador (TTGgtaggc) (Tabla IV.8). Sin embargo, según el predictor hnRNP, esta mutación también incrementaría la fuerza de un sitio *silencer*: de un VC de 74,76 (CAGGCA) a 90,00 (TAGGCA) (umbral de impacto >65,476). Esta variante se identificó en la paciente RP-677, diagnosticada de enfermedad de STGD y sin variantes potencialmente patogénicas adicionales (Anexos, Tabla VIII.7). En el ensayo *in vitro* con minigenes no se observaron diferencias entre el procesamiento de las construcciones WT y MT (Figura IV.25). En ambos casos se obtuvo una banda correspondiente al procesamiento correcto del exón 6 de *CNNM4*.

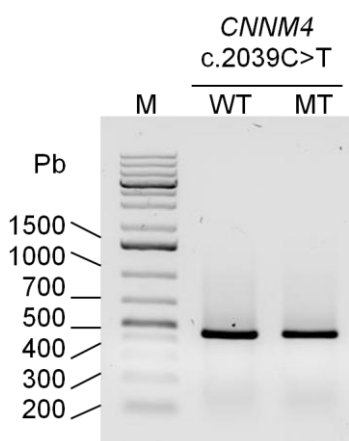


Figura IV.25 Resultados de los minigenes para la variante c.2039C>T de *CNNM4*. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por RT-PCR de las construcciones *wildtype* (WT) y mutado (MT). M: marcador.

7.6. **FSCN2: c.1105G>A, p.(Gly369Ser)**

Para esta variante, localizada en la última posición del exón 3 de *FSCN2*, los algoritmos HSF y MaxEnt predicen una pérdida del sitio natural donador. Por otra parte, spliceAI también predice una pérdida del sitio natural donador, con una fuerza media, y añade la predicción de la activación de un sitio críptico donador a una distancia de 20 nucleótidos (Tabla IV.8). Esta variante fue identificada en las tres pacientes afectadas de distrofia macular STGD-*like* de la familia fRPN-144, con una mutación potencialmente patogénica en *PRPH2* (Anexos, Tabla VIII.8). El ensayo con minigenes mostró que la construcción WT generó una banda que corresponde al procesamiento correcto del pre-ARNm (banda A) (Figura IV.26). Por otra parte, la construcción MT generó dos bandas: la banda B, en la que se observa una inserción de 20 pb intrónicas al exón 3, que correspondería con la activación del sitio críptico donador CAGgtactg (VC_{HSF} : 76,95 y VC_{MaxEnt} : 9,04), y la banda C, en la que se observa la pérdida del exón 3. El nuevo transcrito mutado r.1105_1106ins[1105+1_1105+20], según el predictor NMDEsc, no sería degradado y daría lugar a la proteína p.(Lys370Glufs*50), carente de uno de los cuatro dominios fascina.

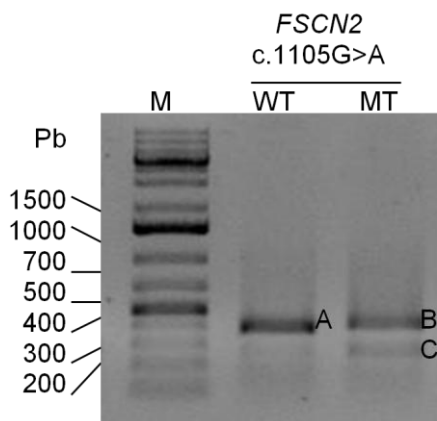


Figura IV.26 Resultados de los minigenes para la variante c.1105G>A de *FSCN2*. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por RT-PCR de las construcciones *wildtype* (WT) y mutado (MT). M: marcador.

7.7. *IDH3B*: c.532A>G, p.(Ser178Gly)

La variante a estudio se localiza en la primera posición del exón 7 de *IDH3B*. Los predictores HSF y MxEnt indican un incremento de la fuerza en el sitio aceptor, pero con una variación del VC por debajo del umbral establecido, acorde con los resultados de spliceAI que para esta variante tampoco predicen un efecto aberrante en el *splicing* (Tabla IV.8). Esta variante se identificó en heterocigosis en el paciente RPN-299, diagnosticado de RP esporádico, en el que no se encontraron variantes potencialmente patogénicas adicionales (Anexos, Tabla VIII.8). En el diseño de este minigen se incluyeron los exones 6, 7 y 8 debido a la gran proximidad entre ellos. Por tanto, el ensayo *in vitro* mostró que tanto el minigen WT como MT generaron tres bandas (Figura IV.27): el procesamiento correcto de los exones 6, 7 y 8 (banda A), el procesamiento correcto de los exones 7 y 8 (banda B) y el procesamiento correcto del exón 8 (banda C).

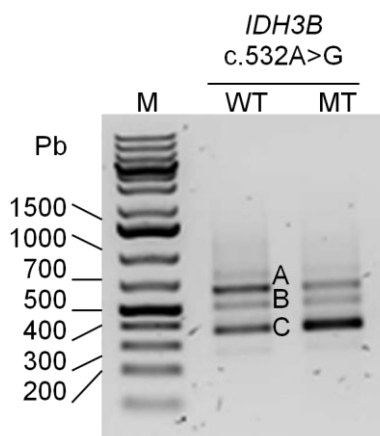


Figura IV.27 Resultados de los minigenes para la variante c.532A>G de *IDH3B*. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por RT-PCR de las construcciones *wildtype* (WT) y mutado (MT). M: marcador.

7.8. **MAK: c.755A>G, p.(Asn252Ser)**

Los algoritmos bioinformáticos, para esta mutación exónica localizada fuera de los sitios de *splicing* 3' y 5' del exón 8 de *MAK*, predicen dos eventos diferentes: la creación de un nuevo sitio aceptor (tcttattcccagTG) y la pérdida de un sitio críptico aceptor (Tabla IV.8). Por otra parte, el predictor hnRNP señala la creación de un nuevo motivo *silencer* (CAGTGC) con un VC de 67,62. Esta variante se identificó en el paciente RPN-326, afectado de distrofia macular de Best y con diagnóstico genético incompleto (Anexos, Tabla VIII.7). El ensayo funcional con minigenes mostró una banda visualmente del mismo tamaño para cada construcción (Figura IV.28): WT y MT. Una vez secuenciadas, en la banda de la construcción WT se observó una secuencia correspondiente al procesamiento correcto del exón 8 y otra de un transcrito más pequeño, formado por los últimos 70 nucleótidos del exón 8. En la construcción MT también se observó el transcrito con el exón 8 completo y otro transcrito con las últimas 76 pb del exón, que correspondería con el nuevo sitio aceptor creado, dando lugar a un transcrito con las primeras 92 pb del exón 8 delecionadas. El transcrito aberrante r.664_755del (banda B), según el predictor NMDesc, sería susceptible de ser degradado. Si no se produjese NMD, daría lugar a la proteína mutada p.(Ser222Cysfs*3), con el dominio proteína quinasa (4 – 284 aa) truncado.

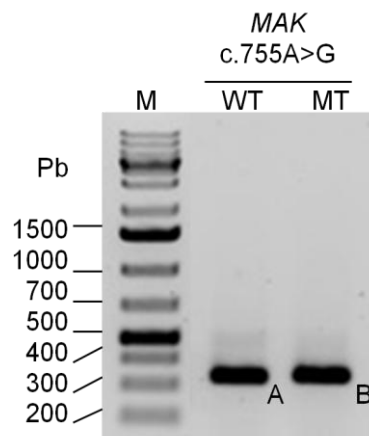


Figura IV.28 Resultados de los minigenes para la variante c.755A>G de *MAK*. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por RT-PCR de las construcciones wildtype (WT) y mutado (MT). M: marcador.

7.9. **MERTK: c.1450G>A, p.(Gly484Ser)**

Esta variante se localiza en la última posición del exón 9 de *MERTK*. Los predictores bioinformáticos sugieren que esta mutación podría dar lugar a la pérdida del sitio natural donador y, spliceAI añade que se activaría un donador a una distancia de 16 nucleótidos de la mutación a estudio (Tabla IV.8). La mutación p.(Gly484Ser) se identificó en la paciente RPN-442, afectada de RP, con una deleción completa del gen *MERTK* en el segundo alelo (Anexos, Tabla VIII.8). El ensayo *in vitro* con minigenes mostró una banda en la construcción WT, correspondiente al procesamiento normal del exón 9 (banda A) (Figura IV.29), y dos

bandas en la construcción MT. En la primera de ellas (banda B) se observa una inserción de 16 pb intrónicas al exón 9, que correspondería con la activación del sitio crítico donador CCAgtaagg (VC_{HSF} : 82,74 y VC_{MaxEnt} : 5,74). En la segunda banda de la construcción MT (banda C) se observa un transcrito con los 76 últimos nucleótidos deletados, que correspondería con la activación del sitio crítico donador ACAgtgagg (VC_{HSF} : 80,63 y VC_{MaxEnt} : 3,44). Tanto el transcrito con la inserción r.1450_1451ins[1450+1_1450+16] como el transcrito con la delección r. 1374_1450del, según el predictor NMDEsc, serían susceptibles de ser degradados. Si no se produjese NMD, se producirían las proteínas mutadas p.(Trp485Glufs*63) y p.(Val459Leufs*60), respectivamente. En ambas proteínas el dominio proteína tirosina kinasa (588 – 852 aa) estaría ausente.

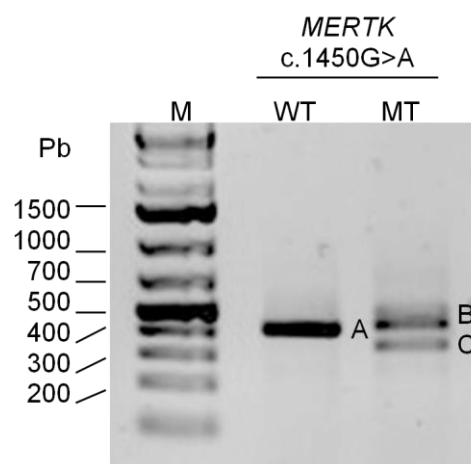


Figura IV.29 Resultados de los minigenes para la variante c.1450G>A de *MERTK*. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por RT-PCR de las construcciones *wildtype* (WT) y mutado (MT). M: marcador.

7.10. *PRPF31*: c.182C>G, p.(Ala61Gly)

Los algoritmos HSF y MaxEnt señalaron la creación de un nuevo sitio donador (TTGgtgaga), con una variación del VC por encima del umbral de impacto establecido (Tabla IV.8). Sin embargo, el predictor de nueva generación spliceAI no lo predice. Esta variante se identificó en la paciente RPN-284, diagnosticada de enfermedad de STGD y en la que no se han identificado mutaciones potencialmente patológicas (Anexos, Tabla VIII.8). En el estudio de los minigenes no se observaron diferencias entre las construcciones WT y MT (Figura IV.30).

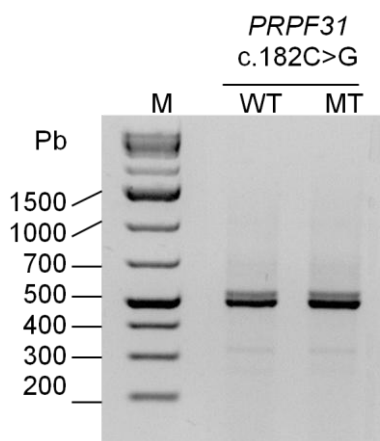


Figura IV.30 Resultados de los minigenes para la variante c.182C>G de PRPF31. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por RT-PCR de las construcciones *wildtype* (WT) y mutado (MT). M: marcador.

7.11. RHO: c.316G>A, p.(Gly106Arg)

Esta mutación no se encuentra cerca de los sitios de *splicing*, pero los algoritmos HSF y MaxEnt sugieren la creación de un nuevo sitio aceptor (Tabla IV.8). Sin embargo, spliceAI no predice ningún efecto aberrante en el *splicing* para esta variante. Por otra parte, según el predictor hnRNP, esta mutación también crearía un nuevo motivo *silencer* (CAGGCC) con un VC de 72,86. La mutación p.(Gly106Arg), previamente descrita como patológica, se identificó en los pacientes RPN-253 y RPN-254, afectados de RP (Anexos, Tabla VIII.8). En el ensayo con minigenes se obtuvo una banda del mismo tamaño para las construcciones WT y MT, correspondiente a la pérdida del exón 1 de *RHO* (Figura IV.31).

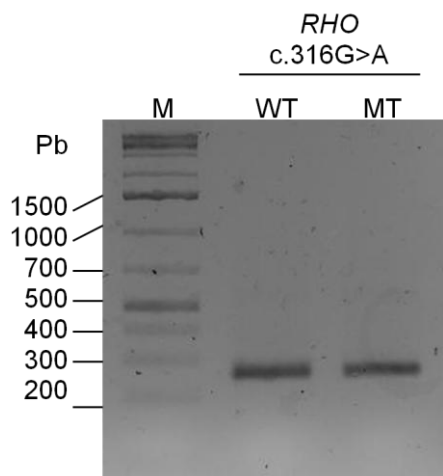


Figura IV.31 Resultados de los minigenes para la variante c.182C>G de PRPF31. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por RT-PCR de las construcciones *wildtype* (WT) y mutado (MT). M: marcador.

7.12. ***RIMS1*: c.2544+4A>G, p.?**

Los algoritmos HSF y MaxEnt señalaron la ruptura del sitio donador natural (Tabla IV.8). Esta variante se identificó en los dos hermanos afectados de ACL de la familia fRPN-38 (Anexos, Tabla VIII.8). Además, estos pacientes tienen una variante deletérea en homocigosis en *AIP1*. Mediante el estudio con minigenes se observó que la construcción WT generó una sola banda correspondiente al procesamiento correcto del exón 14 (banda A) (Figura IV.31), mientras que la construcción MT generó otra banda más pequeña (banda B), correspondiente al salto del exón 14 de *RIMS1*. El salto del exón 14, daría lugar a la pérdida de la pauta de lectura y a la degradación del ARNm mediada por la vía NMD, apoyado por el predictor NMDEsc. Si no se produjese NMD, se produciría la proteína mutada p.(Ser791Argfs*4), sin los dominios altamente conservados C2A_RIM1alpha y C2B_RIM1alpha.

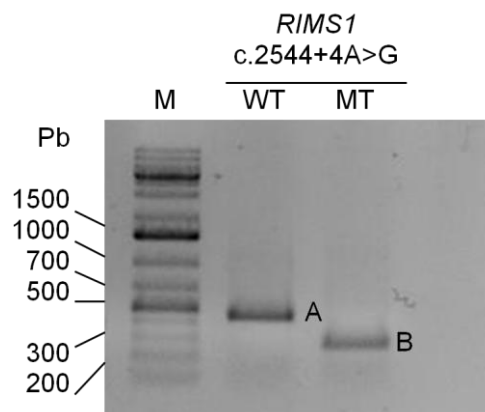


Figura IV.32 Resultados de los minigenes para la variante c.2544+4A>G de *RIMS1*. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por RT-PCR de las construcciones *wildtype* (WT) y mutado (MT). M: marcador.

7.13. ***RPGRIP1*: c.930+3A>G, p.?**

Los algoritmos HSF y MaxEnt predicen la ruptura del sitio donador natural (Tabla IV.8). Esta mutación se identificó en la paciente RP-632, diagnosticada de RP y portadora de una mutación patológica en *EYS* (Anexos, Tabla VIII.7). Los resultados de los minigenes no identificaron transcritos aberrantes debidos a esta variante (Figura IV.33).

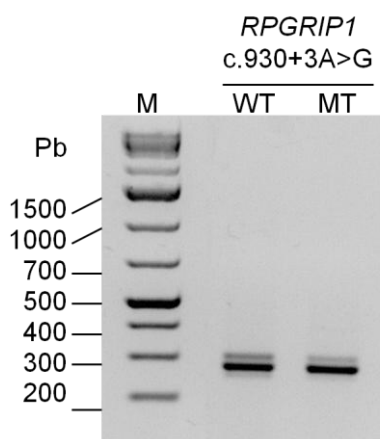


Figura IV.33 Resultados de los minigenes para la variante c.930+3A>G de RPGRIP1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por RT-PCR de las construcciones wildtype (WT) y mutado (MT). M: marcador.

En resumen, seis de las 13 mutaciones estudiadas mediante ensayos *in vitro* con minigenes dieron lugar a un procesamiento aberrante del ARNm (Tabla IV.9). Las mutaciones *BEST1*: c.637_639del, *CACNA2D4*: c.2153-12_2155del y *RIMS1*:c.2544+4A>G provocaron un salto completo del exón, las mutaciones *MAK*: c.755A>G y *MERTK*:c.1450G>A generaron la delección de 92 y 76 pb, respectivamente, y la mutación *FSCN2* provocó la inserción de 20 pb intrónicas en el transcrito.

Tabla IV.9 Resumen: mutaciones con efecto deletéreo sobre el *splicing*

Gen	Mutación	Resultado minigenes
<i>BEST1</i>	c.637_639del	<i>Exon skipping</i>
<i>CACNA2D4</i>	c.2153-12_2155del	<i>Exon skipping</i>
<i>FSCN2</i>	c.1105G>A	Ins 20 pb
<i>MAK</i>	c.755A>G	Del 92 pb
<i>MERTK</i>	c.1450G>A	Del 76 pb
<i>RIMS1</i>	c.2544+4A>G	<i>Exon skipping</i>

8. PACIENTES NO RESUELTOS

En el 27% (34) de los pacientes no se identificó ninguna variante potencialmente patogénica en los genes estudiados. El 76% (26) de los pacientes no resueltos tenían una sospecha diagnóstica de RP. En este grupo de pacientes se secuenciaron las mutaciones intrónicas profundas previamente descritas y no incluidas en el diseño del panel, pero no se identificó ninguna de ellas.

V. DISCUSIÓN

En las enfermedades clínica y genéticamente heterogéneas, en las que están implicados muchos genes diferentes, como las DHR, el estudio en paralelo de varios de ellos incrementa sustancialmente el ratio diagnóstico y representa la elección diagnóstica más coste-eficiente (S P Daiger, Sullivan, and Bowne 2013). En este estudio se diseñó un panel genes incluyendo las regiones codificantes de 117 genes previamente relacionados con las DHR no sindrómicas o genes que dan lugar tanto a formas sindrómicas como no sindrómicas (*USH2A*). En el diseño, también se consideraron 5 regiones intrónicas profundas en las que se habían identificado mutaciones en pacientes con DHR. Para la validación del diseño del panel y estrategia de análisis de datos, se secuenciaron 8 pacientes con mutaciones conocidas como controles positivos, obteniendo una tasa de detección de mutaciones del 100%, lo que demostró la alta especificidad y sensibilidad de nuestra aproximación diagnóstica.

Se seleccionaron familias afectadas de DHR no sindrómica procedentes sobre todo de la asociación de pacientes “Retina Comunidad Valenciana” (<http://www.retinacv.es/>) y del departamento de salud Valencia La Fe, aunque en el diagnóstico oftalmológico y electrofisiológico también participaron el hospital de Manises y el Hospital General de Valencia.

1. RATIO DIAGNÓSTICO Y VARIANTES GENÉTICAS

De las 124 familias que no contaban con un diagnóstico genético con anterioridad a este estudio, se consiguió un diagnóstico completo en 75 de ellas, lo que supone una tasa diagnóstica del 60%. Este porcentaje es comparable al de otros estudios similares en los que también utilizan NGS dirigida a una selección de genes (Bravo-Gil et al. 2016; Bernardis et al. 2016). Sin embargo, el rango de rendimiento diagnóstico publicado en pacientes con DHR varía entre 30-70% independientemente del número de genes incluidos en el panel, incluso cuando se emplea WES o WGS (Tiwari et al. 2016; Carss et al. 2017; Ezquerra-Inchausti et al. 2018; Jespersgaard et al. 2019). Esta diferencia en el rango de rendimiento es principalmente debida a la composición de la cohorte a estudio, obteniendo ratios diagnósticos más altos en aquellas entidades clínicas donde los genes causantes de enfermedad se han identificado prácticamente en su totalidad, siendo del 70-80% en ACL (Kumaran et al. 2017), 80-90% en STGD (Bauwens et al. 2019) y aproximadamente del 50% en RP (Neveling et al. 2012), consistente con los resultados obtenidos en este trabajo.

El fenotipo más prevalente en esta cohorte es RP (58%) seguido de STGD (17%) y el modo más prevalente de herencia es AR, por otra parte, los genes más frecuentemente mutados son *ABCA4* (24%), *USH2A* (11%) y *RPGR* (8%). Estos hallazgos son similares a los descritos en grandes cohortes de DHR de otras poblaciones (Sharon et al. 2019; Holtan et al. 2019; Stone et al. 2017). En los 75 pacientes con diagnóstico genético completo se

identificaron 113 mutaciones únicas distribuidas en 30 genes diferentes, de las cuales 38 se describen por primera vez en este trabajo. Del total de variantes únicas la mayoría eran *missense*, seguidas de *frameshift* y *nonsense*.

Se estima que entre el 7-10% de los pacientes son portadores de una CNV en los genes asociados a DHR (Khateb et al. 2016; Bujakowska et al. 2017; Bauwens et al. 2019). Las técnicas *gold standard* utilizadas para la detección de CNV son los arrays de SNP, arrays CGH o MLPA (Pieras et al. 2011; Steele-Stallard et al. 2013). Sin embargo, desde hace algunos años, se están desarrollando diferentes algoritmos para la detección de CNV a partir de los datos de NGS (Krumm et al. 2012; Pounraja et al. 2019). Estos algoritmos se basan principalmente en la profundidad de las lecturas, la distancia física entre una pareja de lecturas (*paired-end mapping*), la detección de lecturas divididas y comparación con el genoma de referencia (Tattini, D'Aurizio, and Magi 2015). La alta profundidad y uniformidad de lecturas en las distintas regiones contempladas en el panel de este estudio, permitió realizar un análisis de CNV con la herramienta bioinformática DECoN (Fowler et al. 2016), detectando tres deleciones en *EYS*, una deleción en *ABCA4*, una deleción en *PRPF31*, una deleción completa de *MERTK*, una deleción completa de *CRB1* y dos duplicaciones en *ROM1* (Anexos, Tabla VIII.8), suponiendo el 7% (8) del total de mutaciones únicas identificadas. Dichas CNV fueron validadas posteriormente mediante MLPA o CGH array, excepto la duplicación en *ROM1*, que no dispone de MLPA comercial y el CGH array carece de la sensibilidad suficiente para poder detectar esta región. Una de las opciones a contemplar sería utilizar el microarray customizado arrEYE de (Van Cauwenbergh et al. 2017) para confirmar la duplicación identificada en *ROM1*. Por tanto, el ratio de portadores de CNV en nuestra cohorte fue de 6,5% (8), ligeramente inferior a lo estimado. Destacamos la posibilidad de que grandes deleciones o duplicaciones patológicas podrían ser más frecuentes de lo estimado para los casos con DHR (Van Schil et al. 2018). Además, en los casos esporádicos o recesivos en los que se ha identificado un cambio en homocigosis deberíamos tener en mente la posibilidad de que haya una CNV en heterocigosis compuesta.

2. RECLASIFICACIÓN DE PACIENTES

Tras los resultados genéticos obtenidos con la secuenciación del panel de genes, 13 (10%) de las 124 familias fueron reclasificadas tanto clínica como de acuerdo a su patrón de herencia. Cuatro de ellas fueron clínicamente reclasificadas: una de ellas a DMB tras la identificación de mutaciones en *BEST1*, otra en DRIT tras la identificación de una mutación en *C1QTNF5*, otra en distrofia de conos AD tras la identificación de una mutación en *GUCY2D* y la última en acromatopsia congénita tras la identificación de dos mutaciones en *CNGB3*. Las otras nueve familias se han reclasificado genéticamente: una a AR tras la identificación de dos mutaciones en *CNGB1*, tres a herencia AD tras la identificación de una mutación en *PRPF31* y cinco a LX tras la identificación de una mutación en *RPGR*.

La mayoría de casos de RP esporádicos resueltos se clasificaron a RP AR con un bajo riesgo de transmisión a la descendencia, al igual que ocurre en otros estudios (Martin-Merida et al. 2019). Sin embargo, el número de casos con herencia AD y LX no es despreciable. En este estudio uno de los casos reclasificados a LX y dos de los casos reclasificados a AD eran esporádicos. En estos dos últimos casos y en los tres hermanos afectados de la familia fRPN-168, previamente clasificados como RP AR, se identificaron mutaciones en *PRPF31*. El estudio de segregación en los respectivos familiares mostró penetrancia incompleta en las 3 familias, fenómeno ampliamente descrito en pacientes portadores de mutaciones en este gen (Rose et al. 2016; Martin-Merida et al. 2017).

3. CORRELACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO

3.1. Sobreexpresión de ROM1

La proteína de membrana 1 del segmento externo retiniano (*Retinal outer segment membrane protein 1*, ROM1) es una proteína específica de los fotorreceptores localizada en la membrana discal de los segmentos externos de bastones y conos (Moritz and Molday 1996). La función de ROM1 requiere interacción con su homólogo estructural, periferina 2 (*peripherin 2*, PRPH2), con el cual comparte el 55% de nucleótidos y el 35% de identidad de aminoácidos. Concretamente, ROM1 y PRPH2 forman complejos a través de interacciones covalentes y no covalentes que son críticas para la formación y mantenimiento de los segmentos externos de los fotorreceptores (Goldberg and Molday 1996). (Zulliger et al.2018). Más de 150 mutaciones se le han atribuido a PRPH2, dando lugar a un espectro de DHR AR y AD que incluye la distrofia corioidea areolar central, distrofia en patrón, distrofia macular viteliforme de inicio en adultos y RP (Farrar et al. 1991; Schatz et al. 2003; Boon et al. 2007). También se han descrito casos de digenismo con mutaciones en ROM1 y PRPH2 en pacientes con RP (Kajiwara, Berson, and Dryja 1994; Dryja et al. 1997). Sin embargo, los casos de DHR descritos con mutaciones únicamente en ROM1 son muy escasos y ninguno de ellos conlleva una sobreexpresión de la proteína (Anasagasti et al. 2013; Xu et al. 2014; Ma et al. 2019).

Se ha observado que mientras que la sobreexpresión de Prph2 es tolerada por los fotorreceptores (Nour et al. 2004), la sobreexpresión de Rom1 puede ser tóxica para éstos. Chakraborty *et al* estudiaron el papel de Rom1 en los conos utilizando ratones transgénicos con sobreexpresión de Rom1, sugiriendo que la alteración del ratio Rom1/Prph2 por sobreexpresión de Rom1 crea un efecto negativo en la función y estructura del segmento externo del cono (Chakraborty et al. 2012). Estudios más recientes en los que utilizaron ratones *knock-in* que expresaban una proteína quimérica compuesta por el cuerpo de Rom1 y el dominio c-terminal de Pprh2, demostraron que el exceso de Rom1 en ambos fotorreceptores era tóxico, además de que el papel de Rom1 y Prph2 era diferente entre ambos fotorreceptores (Conley et al. 2018). También se ha demostrado que la sobreexpresión de otras proteínas específicas de los fotorreceptores, como la rodopsina, es tóxica para la retina (Tan et al. 2001; Wen et al. 2009).

En este estudio se ha identificado la duplicación del gen ROM1 entero en 2 familias no relacionadas y diagnosticadas de RP. Dichos resultados apoyan a lo publicado previamente sobre el efecto tóxico de la sobreexpresión de ROM1.

3.2. Variabilidad fenotípica intrafamiliar

La degeneración retiniana de inicio tardío (DRIT) es una enfermedad rara autosómica dominante de inicio en la quinta o sexta década de la vida caracterizada por nictalopía, pérdida del campo visual, presencia de depósitos subretinianos (entre el EPR y la coroides) llamadas drusas y, como consecuencia, atrofia del tejido local o neovascularización de la coroides, dando lugar a pérdida de la visión central y ceguera (Jacobson et al. 2014). Todos los casos de DRIT publicados hasta la fecha están causados por mutaciones en *C1QTNF5*, que codifica para C1QTNF5, una proteína de membrana expresada en gran cantidad en las células del EPR que participa en la adhesión celular (Hayward et al. 2003).

Se han descrito solamente unas pocas variantes potencialmente patológicas en *C1QTNF5*, entre ellas la mutación fundadora p.(Ser163Arg) y la mutación p.(Pro188Thr), que comparte residuo mutado con la identificada en este estudio (Hayward et al. 2003; Stanton et al. 2017; Shyamanga Borooh et al. 2018). En este trabajo se describen cuatro casos de una familia con tres generaciones de afectados de DRIT, en los que se ha identificado la mutación *C1QTNF5*: p.(Pro188Leu), previamente no descrita. Sin embargo, hubo variabilidad en la presentación de los síntomas visuales entre los casos de la misma familia. El probando (RPN-234) y su madre (RPN-552) empezaron a manifestar pérdida visual sobre la década de los 50 y fueron diagnosticados de distrofia macular. Sin embargo, la hermana del probando (RPN-509) refirió nictalopía casi diez años más tarde que el debut de su hermano y la degeneración retiniana al diagnóstico fue de predominio periférico y no macular. De hecho, la agudeza visual de la paciente RPN-509 a los 63 años era de 0,9/07 (OD/OI), mientras que la de su hermano a los 65 años era de movimiento de manos en ambos ojos. La variabilidad en la presentación de los síntomas visuales también se ha descrito en otros casos con DRIT (Stanton et al. 2017; Shyamanga Borooh et al. 2018).

Por otra parte, la paciente RPN-640, aunque asintomática, a los 39 años ya presentaba drusas localizadas en el área paramacular temporal observadas en fondo de ojo y OCT, a diferencia de lo expuesto por Borooh *et al* que define, según los datos clínicos recopilados de pacientes con DRIT, el primer estadio de la enfermedad (0-40 años) con fondo de ojo normal (S Borooh et al. 2009). Por tanto, la paciente RPN-640 sería la paciente con mutación en *C1QTNF5* más joven con signos fundoscópicos característicos de DRIT.

3.3. RPGR

El gen regulador de retinosis pigmentaria GTPasa (*retinitis pigmentosa GTPase regulator*, *RPGR*) está formado por 19 exones y codifica para la proteína RPGR, localizada en el cilio conector de los fotorreceptores y cuyas funciones son estructurales y de transporte (Meindl et al. 1996). Hay varias isoformas de *RPGR* derivadas del *splicing* alternativo o modificación postraducciona, que se expresan en diferentes cantidades en varios tejidos (pulmón, riñón,

retina, cerebro, testículos), lo que sugiere que el *splicing* en *RPGR* sea específico de tejido con funciones también específicas de tejido. La isoforma que se expresa en mayor cantidad en la retina contiene un exón terminal 3' llamado exón *open reading frame 15* (ORF15), que incluye el exón 15 y parte del intrón 15 de la isoforma constitutiva. El exón ORF15 codifica para una secuencia repetitiva rica en glicina y ácido glutámico que crea un punto caliente de mutaciones (*hot spot*) (Vervoort et al. 2000). La detección de ORF15 mediante NGS presenta un gran desafío técnico debido a la naturaleza de la secuencia de ADN, de hecho, esta región no está incluida en algunos paneles de genes o no está completamente cubierta (Churchill et al. 2013; Perez-Carro et al. 2016; Stone et al. 2017). En este trabajo, el enriquecimiento de esta región ha permitido secuenciar el exón ORF15 completo, identificando en primer lugar la mutación c.2323_2324del en el paciente control RPN-1 (Tabla III.2) y, posteriormente, las mutaciones: c.2296_2299del, c.2357_2375del, c.2442_2445del y c.2746del en la cohorte de pacientes sin diagnóstico genético previo a la secuenciación del panel de este estudio.

Mutaciones en *RPGR* se han identificado en pacientes con RP (Meindl et al. 1996), degeneración macular (Ayyagari et al. 2002) o distrofias de conos-bastones (Yang et al. 2002). Entre el 70-80% de pacientes con RP XL tienen mutaciones en *RPGR*, de las cuales aproximadamente el 20% están en los exones 1-14 y el 80% en el exón ORF15 (Vervoort et al. 2000; Sharon et al. 2003). La RP LX es una de las formas más severas de RP, con nictalopía en la mayoría de varones afectados antes de los 10 años y progresión a ceguera legal en la tercera o cuarta década de la vida (Flaxel et al. 1999). En dos estudios independientes de 111 y 98 varones con mutaciones en *RPGR* respectivamente, observaron que aquellos pacientes con mutaciones en los exones del 1-14 estaban más afectados que los pacientes con mutaciones en ORF15 (Sharon et al. 2003; Fahim et al. 2011). Además, Sharon *et al* exponen que debido a la peculiar composición de ORF15, no hay un codón de stop en ninguna de las tres pautas en una región de 729 bases y que muchas mutaciones *frameshift* hacia o dentro de la región 5' de ORF15 dan como resultado un largo tramo de codones mutantes aguas abajo del sitio de la mutación antes de un codón de parada. Entre los pacientes con mutaciones en ORF15 descubrieron que cuanto más larga era la secuencia de aminoácidos *wildtype* codificados más leve era la enfermedad y cuanto más larga era la secuencia de aminoácidos anormales codificados más graves era la enfermedad (Sharon et al. 2003).

En este estudio, se han identificado diez varones con mutaciones en *RPGR* procedentes de siete familias diferentes. A diferencia de lo sugerido por Sharon *et al* y Fahim *et al*, en general, no se observan diferencias en la severidad de la RP entre los varones con mutaciones en los exones del 1-14 y los varones con mutaciones en ORF15. Sin embargo, dentro de los pacientes con mutaciones en ORF15, el paciente RPN-343 fue el único caso con un debut de la nictalopía alrededor de los 20 años, siendo portador de la *frameshift* p.(Glu916Lysfs*173). Como sugirieron (Sharon et al. 2003), el fenotipo moderado del paciente RPN-343, comparado

con el resto de pacientes, podría deberse a una secuencia de aminoácidos ORF15 de tipo salvaje más larga capaz de realizar alguna función en comparación con los otros pacientes con variantes en *RPGR* aguas arriba.

A pesar de la herencia LX de *RPGR*, fenotipos de RP moderados y, aunque menos frecuente, severos también se observan en mujeres portadoras (Comander et al. 2015; Nanda et al. 2018). Por tanto, familias RP LX con mujeres afectadas en varias generaciones podrían ser clasificadas erróneamente como AD (Churchill et al. 2013). En este estudio, de las siete familias diagnosticadas genéticamente de RP LX, cuatro fueron inicialmente clasificadas como AD. Por otra parte, aunque la asimetría interocular en mujeres heterocigotas para mutaciones en *RPGR* ya se ha descrito en casos aislados (Jacobson et al. 1989; Acton et al. 2013), en este trabajo destaca por su prevalencia en la cohorte estudiada, ya que el 50% (4) de las mujeres portadoras y sintomáticas presentaron RP asimétrica (Figuras IV.5-IV.8). Los diferentes patrones descritos en mujeres portadoras de mutaciones en *RPGR*, incluida la asimetría interocular, muestran los diferentes fenotipos clínicos que se consideran que suceden como resultado de la inactivación aleatoria del cromosoma X en el desarrollo embriológico temprano. En retinas de ratones se han observado patrones de mosaico debido a la inactivación aleatoria del cromosoma X (Lyon 1961; H. Wu et al. 2014).

En la familia fRPN-158, además de la mutación en *RPGR* son portadores de la mutación p.(Cys140Ser) en *RHO* quizás la RP causada por la mutación p.(Cys140Ser) en *RHO* aún no se ha manifestado o esta variante podría tener un efecto neutral. Siguiendo los criterios de la ACMG, se reclasificó esta variante a significado clínico incierto.

3.4. ABCA4

El gen transportador de casete de unión a ATP tipo 4 (ATP-binding cassette transporter, *ABCA4*) codifica para una proteína transmembrana localizada exclusivamente en el segmento externo de los fotorreceptores que es esencial en el proceso del ciclo visual (Allikmets, Singh, et al. 1997). Hasta la fecha, se han publicado más de 1.000 mutaciones diferentes en el gen *ABCA4* (<https://databases.lovd.nl/shared/genes/ABCA4>), asociadas con una gran variedad de DHR (F. P. Cremers et al. 1998; Rozet et al. 1998; Maugeri et al. 2000), entre las que destacan STGD y distrofia de conos-bastones. La heterogeneidad fenotípica observada en los pacientes con mutaciones en *ABCA4* podría explicarse mediante un modelo de correlación genotipo-fenotipo, en el que la actividad residual de la proteína *ABCA4* mutada determinaría el resultado clínico. Según este modelo, pacientes STGD están normalmente caracterizados por una combinación de una mutación severa y una leve o dos mutaciones moderadamente severas, mientras que los pacientes con un fenotipo más severo como la DCB son portadores de una mutación severa y una moderadamente severa o dos mutaciones severas (Maugeri et al. 1999). Además, estudios posteriores confirman que el fenotipo de la enfermedad correlaciona

con la presencia de variantes severas (Simonelli et al. 2005; Fujinami, Lois, et al. 2013; Kjellström 2014).

Como se esperaba, los efectos más severos sobre la visión se observaron en pacientes con mutaciones deletéreas como deleciones e inserciones que dan lugar a una *frameshift*, codón de parada o variantes de *splicing* (Tabla IV.5). Si comparamos el tipo de mutaciones entre los pacientes con un inicio de la enfermedad temprano (≤ 10 años), con los pacientes con un inicio medio (11-30 años) y éstos, a su vez, los comparamos con los de inicio tardío, se observa que el porcentaje de mutaciones tipo *missense* fue inferior en el primer grupo respecto al segundo (50% vs 77%) y en el segundo respecto al tercero (77% vs 92), mientras que el porcentaje de mutaciones deletéreas fue mayor en el primer grupo (50% vs 23%) respecto al segundo y en el segundo respecto al tercero (23% vs 8%). Esta observación correlaciona con la hipótesis de (Maugeri et al. 1999).

En base a los datos de este estudio, las mutaciones de tipo *missense* en *ABCA4* probablemente severas, identificadas en pacientes con inicio temprano de la enfermedad, serían: p.(Gly991Val), p.(Pro62Ala) (previamente no descrita), p.(Arg602Trp) y p.(Leu1940Pro). Estas dos últimas también han sido clasificadas como severas por otros estudios (Rosa Riveiro-Alvarez et al. 2013; Cornelis et al. 2017).

El alelo p.(Arg1129Leu), también identificado en el primer grupo de pacientes, es el alelo más prevalente en la cohorte de pacientes STGD española (22%). Se asocia principalmente con fenotipo STGD y se considera según Riveiro-Álvarez *et al.* un alelo de severidad moderada (Rosa Riveiro-Alvarez et al. 2013). En este estudio, la prevalencia del alelo p.(Arg1129Leu) es del 26% (12/46). El único caso homocigoto para este alelo, la paciente RPN-294, tuvo un inicio de enfermedad a los 24 años, lo que indicaría según el modelo de correlación genotipo-fenotipo de Maugeri *et al* que esta mutación tendría un efecto moderado. Además, el porcentaje de recurrencia de este alelo en el segundo grupo de pacientes es del 40% frente al 14% del primer grupo. Por otra parte, las mutaciones tipo *missense* p.(Ser1116Phe) y p.(Met61Thr), identificadas por primera vez en este estudio, se podrían clasificar como moderadas o severas, ya que en ambos casos se encuentran en *trans* con p.(Arg1129Leu), considerada moderada, en el segundo y tercer grupo de pacientes, respectivamente. Sin embargo, la mutación p.(Leu1104Pro) se consideraría probablemente severa ya que se ha identificado en *trans* con la mutación p.(Gly863Ala), calificada de efecto leve por (Cornelis et al. 2017).

Si bien las estimaciones anteriores son simples ya que no tienen en cuenta los factores ambientales y las variaciones genéticas en otros loci en estos pacientes, sirven como una buena base para la asociación con el inicio de la enfermedad y gravedad de la enfermedad.

A pesar de que las deleciones en *ABCA4* son muy raras (Yatsenko et al. 2003; Zernant et al. 2014), en la paciente RPN-317 se ha identificado la deleción del exón 16 en *cis* con p.(Arg1129Leu) y la mutación p.(Arg602Trp) en el segundo alelo. Además, en este estudio se ha identificado otro caso con un alelo complejo, la paciente RPN-510, que es portadora de p.[Leu541Pro]; p.Ala1038Val] en *trans* con p.(Gly1961Glu). Ambos casos tuvieron un inicio intermedio de la enfermedad, 13 y 15 años respectivamente. El alelo complejo de la paciente RPN-510 se identificó previamente en varios casos independientes (Cornelis et al. 2017), sin embargo, la paciente RPN-317 es el primer caso con una deleción de un exón en un alelo complejo. Por lo tanto, consideramos importante realizar un análisis cuidadoso de las variantes para evitar la falta de información. En la población general, se estima que el 9-10% de los alelos *ABCA4* patológicos son alelos complejos (Shroyer, Lewis, and Lupski 2000; Cornelis et al. 2017). En la población española este porcentaje de alelos complejos es del 7,2% y se asocian con fenotipo STGD de inicio temprano (\leq diez años) (Rosa Riveiro-Alvarez et al. 2013). En este estudio, estos dos casos identificados suponen el 8,6% de los pacientes con mutaciones en *ABCA4*.

4. PACIENTES CON DIAGNÓSTICO GENÉTICO INCOMPLETO

En 15 de las 124 familias estudiadas no se logró completar el diagnóstico genético, no pudiéndose descartar la presencia del segundo alelo mutado en zonas reguladoras o intrónicas profundas mediante la secuenciación del panel de genes. Tras el estudio de MLPA se descartaron grandes deleciones y duplicaciones en los genes: *ABCA4*, *BEST1*, *EYS* y *USH2A*, en aquellos pacientes portadores de una mutación en alguno de estos genes. También se descartaron mediante secuenciación Sanger mutaciones en regiones intrónicas profundas conocidas. Sin embargo, un estudio realizado en población control estima que 1 de cada 4-5 individuos de la población mundial en general podría ser portador de una mutación asociada a DHR (Nishiguchi and Rivolta 2012), por lo que no podemos descartar la posibilidad de que en alguna de estas familias el gen causante de la enfermedad sea otro, siendo los alelos mutados identificados en este estudio alelos modificadores o hallazgos casuales.

Un caso interesante entre las 15 familias parcialmente diagnosticadas es el de una paciente con RP esporádica que portaba la mutación *CNGA1*: p. (Thr631Met) en el alelo paterno y *CNGB1*: p. (Phe1051Leufs * 12) en el alelo materno. *CNGA1* y *CNGB1* son canales controlados por nucleótidos cíclicos (CNC) que pertenecen a la superfamilia de los canales controlados por voltaje. En los bastones, el canal de CNC está compuesto por tres subunidades *CNGA1* y una *CNGB1*, por tanto, mutaciones en cualquiera de estas subunidades de CNC causarían RP AR (Weitz et al. 2002; Schön, Biel, and Michalakis 2013). Es tentador especular que las proteínas mutantes *CNGB1* y *CNGA1* conducen a un complejo de canales heterotetraméricos de CNC dañado, sin embargo, debido a que no podemos demostrar el digenismo, este caso se incluyó entre los parcialmente diagnosticados.

Otro caso interesante dentro de este grupo es la familia fRPN-SF inicialmente diagnosticada de RP AD. En dos hermanas afectadas de esta familia se identificó la mutación p. (Glu129Lys) en *PDE6B*, previamente descrita como probable patogénica (L. Wang et al. 2018), en *trans* con p. (Asn803Ser), no descrita previamente y que clasificamos como probablemente patogénica. El padre y tía paterna de las pacientes, también afectados, portaban p. (Glu129Lys) en homocigosis, por lo tanto, pensamos que el diagnóstico genético en esa familia se había completado. El análisis posterior en los miembros restantes de la familia identificó las dos mutaciones *missense* en un hermano de 52 años de edad en el que se descartó clínicamente la RP. Por lo tanto, la variante p. (Glu129Lys) se reclasificó como significado clínico incierto y el diagnóstico de la familia fRPN-SF permaneció incompleto.

5. PACIENTES CON MUTACIONES CONCOMITANTES

La alta tasa de portadores de mutaciones asociadas a DHR en la población general ya comentado anteriormente, también supondría que además de la mutación o mutaciones causantes de patología, pueda haber otros alelos mutados. La mala interpretación de tales hallazgos podría complicar el diagnóstico molecular o dar lugar a falsas especulaciones sobre la herencia oligogénica o efectos dominantes de alelos recesivos. En este trabajo se han identificado seis (5%) familias con mutaciones en dos genes que potencialmente ambos podrían ser la causa de la DHR, frente al 1% identificado en otros trabajos (Jespersgaard et al. 2019).

5.1. Familia fRPN-NB

En esta familia, la paciente RPN-573 y su padre (RPN-572) son portadores de la mutación p.(Arg681Cys) en *SNRNP200* (Benaglio et al. 2011) y de la mutación p.(Arg118Cys) en *RP2* (Bader et al. 2003), ambas previamente descritas.

El gen *SNRNP200* codifica para la helicasa hBrr2, la cual es esencial para desenrollar el dúplex snRNP U4/U6, paso clave en la activación catalítica del espliceosoma. Mutaciones en este gen se asocian con RP AD (C. Zhao et al. 2009). Benaglio *et al* identificaron por primera vez la mutación p.(Arg681Cys) en tres pacientes con RP AD procedentes de familias no relacionadas, pero solo dispusieron de familiares para poder segregar la mutación en una de ellas (familia 0270). En esta familia, la mutación en *SNRNP200* se identificó en los tres miembros afectados analizados y en uno no afectado, al cual no pudieron descartarle RP mediante un examen oftalmológico (Benaglio et al. 2011). Estos autores no informan sobre la edad de inicio de la enfermedad en los pacientes, sin embargo, un estudio posterior realizado por Bowne et al en familias con RP AD identifica esta misma mutación en dos familias más (familia UTAD565 y UTAD728), en las que demostraron que la mutación p.(Arg681Cys) segregaba con la enfermedad. La edad de inicio informada por los miembros afectados osciló entre 8 y 35 años. Además, se examinó clínicamente a un miembro (00) *a priori* no afectado de la familia UTAD565, ya que, en base al árbol familiar, debería ser portadora de la mutación pero no pudieron descartarla al carecer de ADN del individuo. La familiar 00 a los 66 años fue diagnosticada de visión normal, aunque clínicamente se detectó una reducción muy pequeña en la campimetría y un tiempo implícito ligeramente retrasado en el ERG-G (Bowne et al. 2013).

En este estudio, la mutación p.(Arg681Cys) en *SNRNP200* se identificó en 13 miembros de la familia fRPN-NB. La edad de inicio de la RP en esta familia varía de 15 a 18 años, con reducción severa del campo visual antes de la quinta década de vida. Cuatro de los portadores de esta mutación presentaron penetrancia incompleta, dos de ellos (RPN-418, RPN-575)

fueron examinadas clínicamente a los 30 y 26 años, respectivamente, obteniéndose una valoración visual completamente normal en ambos casos (Tabla IV.7). Estos hallazgos sugieren que las mutaciones en *SNRNP200*, como las de otros genes de factores de splicing como *PRPF31*, pueden ser de penetrancia incompleta, aunque pueden aparecer hallazgos subclínicos, como los de la paciente de la familia UTAD565 de (Bowne et al. 2013), y aumenta la posibilidad de que los mecanismos compensatorios puedan modificar la expresión clínica del gen como ha sido postulado para *PRPF31* (Rio Frio et al. 2008; Venturini et al. 2012).

Por otra parte, el gen *RP2* es responsable de aproximadamente el 15-20% de los casos de RP LX (Breuer et al. 2002; Branham et al. 2012). Este gen codifica para la proteína RP2 que se expresa ubicuamente y participa en el transporte de proteínas a la membrana plasmática y en el mantenimiento de la cohesión del aparato de Golgi (Patil et al. 2011). Mutaciones en *RP2* se asocian con una RP atípica, caracterizada por atrofia macular de inicio en la infancia, baja agudeza visual y miopía magna (Sharon et al. 2003; Jayasundera et al. 2010). Las mujeres heterocigotas manifiestan un amplio rango de características clínicas que pueden variar desde asintomáticas a síntomas severos similares a los observados en varones afectados (Jayasundera et al. 2010). La mutación p.(Arg118Cys) en *RP2* se informó por primera vez por (Bader et al. 2003), pero no aportaron información sobre el fenotipo del paciente. Posteriormente, Jayasundera *et al.* identifican esta mutación en un varón con atrofia periférica similar a coroideremia de inicio a los 12 años y una agudeza visual de 0,3/0,1 a los 13 años (Jayasundera et al. 2010).

En este estudio, la mutación en *RP2*, se identificó en cuatro varones y siete mujeres. De los varones que disponemos de información, la edad de inicio de la enfermedad fue a los dos años, con una reducción severa del campo y la agudeza visual antes de los 30 años, en el caso del paciente RPN-576. De los pacientes RPN-481 y RPN-569, no disponemos de datos clínicos anteriores a los informados, pero el paciente RPN-481 a los 67 años es ciego total y su sobrino, a los 38 años, tiene una agudeza visual de movimiento de manos en ambos ojos (Tabla IV.7). Estos datos hacen suponer que la atrofia macular en estos pacientes pudo debutar en la infancia, tal y como se ha descrito en otros varones con mutaciones en *RP2* (Y Wada et al. 2000; Sharon et al. 2003). Además, algunos estudios afirman que los varones afectados con mutaciones en *RP2* tienen un fenotipo más severo que los que tienen mutaciones en *RPGR* (Jayasundera et al. 2010; Kurata et al. 2019). Concretamente, Kurata *et al.* observaron que la agudeza visual y los campos visuales de estos sujetos disminuyeron con el aumento de la edad y tendieron a ser peores en los pacientes con mutaciones *RP2*. En los varones afectados con mutaciones en *RPGR* de este estudio, de los que disponemos de datos clínicos, se observaron valores de agudeza visual igual o cercanos a la unidad en pacientes de una edad comprendida entre 10-16 años (Tabla IV.7). Los dos restantes (RPN-301, RPN-343) obtuvieron valores de 0,3/0,4 y 0,3/0,3 con 20 y 34 años, respectivamente. Por otra parte, el

paciente RPN-576 con mutación en *RP2* tiene un campo visual prácticamente abolido y unos valores de agudeza visual de 0,05 en ambos ojos a los 30 años (Tabla IV.7). Estos resultados muestran un fenotipo más severo para el paciente con la mutación en *RP2* respecto a los varones afectados con mutaciones en *RPGR*, acorde con los casos previamente descritos (Jayasundera et al. 2010; Kurata et al. 2019).

Todas las mujeres portadoras de la mutación p.(Arg118Cys) en *RP2* eran asintomáticas, excepto la paciente RPN-573. En las exploraciones oftalmológicas realizadas a cuatro de ellas no se observaron hallazgos sugestivos de RP. Hasta la fecha, no se han descrito diferencias en la severidad fenotípica entre portadoras de *RPGR* y *RP2*, sin embargo, en este estudio, el 53% (8/15) de las mujeres heterocigotas para *RPGR* manifestaron RP frente al 14% (1/7) de las heterocigotas para *RP2*. De hecho, la RP en la paciente RPN-573, podría ser causada por la mutación en *SNRNP200* y ser asintomática para *RP2*, ya que también hay casos descritos con mutaciones en este gen y un inicio de la enfermedad entre 7-8 años, similar a la de nuestra paciente (Li et al. 2010). Además, el campo visual y los valores de agudeza visual de la paciente RPN-573 son similares a los de sus familiares de edades parecidas y portadores solo de la mutación en *SNRNP200* (Tabla IV.7).

5.2. Familia fRPN-142

En el probando (RPN-301) de la familia fRPN-124 se identificó una variante deletérea en *RPGR* que explicaría la RP en su familia, ya que su abuela y su primo también afectados eran portadores de la misma mutación. Sin embargo, en el paciente RPN-301 también se identificó la delección de una y cuatro bases en *BEST1* y *SNRNP200*, respectivamente, que no compartía con sus familiares afectados. Ninguna de las mutaciones identificadas en estos tres genes ha sido informada previamente.

El gen *BEST1* se expresa principalmente en el EPR, aunque también se ha detectado expresión en riñón, cerebro, médula espinal y testículos. Este gen codifica para la proteína bestrofina-1 localizada en la membrana plasmática basolateral del EPR y participa en la regulación de los canales dependientes de voltaje (Marquardt et al. 1998; Petrukhin et al. 1998). Mutaciones en *BEST1* se asocian principalmente a distrofia macular de Best y distrofia foveomacular viteliforme del adulto, ambas pueden presentar herencia AD y AR (Boon et al. 2009). En el paciente RPN-301, la mutación en *BEST1* fue heredada de su padre, el cual era totalmente asintomático, por lo que, a pesar de que se hayan descrito casos con herencia AD en *BEST1*, lo más probable es que en esta familia la mutación p.(His326GlnfsTer9) se comporte de forma AR.

Por otra parte, en este paciente se identificó la mutación p.(Tyr199Valfs*2) en *SNRNP200*, no identificada en ninguno de sus progenitores, por lo que sería una mutación de *novo*. Como

ya se ha comentado, mutaciones en el gen *SNRNP200* se asocian con RP AD, por tanto sería esperable que esta *frameshift* causara RP en el paciente. Sin embargo, es difícil predecir la implicación de esta mutación en el fenotipo del paciente ya que los primeros signos podrían estar enmascarados por una RP avanzada debida a la mutación en *RPGR*. En cualquier caso, podría ser esperable un fenotipo más severo en el paciente RPN-301, debido a la mutación en *SNRNP200*, respecto a su primo (RPN-302). Sin embargo, el paciente RPN-302 a la edad de 10 años presenta un curso de la enfermedad más agresivo que el paciente RPN-301, debido a la atrofia del ERP macular y signos de coroidosis avanzada. No hay que olvidar que en este gen se han descrito mutaciones con penetrancia incompleta, como los casos descritos y comentados anteriormente, fenómeno que también podría ocurrir con la mutación p.(Tyr199Valfs*2).

5.3. Familia fRPN-51

En esta familia, el estudio genético identificó las mutaciones p.(Glu328*) y p.(Arg602Trp) en el gen *ABCA4*, previamente descritas, en la paciente RPN-129. Esta paciente fue diagnosticada de STGD con 13 años cuando ya tenía unos valores de agudeza visual de 0,1 en ambos ojos. En cambio, su padre (RPN-128) y su hermano (RPN-544) empezaron con los síntomas de la enfermedad a los 40 y 36 años, respectivamente. El padre, como era de esperar, compartía una mutación con su hija, pero su hermano solamente era portador de una de las dos mutaciones identificadas en la paciente RPN-129. Como ya se ha comentado, mutaciones en *ABCA4* se asocian con DHR de herencia AR y en esta familia, se observaba también cierto componente de herencia vertical, ya que el padre y dos de los tres hijos padecían una distrofia de retina. Puesto que el hermano y padre de la probando presentaron un debut similar entre ellos y distinto con respecto a la paciente RPN-129, y que el paciente RPN-544 no presentaba el mismo genotipo que su hermana, se pensó en que quizás los pacientes RPN-128 y RPN-544 tuviesen una mutación en un gen de herencia AD que diese lugar a un fenotipo similar a STGD como *PRPH2* o *ELOVL4* (Yi et al. 2012; Bardak et al. 2016).

Tras la secuenciación del panel de genes, no se identificaron variantes potencialmente patológicas en los genes sospechados, pero se identificaron las mutaciones p.(Glu328*) y p.(Gly1961Glu) en *ABCA4*, completando el diagnóstico genético en la familia. La variación fenotípica observada en la familia fRPN-51 podría explicarse con el modelo de correlación fenotipo-genotipo para los alelos de *ABCA4* ya comentado de (Maugeri et al. 1999). Como se observa en la Tabla IV.5, las mutaciones p.(Glu328*) y p.(Arg602Trp) se consideran severas y la mutación p.(Gly1961Glu) leve. Según este modelo, a la paciente RPN-129, portadora de dos mutaciones severas en heterocigosis compuesta, le correspondería un inicio más temprano y

curso de la enfermedad más severos que a su padre y hermano, que son portadores de una mutación severa en *trans* con una mutación leve.

5.4. Familia fRPN-219

Estos dos hermanos, a diferencia de la familia fRPN-51, comparten las mismas mutaciones en el gen *ABCA4*. Sin embargo, hay una variación en la percepción del comienzo de los síntomas. La paciente RPN-507 refiere pérdida visual desde los 3 años aproximadamente, mientras que su hermano lo percibió a los 15 años, siendo su agudeza visual de 0,05/0,15 en el momento del diagnóstico a los 16 años. A los 24 años, ambos hermanos obtuvieron idénticos valores de agudeza visual, lo que hace pensar en un curso de la enfermedad bastante homogéneo entre ellos.

Además, la paciente RPN-507 es portadora de las mutaciones p.(Arg217Trp) (Tripathi et al. 1992) y p.(Arg402Gln) en el gen *TYR*, esta última en homocigosis. El gen *TYR* codifica para la tirosinasa, una oxidasa que contiene cobre y que cataliza las dos primeras reacciones de la biosíntesis de melanina. Mutaciones en este gen dan lugar a albinismo oculocutáneo de tipo 1 (*oculocutaneous albinism*, OCA), una enfermedad autosómica recesiva, que en función de la actividad residual de la enzima se subdivide en tipo 1A y 1B (Park and Gilchrist 1999; Simeonov et al. 2013). OCA1A es la forma clínica más severa caracterizada por la ausencia completa de pigmentación en piel, pelo, iris y EPR, con la consiguiente hipoplasia foveal, disminución de la agudeza visual, fotofobia, nistagmus y estrabismo (Fukai et al. 1995). Este tipo de OCA se asocia con alelos nulos o patogénicos en *TYR*. Mutaciones menos severas en *TYR* dan lugar a OCA1B caracterizado por un fenotipo más suave y extremadamente variable debido a la disminución pero no ausencia de la actividad tirosinasa (Norman et al. 2017; Arshad et al. 2018). Estos pacientes carecen de pigmento de melanina al nacer pero van acumulando durante la infancia y edad adulta (Tripathi et al. 1992).

La variante p.(Arg402Gln) fue descrita por primera vez como un polimorfismo no patológico sensible a la temperatura. En estudios de expresión *in vitro*, se observó que la proteína mutada Gln402 a una temperatura fisiológica (37°C) reduce su actividad catalítica (Tripathi et al. 1991). Otros estudios observaron que la proteína Gln402 a 37°C se retiene en el retículo endoplásmico de los melanocitos (Halaban et al. 2000). Por sí sola, esta variante no es suficiente para causar albinismo, ya que se han identificado individuos no afectados que son homocigotos para p.(Arg402Gln) y no muestran signos clínicos de albinismo (Tripathi et al. 1992; Preising et al. 2011). Otros autores afirman que esta mutación da lugar a albinismo parcial cuando se encuentra en *trans* con una variante patogénica (Hutton and Spritz 2008; Chiang, Spector, and Tsai 2009). Por otra parte, la mutación p.(Arg217Trp) se identificó por primera vez en un paciente con OCA1A en heterocigosis compuesta con p.(Pro81Leu) (Tripathi et al. 1992). Posteriormente, se ha visto que esta mutación es bastante recurrente

entre los pacientes OCA1 independientemente de la etnia (Ghodsinejad Kalahroudi et al. 2014; Shahzad et al. 2017).

Por tanto, podríamos decir que la paciente RPN-507 presenta un albinismo parcial que categorizaríamos de OCA1B, causado probablemente por las mutación p.(Arg217Trp) y p.(Arg402Gln), ya que, como se ha comentado, esta última variante en homocigosis no produciría albinismo. Por otra parte, tanto ella como su hermano (RPN-508) son heterocigotos compuestos para las mutaciones p.(Arg1129Leu) y p.(Leu1940Pro) en el gen *ABCA4*. Sin embargo, la paciente RPN-507 se clasificó dentro del primer grupo de pacientes definido por un inicio de la enfermedad temprano (<10 años) y su hermano en el grupo intermedio (11-30 años) (Tabla IV.5). A pesar de que los últimos hallazgos oftalmológicos muestren una evolución homogénea entre los dos hermanos, el OCA1B en la paciente RPN-507 pudo ser la causa de un inicio precoz en la manifestación de la enfermedad, ya que estos pacientes de manera congénita carecen de pigmento y poco a poco van acumulándolo (Tripathi et al. 1992).

5.5. Familia RPN-194

Mediante el estudio del panel de genes, en el paciente RPN-432 se identificaron las variantes p.(Thr153Met) (Kohl et al. 1998) y p.(Ala469Thr) (Reuter et al. 2008) en el gen *CNGA3* y la mutación *de novo* p.(Pro2301Leu) en *PRPF8*, previamente no descrita.

El gen *CNGA3*, al igual que *CNGA1* y *CNGB1* comentados anteriormente, codifica para canales controlados por nucleótidos cíclicos (CNC) que pertenecen a la superfamilia de los canales controlados por voltaje. *CNGA3* y *CNGB3* codifican las subunidades A3 y B3, respectivamente, de los canales CNC de los conos. Estos canales se localizan en el segmento externo del fotorreceptor y tienen un papel importante en el proceso de fototransducción (Bönigk et al. 1993; Gerstner et al. 2000). Mutaciones en *CNGB3* deterioran la función de los conos y son una causa de acromatopsia (ACHM2, MIM #216900), una DHR AR que puede diferenciarse en forma completa o incompleta. Los síntomas típicos de la acromatopsia completa son agudeza visual fuertemente disminuida (0,1-0,2), pérdida de la capacidad de discriminación de los colores, extrema fotofobia y nistagmus, mientras que la acromatopsia incompleta se caracteriza por un fenotipo más leve con visión residual del color y una disminución de la agudeza visual menos severa (Kohl et al. 1998; Wissinger et al. 2001).

La mutación p.(Ala469Thr) se identificó por primera y única vez en *trans* con p.(Arg277Cys) en un paciente con una ligera alteración en la capacidad para diferenciar los colores y un ERG con ausencia de respuestas para conos (Reuter et al. 2008). Por otra parte, la variante p.(Thr153Met) se identificó por primera vez en un paciente con otras dos *missense* heterocigotas. Mediante estudios de segregación familiar observaron que la variante p.(Thr153Met) estaba en el mismo alelo que otra de las sustituciones identificadas y mucho

más conservada entre los miembros de la familia de canales CNC que p.(Thr153Met), por lo que no se consideró patológica (Kohl et al. 1998). Estudios in vitro demostraron que la mutación p.(Thr153Met) disminuye la sensibilidad del ligando A3+B3 de los canales CNC, pudiendo contribuir a la susceptibilidad a enfermedad cuando se combina con otros factores genéticos o no genéticos (Meighan, Peng, and Varnum 2015). Por tanto, en los pacientes de la familia fRPN-194 de este estudio, el polimorfismo p.(Thr153Met) en *trans* con p.(Ala469Thr) podría inducir a enfermedad. Sin embargo, según los hallazgos de las pruebas oftalmológicas y electrofisiológicas de estos pacientes, el fenotipo es más parecido a una retinopatía periférica tipo RP que a una distrofia de conos.

El gen *Pre-mRNA splicing factor 8 (PRPF8)* codifica para una gran proteína nuclear altamente conservada que estimula la helicasa Brr2 requerida para la activación del espliceosoma (Smith, Query, and Konarska 2008). Mutaciones en este gen se asocian con RP AD (McKie et al. 2001). Se han descrito casos con marcada variabilidad fenotípica intrafamiliar y penetrancia incompleta asociados con mutaciones en este gen (van Lith-Verhoeven et al. 2002; Maubaret et al. 2011). La mutación potencialmente patológica p.(Pro2301Leu), identificada en el paciente RPN-432 de este estudio, no se ha informado previamente. Sin embargo, sí se han descrito casos con la mutación p.(Pro2301Thr) (McKie et al. 2001) y p.(Pro2301Ser) (Ziviello et al. 2005). La mutación identificada en PRPF8 podría explicar la RP en el paciente RPN-432, sin embargo, su hermana también afectada no es portadora de dicha mutación.

5.6. Familia fRPN-169

En la probando y única afectada de la familia fRPN-169 se identificaron las mutaciones p.(Thr352Ile) (F. P. M. Cremers et al. 2007) y p.(Glu767Serfs*21) (Dreyer et al. 2001) en el gen *USH2A* y la mutación p.(Ile681Asnfs*17) en *RP1*, no descrita previamente.

El gen *USH2A* codifica para una proteína transmembrana compleja con un enorme dominio extracelular (Eudy et al. 1998). Mutaciones en este gen suponen el 80% de los casos de Síndrome de Usher tipo 2 (MIM #608400) y el 10-15% de los casos de RP AR (Fahim, Daiger, and Weleber 2000; Garcia-Garcia et al. 2011). Por otra parte, el gen *RP1* se asocia con RP AD y AR (Blanton et al. 1991; Avila-Fernandez et al. 2012). La mutación p.(Ile681Asnfs*17) en *RP1* no se ha descrito previamente, pero sí la mutación p.(Arg677*) asociada a RP AD (Pierce et al. 1999). En esta paciente el fenotipo clínico podría estar causado por ambos genes.

6. ESTUDIOS FUNCIONALES MEDIANTE MINIGENES

Las mutaciones que afectan al procesamiento del pre-ARNm no son insignificantes en la población. Hasta la fecha, del total de variantes publicadas en HGMD Professional 2019.3 (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>, acceso diciembre, 2019), el 8,7% (269.419 / 23.354) son mutaciones causantes de enfermedad que afectan al *splicing*. Sin embargo, esta estimación parece aún conservadora porque las mutaciones en regiones codificantes normalmente se consideran como *missense*, *nonsense* o silenciosas, lo que puede dar lugar a una clasificación errónea de las mutaciones de *splicing* y la subestimación del número de éstas (Cartegni, Chew, and Krainer 2002).

Es complicado predecir las consecuencias de variantes tipo *missense*, sinónimas e intrónicas, para después poder discriminar aquéllas que son neutras de las que tienen efecto patogénico. Las variantes que supuestamente afectan al mecanismo de *splicing* normalmente se consideran patogénicas en base a la conservación de su sitio canónico de *splicing*, su ausencia en población control, la cosegregación con la enfermedad en las familias y los resultados de los predictores bioinformáticos (Sangermano et al. 2018). En este trabajo, se han utilizado los algoritmos HSF y MaxEnt para predecir el efecto sobre el *splicing* de las variantes identificadas en nuestra cohorte. La interpretación de los datos *in silico* y el establecimiento de los umbrales se eligieron en base a trabajos previos (Desmet et al. 2009). Siguiendo estos criterios, se seleccionaron 13 cambios que potencialmente podrían afectar a este mecanismo (Tabla IV.8). Sin embargo, estos resultados son solamente predicciones computacionales, así que se requiere de estudios adicionales para confirmar el efecto en el procesamiento del ARNm. Se ha visto que los ensayos *in vitro* mediante minigenes son una aproximación útil para determinar el efecto de estas variantes cuando los genes presentan un perfil de expresión restringido y la muestra de tejido específico es difícil de obtener (Roepman and Wolfrum 2007). Los ensayos funcionales con minigenes realizados en este trabajo revelaron que seis de las 13 variantes estudiadas afectaban al mecanismo de *splicing*. A continuación se comenta cada una de ellas.

6.1. Mutaciones con efecto deletéreo observado

La mutación c.637_639del en *BEST1* supone la delección de las tres primeras bases del exón 6 de este gen. Los resultados del predictor spliceAI para esta mutación indican que se producirían dos eventos: la pérdida del sitio aceptor natural y la activación de un sitio críptico aceptor. A diferencia de los resultados de los algoritmos HSF y MaxEnt que no atribuyen correctamente estos dos eventos. A pesar de que esta variante no cumplía con el umbral de impacto establecido para MaxEnt (variación del VC >30%), se analizó mediante minigenes ya que el paciente RPN-106 era heterocigoto compuesto para esta variante y para la mutación

p.(Ile201Thr) (Lotery et al. 2000) en *BEST1*. El resultado de los minigenes para la construcción MT demuestra que hay un salto del exón 6. Sin embargo, la delección de este exón no alteraría la pauta de lectura, dando lugar a la proteína mutada p.(Glu212_Gln238del). La bestrofina-1 es una proteína de canal que conduce aniones a través de la membrana del EPR (Sun et al. 2002). La alteración de la secuencia primaria de esta proteína tendría un impacto negativo en la conductancia iónica, acorde con la disminución o ausencia de la respuesta en el EOG descrito en los pacientes con la enfermedad de Best (Weleber 1989). Estudios histopatológicos de la retina de un paciente con la enfermedad de Best y la mutación p.(Tyr227Asn) sugieren que esta mutación podría dar lugar a un transporte erróneo de la bestrofina-1 a su destino en la célula (Mullins et al. 2005). Posteriormente, Doumanov *et al.* demostraron que el motivo Tyr227AspTrpIle es esencial en el adecuado envío de la bestrofina-1 a la membrana basolateral de las células del EPR (Doumanov et al. 2013). Por todo ello, consideramos que el exón 6 de *BEST1* es esencial en la función de la proteína, y que la variante c.637_639del, previamente no descrita, sería potencialmente patogénica. El paciente RPN-106 es uno de los reclasificados clínicamente después del diagnóstico genético, ya que inicialmente fue diagnosticado de STGD.

En el ensayo de la variante c.2153-12_2155del en *CACNA2D4*, que también afectó al sitio natural aceptor, se observó la pérdida del exón 23 en la construcción que contenía la mutación, al igual que ocurrió para la mutación en *BEST1*. Sin embargo, el diagnóstico genético del paciente RPN-424, portador de esta variante, no estaría resuelto, ya que el gen *CACNA2D4* se asocia a distrofia de conos AR (Wycisk et al. 2006) y el paciente no presenta mutaciones adicionales en las regiones analizadas de este gen.

La mutación c.755A>G en *MAK*, que no se encuentra cerca de los sitios de *splicing* 3' y 5', dio lugar a la pérdida de los 92 nucleótidos iniciales del exón 8 debido a la creación de un nuevo sitio aceptor. Esta mutación también afectó a otro sitio aceptor, distinto al natural, que también estaba siendo utilizado. Estos resultados coinciden con los obtenidos de los predictores bioinformáticos. Sin embargo, a pesar de reclasificar esta variante como potencialmente patogénica, el diagnóstico genético de la paciente portadora (RP-677) no estaría resuelto.

Por otra parte, las mutaciones localizadas en la última posición del exón, *FSCN2*: c.1105G>A y *MERTK*: c.1450G>A, junto a *RIMS1*: c.2544+4A>G, dieron lugar a la pérdida del sitio natural donador. En el caso de las variantes en *FSCN2* y *MERTK* se reconocieron otros sitios donadores crípticos, que dieron lugar a la delección de parte del exón o a la inserción de pb intrónicas, según la localización del donador activado. Sin embargo, en el caso de la variante en *RIMS1*, no se reconoció otro sitio donador, dando lugar a la pérdida completa del exón.

La variante *FSCN2*: c.1105G>A se identificó en la probando (RPN-304) de la familia fRPN-144 y en sus dos familiares también afectadas (RPN-415 y RPN-416) de distrofia macular STGD-like (Anexos, Tabla VIII.8). En las tres paciente, además se identificó la mutación p.(Gly167Ser) en *PRPH2* descrita como patológica y asociada al fenotipo de las mujeres (Testa et al. 2005). Mutaciones en *FSCN2* inicialmente se asociaron a RP AD y distrofia macular AD debido a que encontraron la delección c.72del en cuatro y dos familias japonesas con RP AD y degeneración macular AD, respectivamente (Y Wada et al. 2001; Yuko Wada et al. 2003). Un estudio posterior realizado en población china, detectó esta delección en ocho de 242 pacientes con degeneración retiniana y en 13 de 521 individuos control (Zhang et al. 2007). Sin embargo, esta delección no se encontró en 458 familias con degeneración retiniana procedentes de otros grupos étnicos. En cambio, se identificaron en este gen otras variantes tipo *missense*, pero que no cosegregaban con la enfermedad en las familias. (Gamundi et al. 2005; Ziviello et al. 2005; Sullivan et al. 2006). Eisenberger *et al* (Eisenberger et al. 2013) identificaron cinco variantes en una cohorte de 126 pacientes con RP y LCR, pero como mutaciones adicionales, como los casos de la familia fRPN-144 de este estudio. Por todo ello, actualmente se desconoce la implicación de *FSCN2* en la fisiopatología de las DHR, por lo que no podemos concluir que la mutación *FSCN2*: c.1105G>A sea potencialmente patogénica, a pesar de que tenga un efecto aberrante en el *splicing*. Quizás tenga un papel de modificador de la enfermedad.

6.2. Mutaciones sin efecto deletéreo observado

Las variantes *ABCA4*: c.6148G>C e *IDH3B*: c.532A>G, a pesar de que no cumplían con el umbral de impacto establecido para los predictores, se estudiaron *in vitro* por localizarse en la primera posición del exón. Ninguna de ellas demostró alterar el correcto procesamiento del pre-ARNm, acorde con los resultados *in silico*. Además, la variante c.6148G>C en *ABCA4* se quiso estudiar ya que no hay consenso sobre la interpretación clínica de esta variante en la bibliografía. El cambio c.6148G>C en *ABCA4* se describió por primera vez por Allikmets *et al.* como c.6034G>C p.(Val2012Leu), identificada en heterocigosis, en dos familias independientes diagnosticadas de enfermedad de STGD (Allikmets, Singh, et al. 1997), y tradicionalmente se ha considerado como una mutación causante de patología (Corton et al. 2013; Carss et al. 2017). Sin embargo, una revisión exhaustiva de la literatura realizada por Cornelis *et al.* clasifica esta variante de significado clínico incierto (Cornelis et al. 2017). Además, en muchos de los casos en los que se ha identificado la variante p.(Val2050Leu) no se ha identificado la segunda mutación y/o se ha identificado en pacientes resueltos con mutaciones en otros genes y fenotipo de RP (Briggs et al. 2001; Poloschek et al. 2010; Haer-Wigman et al. 2017; Jespersgaard et al. 2019). Por todo ello, consideramos que esta variante debería ser interpretada con precaución, especialmente en el contexto del asesoramiento genético y reproductivo. En este trabajo, la variante p.(Val2050Leu) se ha identificado en tres

pacientes procedentes de distintas familias, con fenotipo de RP y diagnóstico genético no resuelto (Anexos, Tabla VIII.7). Incluso si esta variante fuera ciertamente patogénica, no explicaría la causa de la enfermedad en nuestros pacientes. Por todo lo expuesto anteriormente y siguiendo los criterios de la ACMG, hemos clasificado esta variante de significado clínico incierto.

Los ensayos funcionales con minigenes para las variantes *ABCA4*: c.2972G>T, *CNNM4*: c.2039C>T y *RHO*: c.316G>A no mostraron alteración en el mecanismo de *splicing*. Para estas variantes, los predictores bioinformáticos indicaron una combinación de eventos: la creación de un nuevo sitio donador y la creación de un nuevo sitio *silencer*. En el caso de la variante en *RHO*, tanto el procesamiento de la construcción WT como MT no contiene el exón 1 a estudio, probablemente porque en el diseño del minigen no se hayan incluido secuencias reguladoras necesarias para su reconocimiento. Sin embargo, en la construcción MT tampoco se observa la inclusión de parte del exón que deberíamos observar si realmente hubiese un nuevo sitio aceptor debido a la mutación a estudio. Por lo que el sitio aceptor sugerido por los predictores no se utiliza. Estos resultados confirmarían que el efecto patológico de las mutaciones *ABCA4*: c.2972G>T y *RHO*: c.316G>A, previamente descritas (Fujinami, Zernant, et al. 2013; Inglehearn et al. 1992), es a nivel de proteína y no de alteración del *splicing*.

Por último, tampoco se observó efecto deletéreo en los minigenes de las variantes *PRPF31*: c.182C>G y *RPGRIP1*: c.930+3A>G. En el caso de la variante en *PRPF31*, el predictor de nueva generación spliceAI es el único de los tres que coincidiría con el resultado obtenido *in vitro*. En el caso de la variante en *RPGRIP1*, los resultados obtenidos *in vitro* estarían de acuerdo con el umbral de impacto establecido por Desmet *et al* para las variantes localizadas en las posiciones +3 y +5 (variación del VC >15%) (Desmet et al. 2009).

En resumen, tres de las mutaciones inicialmente clasificadas de tipo *missense*: *FSCN2*: c.1105G>A, *MAK*: c.755A>G, *MERTK*: c.1450G>A y dos deleciones: *BEST1*: c.637_639del y *CACNA2D4*: c.2153-12_2155del, se han reclasificado a mutaciones que afectan al *splicing*. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo todo tipo de variante sospechosa de ser patológica debería ser analizada mediante herramientas bioinformáticas, y cuando se observen altas variaciones de puntuación, dichas variantes deberían ser estudiadas mediante ensayos *in vitro*, para evitar resultados tanto falsos positivos como falsos negativos. El proceso de *splicing* observado mediante minigenes no siempre refleja el proceso real en los tejidos afectados. La restricción del tamaño de las construcciones representa una limitación importante para evaluar completamente el efecto de variantes en sitios de *splicing* no canónicos. Como se muestra aquí, es importante estudiar las variantes en sitios de *splicing* no canónicos en el contexto de sus intrones aguas arriba o aguas abajo y exones, ya que su efecto a menudo está influenciado por otros elementos intrónicos *cis*-reguladores o afecta a

exones ubicados a distancias considerables. Otro inconveniente del ensayo de *splicing in vitro* es que las células HEK293 no siempre imitan los defectos de *splicing* que podrían ocurrir en la retina del paciente. De hecho, hay estudios que indican que en la retina hay factores de *splicing* específicos (Murphy et al. 2016; Parfitt et al. 2016b). A pesar de ello, los minigenes son una buena aproximación para determinar la naturaleza patogénica de las variantes de *splicing* cuando es difícil obtener ARN del tejido del paciente, como en el caso de los genes de DHR, que la mayoría de ellos presentan un perfil de expresión restringido asociado a fotorreceptores y células del EPR.

7. PACIENTES NO RESUELTOS

Existen varias hipótesis que podrían explicar que en un 27% (34/124) de los pacientes estudiados no se haya identificado la/s mutación/es responsables de la enfermedad, como son:

- Variantes en el promotor u otros elementos reguladores no detectados o reconocidos por la estrategia de secuenciación de este estudio.
- Relaciones de heterocigosidad entre genes conocidos.
- Mutaciones de *splicing* no reconocidas.
- Grandes duplicaciones, deleciones, inversiones o translocaciones no detectados por la estrategia de secuenciación de este estudio.
- Mutaciones en genes DHR no incluidos o descubiertos después del diseño del panel.
- Mutaciones en genes todavía no descubiertos o asociados a DHR.
- Que el paciente realmente no tenga una DHR y presente un fenotipo similar.

La alta variabilidad fenotípica de estos pacientes, el solapamiento clínico con otras formas de DHR y en ocasiones, la escasa información clínica disponible, dificulta enormemente su diagnóstico. Por ello, el uso de aproximaciones que nos permitan abarcar todos los genes asociados a DHR, como el estudio del exoma o genoma completo, ayudaría a incrementar la tasa diagnóstica de aquellos pacientes de los que no se disponga prácticamente de información clínica.

8. PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS

En esta última década se ha incrementado exponencialmente la investigación en terapias dirigidas a las DHR. Actualmente, existen 110 ensayos con intervención para la RP, 20 para STGD y cinco para el síndrome de Usher (<https://clinicaltrials.gov/>).

La importancia de las mutaciones de *splicing* en la patogénesis de enfermedades genéticas dio lugar a numerosos estudios experimentales y clínicos que se centran en el desarrollo de fármacos que pueden revertir el efecto de estas mutaciones. La aproximación más prometedora para este tipo de mutaciones es el uso de oligonucleótidos antisentido (*antisense oligonucleotides*, AON) (Bergsma et al. 2018). Los AON son moléculas cortas y sintéticas de ADN o ARN que reconocen fragmentos de pre-ARNm diana complementarios y pueden modular su *splicing* bloqueando los sitios de unión para proteínas involucradas en la regulación del proceso de *splicing*. Los AON sintéticos se pueden usar para evitar el *splicing* aberrante o para inducir una exclusión de un exón adicional para restaurar el marco de lectura adecuado (Siva, Covello, and Denti 2014). Esta aproximación ya ha demostrado su potencial terapéutico para diferentes genes asociados a DHR, tal como *CEP290* (R. W. Collin et al. 2012; Gerard et al. 2012; Garanto et al. 2016), *USH2A* (Slijkerman et al. 2016) o *ABCA4* (Albert et al. 2018). Uno de los ensayos clínicos con AON que actualmente está en fase I/II es el estudio STELLAR (NCT03780257), dirigido a los pacientes con síndrome de Usher tipo 2 o retinosis pigmentaria debida a mutaciones en el exón 13 de *USH2A*. El tratamiento consistiría en una única dosis intravítrea del fármaco QR-421a, un AON de ARN, con la finalidad de que se produzca un salto del exón 13 en *USH2A*.

Por otra parte, ya existe un fármaco aprobado por la FDA y la Agencia Europea de Medicamentos dirigido a pacientes con Amaurosis congénita de Leber debido a mutaciones en *RPE65*. Este fármaco, llamado LUXTURNA (voretigene neparovec-rzyl), es un vector viral modificado dirigido a proporcionar a las células del EPR una copia normal del gen *RPE65* (NCT00999609).

Sin embargo, para poder aplicar cualquiera de las aproximaciones basadas en terapia génica se requiere conocer previamente el gen mutado en cada caso o incluso la mutación exacta causante de la enfermedad. La importancia de esta tesis radica en la identificación de las mutaciones responsables de enfermedad en una amplia cohorte de pacientes afectados de DHR, de manera rápida y precisa. Con la finalidad de que estos pacientes puedan beneficiarse de futuros tratamientos o ensayos clínicos.

VI. CONCLUSIONS

- 1- The NGS technology applied in this work, based on a panel of 117 genes previously associated with IRD, has allowed us to reach a diagnostic rate of 60%, similar to larger panels, WES and / or WGS.
- 2- The sequencing of a panel of genes demonstrates its effectiveness as a first option in the diagnostic process, by assuming a lower economic cost, speeding up the analysis and interpretation of the data, facilitating the storage of the data and reducing the frequency of false negative due to low coverage. The gene panel designed in this study is used in clinical practice for the diagnosis of NS-IRD.
- 3- The most frequently mutated genes in our cohort are *ABCA4*, *USH2A*, *RPGR* and *PRPH2*, that accounted for the 50% of the cases solved.
- 4- Of all the variants identified, 39% were classified as variants of uncertain clinical significance and 27% as pathogenic or probably pathogenic, of which 38 mutations are described for the first time in this work.
- 5- In 5% of the families studied, the underlying cause of the disease could be due to mutations in two different IRD genes. Misinterpretation of such findings could lead to erroneous genetic-reproductive advice.
- 6- Our NGS-based approach has shown to be effective for the identification of CNV, since eight such mutations have been identified in six different genes (8%), indicating that the implication of these variants in the appearance of DHRs could have been underestimated due to the inherent difficulty of its detection.
- 7- The sequencing studies in the 124 families analyzed have allowed us to deepen in the knowledge of the molecular basis of IRD by establishing new phenotypic associations with previously identified genes.
- 8- Functional studies using minigenes showed an alteration in mRNA processing in six of the variants analyzed.
- 9- This study has allowed in 75 families to confirm the preliminary clinical diagnosis, make a correct genetic-reproductive advice and enable these patients to access future clinical trials based on gene therapy.

10- Those families not diagnosed in this study through the gene panel, will be susceptible to be analyzed by WES and / or WGS, thus allowing to identify mutations in non-coding areas of the genome or in genes not previously associated with IRD.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acton, Jennifer H., Jonathan P. Greenberg, Vivienne C. Greenstein, Marcela Marsiglia, Mirela Tabacaru, R. Theodore Smith, and Stephen H. Tsang. 2013. "Evaluation of Multimodal Imaging in Carriers of X-Linked Retinitis Pigmentosa." *Experimental Eye Research* 113: 41–48.
- Albert, Silvia, Alejandro Garanto, Riccardo Sangermano, Mubeen Khan, Nathalie M Bax, Carel B Hoyng, Jana Zernant, et al. 2018. "Identification and Rescue of Splice Defects Caused by Two Neighboring Deep-Intronic ABCA4 Mutations Underlying Stargardt Disease." *American Journal of Human Genetics* 102 (4): 517–27.
- Aller, E., T. Jaijo, M. Beneyto, C. Nájera, S. Oltra, C. Ayuso, M. Baiget, et al. 2006. "Identification of 14 Novel Mutations in the Long Isoform of USH2A in Spanish Patients with Usher Syndrome Type II." *Journal of Medical Genetics* 43 (11): 1–5.
- Allikmets, Rando, Noah F Shroyer, Nanda Singh, Johanna M Seddon, Richard Alan Lewis, Paul S Bernstein, Andy Peiffer, et al. 1997. "Mutation of the Stargardt Disease Gene (ABCR) in Age-Related Macular Degeneration." *Science (New York, N.Y.)* 277 (5333): 1805–7.
- Allikmets, Rando, Nanda Singh, Hui Sun, Noah F. Shroyer, Amy Hutchinson, Abirami Chidambaram, Bernard Gerrard, et al. 1997. "A Photoreceptor Cell-Specific ATP-Binding Transporter Gene (ABCR) Is Mutated in Recessive Stargardt Macular Dystrophy." *Nature Genetics* 15 (3): 236–46.
- Allikmets, Rando, Wyeth W. Wasserman, Amy Hutchinson, Philip Smallwood, Jeremy Nathans, Peter K. Rogan, Thomas D. Schneider, and Michael Dean. 1998. "Organization of the ABCR Gene: Analysis of Promoter and Splice Junction Sequences." *Gene* 215 (1): 111–22.
- Ameline, B, K-T Tshilenge, M Weber, M Biget, L Libeau, R Caplette, A Mendes-Madeira, et al. 2017. "Long-Term Expression of Melanopsin and Channelrhodopsin Causes No Gross Alterations in the Dystrophic Dog Retina." *Gene Therapy* 24 (11): 735–41.
- Ammann, F., D. Klein, and A. Franceschetti. 1965. "Genetic and Epidemiological Investigations on Pigmentary Degeneration of the Retina and Allied Disorders in Switzerland." *Journal of the Neurological Sciences* 2 (2): 183–96.
- Anasagasti, Ander, Olatz Barandika, Cristina Irigoyen, Bruno A. Benitez, Breanna Cooper, Carlos Cruchaga, Adolfo López de Munain, and Javier Ruiz-Ederra. 2013. "Genetic High Throughput Screening in Retinitis Pigmentosa Based on High Resolution Melting (HRM) Analysis." *Experimental Eye Research* 116 (November): 386–94.
- Anna, Abramowicz, and Gos Monika. 2018. "Splicing Mutations in Human Genetic Disorders: Examples, Detection, and Confirmation." *Journal of Applied Genetics* 59 (3): 253–68.
- Aparisi, María José, Gema García-García, Elena Aller, María Dolores Sequedo, Cristina Martínez-Fernández de la Cámara, Regina Rodrigo, Miguel Armengot, et al. 2013. "Study of USH1 Splicing Variants through Minigenes and Transcript Analysis from Nasal Epithelial Cells." Edited by Emanuele Buratti. *PLoS ONE* 8 (2): e57506.
- Arshad, Muhammad Waqar, Gaurav V. Harlalka, Siying Lin, Ilaria D'Atri, Sarmad Mehmood, Muhammad Shakil, Muhammad Jawad Hassan, et al. 2018. "Mutations in TYR and OCA2 Associated with Oculocutaneous Albinism in Pakistani Families." *Meta Gene* 17 (September): 48–55.
- Audo, Isabelle, José Alain Sahel, Saddek Mohand-Saïd, Marie Elise Lancelot, Aline Antonio, Veselina Moskova-Doumanova, Emeline F. Nandrot, et al. 2010. "EYS Is a Major Gene for Rod-Cone Dystrophies in France." *Human Mutation* 31 (5).
- Avila-Fernandez, Almudena, Marta Corton, Koji M Nishiguchi, Nelida Muñoz-Sanz, Belen Benavides-Mori, Fiona Blanco-Kelly, Rosa Riveiro-Alvarez, Blanca Garcia-Sandoval, Carlo Rivolta, and Carmen Ayuso. 2012. "Identification of an RP1 Prevalent Founder Mutation and Related Phenotype in Spanish Patients with Early-Onset Autosomal Recessive Retinitis." *Ophthalmology* 119 (12): 2616–21.
- Ayuso, Carmen, José M. Millán, and Rafael Dal-Ré. 2013. "Cómo Manejar Los Hallazgos Inesperados En Investigación Genética. ¿Cuándo Hay Que Comunicarlos?" In *Luces y Sombras En La Investigación Médica*, edited by Rafael Dal-Ré, Xavier Carné, and Diego Gracia, 1^a, 592. Madrid: Triacastela.

- Ayuso, Carmen, and Jose M Millan. 2010. "Retinitis Pigmentosa and Allied Conditions Today: A Paradigm of Translational Research." *Genome Medicine* 2 (5): 34.
- Ayyagari, Radha, F. Yesim Demirci, Jiafan Liu, Eve L. Bingham, Heather Stringham, Laura E. Kakuk, Michael Boehnke, Michael B. Gorin, Julia E. Richards, and Paul A. Sieving. 2002. "X-Linked Recessive Atrophic Macular Degeneration from RPGR Mutation." *Genomics* 80 (2): 166–71.
- Bader, Ingrid, Oliver Brandau, Helene Achatz, Eckart Apfelstedt-Sylla, Martin Hergersberg, Birgit Lorenz, Bernd Wissinger, et al. 2003. "X-Linked Retinitis Pigmentosa: RPGR Mutations in Most Families with Definite X Linkage and Clustering of Mutations in a Short Sequence Stretch of Exon ORF15." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44 (4): 1458.
- Bainbridge, J W B, A J Smith, S S Barker, S Robbie, R Henderson, K Balaggan, A Viswanathan, et al. 2008. "Effect of Gene Therapy on Visual Function in Leber's Congenital Amaurosis." *N Engl J Med* 358: 2231–39.
- Bakondi, Benjamin, Wenjian Lv, Bin Lu, Melissa K Jones, Yuchun Tsai, Kevin J Kim, Rachele Levy, et al. 2016. "In Vivo CRISPR/Cas9 Gene Editing Corrects Retinal Dystrophy in the S334ter-3 Rat Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa." *Molecular Therapy* 24 (3): 556–63.
- Bardak, H, M Gunay, Y Erçalık, Y Bardak, H Ozbas, O Bagci, A Ayata, M Sönmez, and C Alagöz. 2016. "Analysis of ELOVL4 and PRPH2 Genes in Turkish Stargardt Disease Patients." *Genetics and Molecular Research : GMR* 15 (4).
- Barragán, Isabel, Salud Borrego, Juan Ignacio Pieras, María González del Pozo, Javier Santoyo, Carmen Ayuso, Montserrat Baiget, et al. 2010. "Mutation Spectrum of EYS in Spanish Patients with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa." *Human Mutation* 31 (11): 1772–1800.
- Bassuk, Alexander G., Andrew Zheng, Yao Li, Stephen H. Tsang, and Vinit B. Mahajan. 2016. "Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells." *Scientific Reports* 6 (1): 19969.
- Bauwens, Miriam, Alejandro Garanto, Riccardo Sangermano, Sarah Naessens, Nicole Weisschuh, Julie De Zaeytijd, Mubeen Khan, et al. 2019. "ABCA4-Associated Disease as a Model for Missing Heritability in Autosomal Recessive Disorders: Novel Noncoding Splice, Cis-Regulatory, Structural, and Recurrent Hypomorphic Variants." *Genetics in Medicine* 21 (8): 1761–71.
- Bauwens, Miriam, Julie De Zaeytijd, Nicole Weisschuh, Susanne Kohl, Françoise Meire, Karin Dahan, Fanny Depasse, et al. 2015. "An Augmented ABCA4 Screen Targeting Noncoding Regions Reveals a Deep Intronic Founder Variant in Belgian Stargardt Patients." *Human Mutation* 36 (1): 39–42.
- Baux, D, C Vaché, C Blanchet, M Willems, C Baudoin, M Moclyn, V Faugère, et al. 2017. "Combined Genetic Approaches Yield a 48% Diagnostic Rate in a Large Cohort of French Hearing-Impaired Patients." *Scientific Reports* 7 (1): 16783.
- Beales, P L, N Elcioglu, A S Woolf, D Parker, and F A Flintner. 1999. "New Criteria for Improved Diagnosis of Bardet-Biedl Syndrome: Results of a Population Survey." *Journal of Medical Genetics* 36 (6): 437–46.
- Benaglio, Paola, Terri L. Mcgee, Leonardo P. Capelli, Shyana Harper, Eliot L. Berson, and Carlo Rivolta. 2011. "Next Generation Sequencing of Pooled Samples Reveals New SNRNP200 Mutations Associated with Retinitis Pigmentosa." *Human Mutation* 32 (6).
- Berger, Wolfgang, Barbara Kloeckener-Gruissem, and John Neidhardt. 2010. "The Molecular Basis of Human Retinal and Vitreoretinal Diseases." *Progress in Retinal and Eye Research* 29 (5): 335–75.
- Bergsma, Atze J, Erik van der Wal, Mike Broeders, Ans T van der Ploeg, and W W M Pim Pijnappel. 2018. "Alternative Splicing in Genetic Diseases: Improved Diagnosis and Novel Treatment Options." *International Review of Cell and Molecular Biology* 335: 85–141.
- Bernal, S, C Ayuso, G Antiñolo, A Gimenez, S Borrego, M J Trujillo, I Marcos, M Calaf, E Del Rio, and M Baiget. 2003. "Mutations in USH2A in Spanish Patients with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa: High Prevalence and Phenotypic Variation." *Journal of Medical Genetics* 40 (1): e8.

- Bernardis, Isabella, Laura Chiesi, Elena Tenedini, Lucia Artuso, Antonio Percesepe, Valentina Artusi, Maria Luisa Simone, et al. 2016. "Unravelling the Complexity of Inherited Retinal Dystrophies Molecular Testing: Added Value of Targeted Next-Generation Sequencing." *BioMed Research International* 2016.
- Berson, Eliot L, Jonna L Grimsby, Scott M Adams, T L McGee, Elizabeth Sweklo, Eric A Pierce, Michael A Sandberg, and Thaddeus P Dryja. 2001. "Clinical Features and Mutations in Patients with Dominant Retinitis Pigmentosa-1 (RP1)." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42 (10): 2217–24.
- Birtel, Johannes, Martin Gliem, Elisabeth Mangold, Philipp L. Müller, Frank G. Holz, Christine Neuhaus, Steffen Lenzner, et al. 2018. "Next-Generation Sequencing Identifies Unexpected Genotype-Phenotype Correlations in Patients with Retinitis Pigmentosa." Edited by Alfred S. Lewin. *PLOS ONE* 13 (12): e0207958.
- Blanton, S H, J R Heckenlively, A W Cottingham, J Friedman, L A Sadler, M Wagner, L H Friedman, and S P Daiger. 1991. "Linkage Mapping of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa (RP1) to the Pericentric Region of Human Chromosome 8." *Genomics* 11 (4): 857–69.
- Bönigk, W, W Altenhofen, F Müller, A Dose, M Illing, R S Molday, and U B Kaupp. 1993. "Rod and Cone Photoreceptor Cells Express Distinct Genes for CGMP-Gated Channels." *Neuron* 10 (5): 865–77.
- Boon, Camiel J.F., Anneke I. den Hollander, Carel B. Hoyng, Frans P.M. Cremers, B. Jeroen Klevering, and Jan E.E. Keunen. 2008. "The Spectrum of Retinal Dystrophies Caused by Mutations in the Peripherin/RDS Gene." *Progress in Retinal and Eye Research* 27 (2): 213–35.
- Boon, Camiel J.F., B. Jeroen Klevering, Bart P. Leroy, Carel B. Hoyng, Jan E.E. Keunen, and Anneke I. den Hollander. 2009. "The Spectrum of Ocular Phenotypes Caused by Mutations in the BEST1 Gene." *Progress in Retinal and Eye Research* 28 (3): 187–205.
- Boon, Camiel J F, Mary J van Schooneveld, Anneke I den Hollander, Janneke J C van Lith-Verhoeven, Marijke N Zonneveld-Vrieling, Thomas Theelen, Frans P M Cremers, Carel B Hoyng, and B Jeroen Klevering. 2007. "Mutations in the Peripherin/RDS Gene Are an Important Cause of Multifocal Pattern Dystrophy Simulating STGD1/Fundus Flavimaculatus." *The British Journal of Ophthalmology* 91 (11): 1504–11.
- Boroovah, S, C Collins, A Wright, and B Dhillon. 2009. "Late-Onset Retinal Macular Degeneration: Clinical Insights into an Inherited Retinal Degeneration." *Postgraduate Medical Journal* 85 (1007): 495–500.
- Boroovah, Shyamanga, Chloe M Stanton, Joseph Marsh, Keren J Carss, Naushin Waseem, Pooja Biswas, Georgios Agorogiannis, Lucy Raymond, Gavin Arno, and Andrew R Webster. 2018. "Whole Genome Sequencing Reveals Novel Mutations Causing Autosomal Dominant Inherited Macular Degeneration." *Ophthalmic Genetics* 39 (6): 763–70.
- Boughman, J.A., M. Vernon, and K.A. Shaver. 1983. "Usher Syndrome: Definition and Estimate of Prevalence from Two High-Risk Populations." *Journal of Chronic Diseases* 36 (8): 595–603.
- Bowne, Sara J, Lori S Sullivan, Cheryl E Avery, Elizabeth M Sasser, Austin Roorda, Jacque L Duncan, Dianna H Wheaton, et al. 2013. "Mutations in the Small Nuclear Riboprotein 200 KDa Gene (SNRNP200) Cause 1.6% of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa." *Molecular Vision* 19: 2407–17.
- Bowne, Sara J, Lori S Sullivan, Susan H Blanton, Constance L Cepko, Seth Blackshaw, David G Birch, Dianna Hughbanks-Wheaton, John R Heckenlively, and Stephen P Daiger. 2002. "Mutations in the Inosine Monophosphate Dehydrogenase 1 Gene (IMPDH1) Cause the RP10 Form of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa." *Human Molecular Genetics* 11 (5): 559–68.
- Branham, Kari, Mohammad Othman, Matthew Brumm, Athanasios J Karoukis, Pelin Atmaca-Sonmez, Beverly M Yashar, Sharon B Schwartz, et al. 2012. "Mutations in RPGR and RP2 Account for 15% of Males with Simplex Retinal Degenerative Disease." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53 (13): 8232–37.
- Braun, Terry A, Robert F Mullins, Alex H Wagner, Jeaneen L Andorf, Rebecca M Johnston, Benjamin B Bakall, Adam P Deluca, et al. 2013. "Non-Exomic and Synonymous Variants in ABCA4 Are an

- Important Cause of Stargardt Disease.” *Human Molecular Genetics* 22 (25): 5136–45.
- Bravo-Gil, Nereida, Cristina Méndez-Vidal, Laura Romero-Pérez, María González-del Pozo, Enrique Rodríguez-de la Rúa, Joaquín Dopazo, Salud Borrego, and Guillermo Antiñolo. 2016. “Improving the Management of Inherited Retinal Dystrophies by Targeted Sequencing of a Population-Specific Gene Panel.” *Scientific Reports* 6.
- Breuer, Debra K., Beverly M. Yashar, Elena Filippova, Suja Hiriyanna, Robert H. Lyons, Alan J. Mears, Bersabell Asaye, et al. 2002. “A Comprehensive Mutation Analysis of RP2 and RPGR in a North American Cohort of Families with X-Linked Retinitis Pigmentosa.” *The American Journal of Human Genetics* 70 (6): 1545–54.
- Briggs, C. E., D. Rucinski, P. J. Rosenfeld, T. Hirose, E. L. Berson, and T. P. Dryja. 2001. “Mutations in ABCR (ABCA4) in Patients with Stargardt Macular Degeneration or Cone-Rod Degeneration.” *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 42 (10): 2229–36.
- Bujakowska, Kinga M, Rosario Fernandez-Godino, Emily Place, Mark Consugar, Daniel Navarro-Gomez, Joseph White, Emma C Bedoukian, et al. 2017. “Copy-Number Variation Is an Important Contributor to the Genetic Causality of Inherited Retinal Degenerations.” *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 19 (6): 643–51.
- Bunker, Clareann H., Eliot L. Berson, William C. Bromley, Robert P. Hayes, and Thomas H. Roderick. 1984. “Prevalence of Retinitis Pigmentosa in Maine.” *American Journal of Ophthalmology* 97 (3): 357–65.
- Buskamp, V., J. Duebel, D. Balya, M. Fradot, T. J. Viney, S. Siegert, A. C. Groner, et al. 2010. “Genetic Reactivation of Cone Photoreceptors Restores Visual Responses in Retinitis Pigmentosa.” *Science* 329 (5990): 413–17.
- Carss, Keren, Gavin Arno, Marie Erwood, Jonathan Stephens, Alba Sanchis-Juan, Sarah Hull, Karyn Megy, et al. 2017. “Comprehensive Rare Variant Analysis via Whole-Genome Sequencing to Determine the Molecular Pathology of Inherited Retinal Disease.” *American Journal of Human Genetics* 100 (1): 75–90.
- Cartegni, Luca, Shern L Chew, and Adrian R Krainer. 2002. “Listening to Silence and Understanding Nonsense: Exonic Mutations That Affect Splicing.” *Nature Reviews. Genetics* 3 (4): 285–98.
- Castro-Miró, Marta De, Esther Pomares, Laura Lorés-Motta, Raul Tonda, Joaquín Dopazo, Gemma Marfany, and Roser González-Duarte. 2014. “Combined Genetic and High-Throughput Strategies for Molecular Diagnosis of Inherited Retinal Dystrophies.” *PLoS ONE* 9 (2).
- Cauwenbergh, Caroline Van, Kristof Van Schil, Robrecht Cannoodt, Miriam Bauwens, Thalia Van Laethem, Sarah De Jaegere, Wouter Steyaert, et al. 2017. “ArrEYE: A Customized Platform for High-Resolution Copy Number Analysis of Coding and Noncoding Regions of Known and Candidate Retinal Dystrophy Genes and Retinal Noncoding RNAs.” *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 19 (4): 457–66.
- Chakarova, Christina F., Matthew M Hims, Hanno Bolz, Leen Abu-Safieh, Reshma J Patel, Myrto G Papaioannou, Chris F Inglehearn, et al. 2002. “Mutations in HPRP3, a Third Member of Pre-mRNA Splicing Factor Genes, Implicated in Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa.” *Human Molecular Genetics* 11 (1): 87–92.
- Chakraborty, Dibyendu, Shannon M. Conley, Zack Nash, Xi-Qin Ding, and Muna I. Naash. 2012. “Overexpression of ROM-1 in the Cone-Dominant Retina.” In *Retinal Degenerative Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 633–39.
- Chiang, Pei-Wen, Elaine Spector, and Anne Chun-Hui Tsai. 2009. “Oculocutaneous Albinism Spectrum.” *American Journal of Medical Genetics. Part A* 149A (7): 1590–91.
- Churchill, Jennifer D., Sara J. Bowne, Lori S. Sullivan, Richard Alan Lewis, Dianna K. Wheaton, David G. Birch, Kari E. Branham, John R. Heckenlively, and Stephen P. Daiger. 2013. “Mutations in the X-Linked Retinitis Pigmentosa Genes RPGR and RP2 Found in 8.5% of Families with a Provisional Diagnosis of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa.” *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 54 (2): 1411–16.

- Cicinelli, Maria Vittoria, Maria Pia Manitto, Maurizio Battaglia Parodi, and Francesco Bandello. 2016. "Regressive Retinal Flecks in CRX-Mutated Early-Onset Retinal Dystrophy." *Optometry and Vision Science* 93 (10): 1315–18.
- Cideciyan, Artur V., Samuel G. Jacobson, Arlene V. Drack, Allen C. Ho, Jason Charng, Alexandra V. Garafalo, Alejandro J. Roman, et al. 2019. "Effect of an Intravitreal Antisense Oligonucleotide on Vision in Leber Congenital Amaurosis Due to a Photoreceptor Cilium Defect." *Nature Medicine* 25 (2): 225–28.
- Collin, Rob W.J., Karin W. Littink, B. Jeroen Klevering, L. Ingeborgh van den Born, Robert K. Koenekoop, Marijke N. Zonneveld, Ellen A.W. Blokland, et al. 2008. "Identification of a 2 Mb Human Ortholog of *Drosophila* Eyes Shut/Spacemaker That Is Mutated in Patients with Retinitis Pigmentosa." *The American Journal of Human Genetics* 83 (5): 594–603.
- Collin, Rob W.J., Christine Safieh, Karin W. Littink, Stavit A. Shalev, Hanna J. Garzosi, Leah Rizel, Anan H. Abbasi, et al. 2010. "Mutations in C2ORF71 Cause Autosomal-Recessive Retinitis Pigmentosa." *American Journal of Human Genetics* 86 (5): 783–88.
- Collin, Rob W.J., Anneke I den Hollander, Saskia D van der Velde-Visser, Jeannette Bennicelli, Jean Bennett, and Frans P.M. Cremers. 2012. "Antisense Oligonucleotide (AON)-Based Therapy for Leber Congenital Amaurosis Caused by a Frequent Mutation in CEP290." *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 1: e14.
- Comander, Jason, Carol Weigel-Difranco, Michael A. Sandberg, and Eliot L. Berson. 2015. "Visual Function in Carriers of X-Linked Retinitis Pigmentosa." *Ophthalmology* 122 (9): 1899–1906.
- Conley, Shannon M, Michael W Stuck, Jamie N Watson, Rahel Zulliger, Justin L Burnett, and Muna I Naash. 2018. "Prph2 Initiates Outer Segment Morphogenesis but Maturation Requires Prph2/Rom1 Oligomerization." *Human Molecular Genetics*, October, 713–43.
- Consugar, Mark B., Daniel Navarro-Gomez, Emily M. Place, Kinga M. Bujakowska, Maria E. Sousa, Zoë D. Fonseca-Kelly, Daniel G. Taub, et al. 2015. "Panel-Based Genetic Diagnostic Testing for Inherited Eye Diseases Is Highly Accurate and Reproducible, and More Sensitive for Variant Detection, than Exome Sequencing." *Genetics in Medicine* 17 (4): 253–61.
- Cooper, Thomas A. 2005. "Use of Minigene Systems to Dissect Alternative Splicing Elements." *Methods* 37 (4): 331–40.
- Cornelis, Stéphanie S., Nathalie M. Bax, Jana Zernant, Rando Allikmets, Lars G. Fritsche, Johan T. den Dunnen, Muhammad Ajmal, Carel B. Hoyng, and Frans P.M. Cremers. 2017. "In Silico Functional Meta-Analysis of 5,962 ABCA4 Variants in 3,928 Retinal Dystrophy Cases." *Human Mutation* 38 (4): 400–408.
- Corton, Marta, Koji M. Nishiguchi, Almudena Avila-Fernández, Konstantinos Nikopoulos, Rosa Riveiro-Alvarez, Sorina D. Tatu, Carmen Ayuso, and Carlo Rivolta. 2013. "Exome Sequencing of Index Patients with Retinal Dystrophies as a Tool for Molecular Diagnosis." *PLoS ONE* 8 (6): 1–6.
- Cremers, F P, D J van de Pol, M van Driel, A I den Hollander, F J van Haren, N V Knoers, N Tijmes, et al. 1998. "Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa and Cone-Rod Dystrophy Caused by Splice Site Mutations in the Stargardt's Disease Gene ABCR." *Human Molecular Genetics* 7 (3): 355–62.
- Cremers, Frans P.M., William J. Kimberling, Maigi Klm, Arjan P. De Brouwer, Erwin Van Wijk, Heleen Te Brinke, Cor W.R.J. Cremers, et al. 2007. "Development of a Genotyping Microarray for Usher Syndrome." *Journal of Medical Genetics* 44 (2): 153–60.
- Cruz, Lyndon da, Jessy D. Dorn, Mark S. Humayun, Gislin Dagnelie, James Handa, Pierre-Olivier Barale, José-Alain Sahel, et al. 2016. "Five-Year Safety and Performance Results from the Argus II Retinal Prosthesis System Clinical Trial." *Ophthalmology* 123 (10): 2248–54.
- Daiger, S P, L S Sullivan, and S J Bowne. 2013. "Genes and Mutations Causing Retinitis Pigmentosa." *Clinical Genetics* 84 (2): 132–41.
- Daiger, Stephen P., Lori S. Sullivan, Anisa I. Gire, David G. Birch, John R. Heckenlively, and Sara J. Bowne. 2008. "Mutations in Known Genes Account for 58% of Autosomal Dominant Retinitis

- Pigmentosa (AdRP).” In , 203–9.
- Davenport, SLH, and GS Omenn. 1977. “The Heterogeneity of Usher Syndrome.” In *5 Th International Conference En Birth Defects*. Montreal.
- Davidson, Alice E, Panagiotis I Sergouniotis, Rosemary Burgess-Mullan, Nichola Hart-Holden, Sancy Low, Paul J Foster, Forbes D C Manson, Graeme C M Black, and Andrew R Webster. 2010. “A Synonymous Codon Variant in Two Patients with Autosomal Recessive Bestrophinopathy Alters in Vitro Splicing of BEST1.” *Molecular Vision* 16 (December): 2916–22.
- Desmet, François-Olivier, Dalil Hamroun, Marine Lalande, Gwenaëlle Collod-Bérout, Mireille Claustres, and Christophe Bérout. 2009. “Human Splicing Finder: An Online Bioinformatics Tool to Predict Splicing Signals.” *Nucleic Acids Research* 37 (9): e67–e67.
- Dharmaraj, Sharola, Bart P Leroy, Melanie M Sohocki, Robert K Koenekoop, Isabelle Perrault, Khalid Anwar, Shagufta Khaliq, et al. 2004. “The Phenotype of Leber Congenital Amaurosis in Patients with AIPL1 Mutations.” *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 122 (7): 1029–37.
- Doumanov, Jordan A, Christina Zeitz, Paloma Dominguez Gimenez, Isabelle Audo, Abhay Krishna, Giovanna Alfano, Maria Luz Bellido Diaz, et al. 2013. “Disease-Causing Mutations in BEST1 Gene Are Associated with Altered Sorting of Bestrophin-1 Protein.” *International Journal of Molecular Sciences* 14 (7): 15121–40.
- Dowling, John E. 1987. *The Retina: An Approachable Part of the Brain*. Edited by Belknap Press of Harvard University Press.
- Dreyer, Bo, Vigdis Brox, Lisbeth Tranebjaerg, Thomas Rosenberg, André M. Sadeghi, Claes Möller, and Oivind Nilssen. 2008. “Spectrum of USH2A Mutations in Scandinavian Patients with Usher Syndrome Type II.” *Human Mutation* 29 (3): 451.
- Dreyer, Bo, Lisbeth Tranebjærg, Vigdis Brox, Thomas Rosenberg, Claes Möller, Magdalena Beneyto, Michael D Weston, William J Kimberling, and Øivind Nilssen. 2001. “A Common Ancestral Origin of the Frequent and Widespread 2299delG USH2A Mutation.” *The American Journal of Human Genetics* 69 (1): 228–34.
- Dreyer, Bo, Lisbeth Tranebjærg, Thomas Rosenberg, Michael D Weston, William J Kimberling, and Øivind Nilssen. 2000. “Identification of Novel USH2A Mutations: Implications for the Structure of USH2A Protein.” *European Journal of Human Genetics* 8 (7): 500–506.
- Dryja, Thaddeus P., Lauri B. Hahn, Kazuto Kajiwara, and Eliot L. Berson. 1997. “Dominant and Digenic Mutations in the Peripherin/RDS and ROM1 Genes in Retinitis Pigmentosa.” *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 38 (10): 1972–82.
- Duncan, Jacque L, Eric A Pierce, Amy M Laster, Stephen P Daiger, David G Birch, John D Ash, Alessandro Iannaccone, et al. 2018. “Inherited Retinal Degenerations: Current Landscape and Knowledge Gaps.” *Translational Vision Science & Technology* 7 (4): 6.
- Eisenberger, Tobias, Christine Neuhaus, Arif O. Khan, Christian Decker, Markus N. Preising, Christoph Friedburg, Anika Bieg, et al. 2013. “Increasing the Yield in Targeted Next-Generation Sequencing by Implicating CNV Analysis, Non-Coding Exons and the Overall Variant Load: The Example of Retinal Dystrophies.” *PLoS ONE* 8 (11).
- Espinós, C., J.M. Millán, M. Beneyto, and C. Nájera. 1998. “Epidemiology of Usher Syndrome in Valencia and Spain.” *Public Health Genomics* 1 (4): 223–28.
- Eudy, J D, M D Weston, S Yao, D M Hoover, H L Rehm, M Ma-Edmonds, D Yan, et al. 1998. “Mutation of a Gene Encoding a Protein with Extracellular Matrix Motifs in Usher Syndrome Type IIa.” *Science (New York, N.Y.)* 280 (5370): 1753–57.
- Ezquerro-Inchausti, Maitane, Ander Anasagasti, Olatz Barandika, Gonzaga Garay-Aramburu, Marta Galdós, Adolfo López de Munain, Cristina Irigoyen, and Javier Ruiz-Ederra. 2018. “A New Approach Based on Targeted Pooled DNA Sequencing Identifies Novel Mutations in Patients with Inherited Retinal Dystrophies.” *Scientific Reports* 8 (1): 15457.

- Fadaie, Zeinab, Mubeen Khan, Marta Del Pozo-Valero, Stéphanie S. Cornelis, Carmen Ayuso, Frans P. M. Cremers, Susanne Roosing, and The ABCA4 study group. 2019. "Identification of Splice Defects Due to Noncanonical Splice Site or Deep-intronic Variants in ABCA4." *Human Mutation*, September, humu.23890.
- Fahim, Abigail T., Sara J. Bowne, Lori S. Sullivan, Kaylie D. Webb, Jessica T. Williams, Dianna K. Wheaton, David G. Birch, and Stephen P. Daiger. 2011. "Allelic Heterogeneity and Genetic Modifier Loci Contribute to Clinical Variation in Males with X-Linked Retinitis Pigmentosa Due to RPGR Mutations." Edited by Andreas R. Janecke. *PLoS ONE* 6 (8): e23021.
- Fahim, Abigail T, Stephen P Daiger, and Richard G Weleber. 2000. *Nonsyndromic Retinitis Pigmentosa Overview*. Edited by MP Adam, HH Ardinger, RA Pagon, SE Wallace, A Amemiya, LJH Bean, and TD Bird. 2017 Jan 1. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019: GeneReviews®.
- Farrar, G J, P Kenna, S A Jordan, R Kumar-Singh, M M Humphries, E M Sharp, D M Sheils, and P Humphries. 1991. "A Three-Base-Pair Deletion in the Peripherin-RDS Gene in One Form of Retinitis Pigmentosa." *Nature* 354 (6353): 478–80.
- Fernández-Martínez, Lorena, Stef Letteboer, Christian Y. Mardin, Nicole Weisschuh, Eugen Gramer, Bernhard H.F. Weber, Bernd Rautenstrauss, et al. 2011. "Evidence for RPGRIP1 Gene as Risk Factor for Primary Open Angle Glaucoma." *European Journal of Human Genetics* 19 (4): 445–51.
- Fishman, Gerald A., Edwin M. Stone, David A. Eliason, Chris M. Taylor, Martin Lindeman, and Deborah J. Derlacki. 2003. "ABCA4 Gene Sequence Variations in Patients with Autosomal Recessive Cone-Rod Dystrophy." *Archives of Ophthalmology* 121 (6): 851–55.
- Fishman, Gerald A, E M Stone, S Grover, D J Derlacki, H L Haines, and R R Hockey. 1999. "Variation of Clinical Expression in Patients with Stargardt Dystrophy and Sequence Variations in the ABCR Gene." *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 117 (4): 504–10.
- Flaxel, Christina J., Marcelle Jay, Dawn L. Thiselton, Mani Nayudu, Alison J. Hardcastle, Alan Wright, and Alan C. Bird. 1999. "Difference between RP2 and RP3 Phenotypes in X Linked Retinitis Pigmentosa." *British Journal of Ophthalmology* 83 (10): 1144–48.
- Forsythe, Elizabeth, and Philip L Beales. 2013. "Bardet–Biedl Syndrome." *European Journal of Human Genetics* 21 (1): 8–13.
- Fowler, Anna, Shazia Mahamdallie, Elise Ruark, Sheila Seal, Emma Ramsay, Matthew Clarke, Imran Uddin, et al. 2016. "Accurate Clinical Detection of Exon Copy Number Variants in a Targeted NGS Panel Using DECoN." *Wellcome Open Research* 1 (0): 20.
- Fraile-Bethencourt, Eugenia, Alberto Valenzuela-Palomo, Beatriz Díez-Gómez, María José Caloca, Susana Gómez-Barrero, and Eladio A. Velasco. 2019. "Minigene Splicing Assays Identify 12 Spliceogenic Variants of BRCA2 Exons 14 and 15." *Frontiers in Genetics* 10 (May).
- Franceschetti, A, and P Dieterle. 1956. "Differentialdiagnostische Bedeutung Des ERG's Bei Tapeto-Retinalen Degenerationen: Elektoretinographie." *Bibliotheca Ophthalmologica: Supplementa Ad Ophthalmologica* 48 (61).
- Fromer, Menachem, and Shaun M. Purcell. 2014. "Using XHMM Software to Detect Copy Number Variation in Whole-Exome Sequencing Data." In *Current Protocols in Human Genetics*, 7.23.1-7.23.21. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Fujinami, Kaoru, Noemi Lois, Rajarshi Mukherjee, Vikki A McBain, Kazushige Tsunoda, Kazuo Tsubota, Edwin M Stone, et al. 2013. "A Longitudinal Study of Stargardt Disease: Quantitative Assessment of Fundus Autofluorescence, Progression, and Genotype Correlations." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54 (13): 8181–90.
- Fujinami, Kaoru, Jana Zernant, Ravinder K. Chana, Genevieve A. Wright, Kazushige Tsunoda, Yoko Ozawa, Kazuo Tsubota, et al. 2013. "ABCA4 Gene Screening by Next-Generation Sequencing in a British Cohort." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 54 (10): 6662–74.
- Fukai, K, S A Holmes, N J Lucchese, V M Siu, R G Weleber, R E Schnur, and R A Spritz. 1995. "Autosomal Recessive Ocular Albinism Associated with a Functionally Significant Tyrosinase Gene

- Polymorphism." *Nature Genetics* 9 (1): 92–95.
- Fuster-García, Carla, Gema García-García, Teresa Jaijo, Neus Fornés, Carmen Ayuso, Miguel Fernández-Burriel, Ana Sánchez-De la Morena, Elena Aller, and José M Millán. 2018. "High-Throughput Sequencing for the Molecular Diagnosis of Usher Syndrome Reveals 42 Novel Mutations and Consolidates CEP250 as Usher-like Disease Causative." *Scientific Reports* 8 (1): 17113.
- Gamundi, María José, Imma Hernan, Miquel Maseras, Montserrat Baiget, Carmen Ayuso, Salud Borrego, Guillermo Antiñolo, José María Millán, Diana Valverde, and Miguel Carballo. 2005. "Sequence Variations in the Retinal Fascin FSCN2 Gene in a Spanish Population with Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa or Macular Degeneration." *Molecular Vision* 11 (November): 922–28.
- Ganapathy, Aparna, Nishtha Pandey, C. R. Srikumari Srisailapathy, Rajeev Jalvi, Vikas Malhotra, Mohan Venkatappa, Arunima Chatterjee, et al. 2014. "Non-Syndromic Hearing Impairment in India: High Allelic Heterogeneity among Mutations in Tmprss3, Tmc1, Ush1c, Cdhr23 and Tmie." Edited by Jörg D. Hoheisel. *PLoS ONE* 9 (1): e84773.
- Gao, Y Q, M Danciger, R Longmuir, N I Piriev, D Y Zhao, J R Heckenlively, G A Fishman, et al. 1999. "Screening of the Gene Encoding the Alpha'-Subunit of Cone CGMP-PDE in Patients with Retinal Degenerations." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40 (8): 1818–22.
- Garanto, Alejandro, Daniel C. Chung, Lonneke Duijkers, Julio C. Corral-Serrano, Muriël Messchaert, Ru Xiao, Jean Bennett, Luk H. Vandenberghe, and Rob W.J. Collin. 2016. "In Vitro and in Vivo Rescue of Aberrant Splicing in CEP290 -Associated LCA by Antisense Oligonucleotide Delivery." *Human Molecular Genetics*, April, ddw118.
- Garber, Ken. 2015. "RIKEN Suspends First Clinical Trial Involving Induced Pluripotent Stem Cells." *Nature Biotechnology* 33 (9): 890–91.
- García-García, Gema, María J. Aparisi, Teresa Jaijo, Regina Rodrigo, Ana M. Leon, Almudena Avila-Fernandez, Fiona Blanco-Kelly, et al. 2011. "Mutational Screening of the USH2A Gene in Spanish USH Patients Reveals 23 Novel Pathogenic Mutations." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 6 (1): 1–13.
- García Aguado, Jaime, Francisco Javier Ruiz-Cabello Sánchez, Julia Colomer Revuelta, Olga Cortés Rico, M^a Jesús Esparza Olcina, and José Galbe Sánchez-Ventura. 2016. "Valoración de La Agudeza Visual." *Pediatría Atención Primaria XVIII* (71).
- Gerard, Xavier, Isabelle Perrault, Sylvain Hanein, Eduardo Silva, Karine Bigot, Sabine Defoort-Delhemmes, Marlène Rio, et al. 2012. "AON-Mediated Exon Skipping Restores Ciliation in Fibroblasts Harboring the Common Leber Congenital Amaurosis CEP290 Mutation." *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 1: e29.
- Gerber, S., J. M. Rozet, T. J.R. Van De Pol, C. B. Hoyng, A. Munnich, A. Blankenagel, J. Kaplan, and F. P.M. Cremers. 1998. "Complete Exon-Intron Structure of the Retina-Specific ATP Binding Transporter Gene (ABCR) Allows the Identification of Novel Mutations Underlying Stargardt Disease." *Genomics* 48 (1): 139–42.
- Gerstner, Andrea, Xiangang Zong, Franz Hofmann, and Martin Biel. 2000. "Molecular Cloning and Functional Characterization of a New Modulatory Cyclic Nucleotide-Gated Channel Subunit from Mouse Retina." *The Journal of Neuroscience* 20 (4): 1324–32.
- Ghazi, Nicola G., Emad B. Abboud, Sawsan R. Nowilaty, Hisham Alkuraya, Abdulrahman Alhommadi, Huimin Cai, Rui Hou, et al. 2016. "Treatment of Retinitis Pigmentosa Due to MERTK Mutations by Ocular Subretinal Injection of Adeno-Associated Virus Gene Vector: Results of a Phase I Trial." *Human Genetics* 135 (3): 327–43.
- Ghodsinejad Kalahroudi, Vadih, Behnam Kamalidehghan, Ahoura Arasteh Kani, Omid Aryani, Mahdi Tondar, Fatemeh Ahmadipour, Lip Yong Chung, and Massoud Houshmand. 2014. "Two Novel Tyrosinase (TYR) Gene Mutations with Pathogenic Impact on Oculocutaneous Albinism Type 1 (OCA1)." *PLoS One* 9 (9): e106656.

- Goldberg, A F, and R S Molday. 1996. "Subunit Composition of the Peripherin/Rds-Rom-1 Disk Rim Complex from Rod Photoreceptors: Hydrodynamic Evidence for a Tetrameric Quaternary Structure." *Biochemistry* 35 (19): 6144–49.
- González-del Pozo, María, Salud Borrego, Isabel Barragán, Juan I. Pieras, Javier Santoyo, Nerea Matamala, Belén Naranjo, Joaquín Dopazo, and Guillermo Antiñolo. 2011. "Mutation Screening of Multiple Genes in Spanish Patients with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa by Targeted Resequencing." *PLoS ONE* 6 (12).
- González-Del Pozo, María, Cristina Méndez-Vidal, Javier Santoyo-Lopez, Alicia Vela-Boza, Nereida Bravo-Gil, Antonio Rueda, Luz García-Alonso, et al. 2014. "Deciphering Intrafamilial Phenotypic Variability by Exome Sequencing in a Bardet-Biedl Family." *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2 (2): 124–33.
- Gonzalez-Fernandez, F, D Kurz, Y Bao, S Newman, B P Conway, J E Young, D P Han, and S C Khani. 1999. "11-Cis Retinol Dehydrogenase Mutations As a Major Cause of the Congenital Night-Blindness Disorder Known As Fundus Albipunctatus." *Molecular Vision* 5 (December): 41.
- Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica para las Distrofias Hereditarias. 2017. "Guía de Práctica Clínica Para Las Distrofias Hereditarias de Retina."
- Gu, Sumin, Alan Lennon, Yun Li, Birgit Lorenz, Maurizio Fossarello, Michael North, Andreas Gal, and Alan Wright. 1998. "Tubby-like Protein-1 Mutations in Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa." *The Lancet* 351 (9109): 1103–4.
- Haer-Wigman, Lonneke, Wendy AG van Zelst-Stams, Rolph Pfundt, L Ingeborgh van den Born, Caroline CW Klaver, Joke BGM Verheij, Carel B Hoyng, et al. 2017. "Diagnostic Exome Sequencing in 266 Dutch Patients with Visual Impairment." *European Journal of Human Genetics* 25 (5): 591–99.
- Haider, Neena B., Samuel G. Jacobson, Artur V. Cideciyan, Ruth Swiderski, Luan M. Streb, Charles Searby, Gretel Beck, et al. 2000. "Mutation of a Nuclear Receptor Gene, NR2E3, Causes Enhanced S Cone Syndrome, a Disorder of Retinal Cell Fate." *Nature Genetics* 24 (2): 127–31.
- Halaban, R, S Svedine, E Cheng, Y Smicun, R Aron, and D N Hebert. 2000. "Endoplasmic Reticulum Retention Is a Common Defect Associated with Tyrosinase-Negative Albinism." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (11): 5889–94.
- Hamel, Christian P. 2006. "Retinitis Pigmentosa." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 1 (1): 40.
- Hamel, Christian P. 2007. "Cone Rod Dystrophies." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2 (February): 7.
- Hanein, Sylvain, Isabelle Perrault, Sylvie Gerber, Gaëlle Tanguy, Fabienne Barbet, Dominique Ducroq, Patrick Calvas, et al. 2004. "Leber Congenital Amaurosis: Comprehensive Survey of the Genetic Heterogeneity, Refinement of the Clinical Definition, and Genotype-Phenotype Correlations as a Strategy for Molecular Diagnosis." *Human Mutation* 23 (4): 306–17.
- Hartong, Dyonne T, Eliot L Berson, and Thaddeus P Dryja. 2006. "Retinitis Pigmentosa." *The Lancet* 368 (9549): 1795–1809.
- Hassenstein, Andrea, and Carsten H. Meyer. 2009. "Clinical Use and Research Applications of Heidelberg Retinal Angiography and Spectral-Domain Optical Coherence Tomography - a Review." *Clinical & Experimental Ophthalmology* 37 (1): 130–43.
- Hauswirth, William W., Tomas S. Aleman, Shalesh Kaushal, Artur V. Cideciyan, Sharon B. Schwartz, Lili Wang, Thomas J. Conlon, et al. 2008. "Treatment of Leber Congenital Amaurosis Due to RPE65 Mutations by Ocular Subretinal Injection of Adeno-Associated Virus Gene Vector: Short-Term Results of a Phase I Trial." *Human Gene Therapy* 19 (10): 979–90.
- Hayward, Caroline, Xinhua Shu, Artur V Cideciyan, Alan Lennon, Perdita Barran, Sepideh Zarepars, Lindsay Sawyer, et al. 2003. "Mutation in a Short-Chain Collagen Gene, CTRP5, Results in Extracellular Deposit Formation in Late-Onset Retinal Degeneration: A Genetic Model for Age-Related Macular Degeneration." *Human Molecular Genetics* 12 (20): 2657–67.
- Henderson, R. H., D. S. Mackay, Z. Li, P. Moradi, P. Sergouniotis, I. Russell-Eggitt, D. A. Thompson, et al. 2011. "Phenotypic Variability in Patients with Retinal Dystrophies Due to Mutations in CRB1."

British Journal of Ophthalmology 95 (6): 811–17.

- Hoffman, Dennis R., Kirsten G. Locke, Dianna H. Wheaton, Gary E. Fish, Rand Spencer, and David G. Birch. 2004. "A Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial of Docosahexaenoic Acid Supplementation for X-Linked Retinitis Pigmentosa." *American Journal of Ophthalmology* 137 (4): 704–18.
- Hollander, Anneke I. den, Aaron Black, Jean Bennett, and F. P M Cremers. 2010. "Lighting a Candle in the Dark: Advances in Genetics and Gene Therapy of Recessive Retinal Dystrophies." *Journal of Clinical Investigation* 120 (9): 3042–53.
- Hollander, Anneke I den, Robert K Koenekoop, Suzanne Yzer, Irma Lopez, Maarten L Arends, Krysta E J Voeselek, Marijke N Zonneveld, et al. 2006. "Mutations in the CEP290 (NPHP6) Gene Are a Frequent Cause of Leber Congenital Amaurosis." *American Journal of Human Genetics* 79 (3): 556–61.
- Hollander, Anneke I den, Terri L McGee, Carmela Ziviello, Sandro Banfi, Thaddeus P Dryja, Federico Gonzalez-Fernandez, Debashis Ghosh, and Eliot L Berson. 2009. "A Homozygous Missense Mutation in the IRBP Gene (RBP3) Associated with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50 (4): 1864–72.
- Holtan, Josephine Prener, Kaja Kristine Selmer, Ketil Riddervold Heimdal, and Ragnheiður Bragadóttir. 2019. "Inherited Retinal Disease in Norway – a Characterization of Current Clinical and Genetic Knowledge." *Acta Ophthalmologica*, August, aos.14218.
- Huang, Li, Xueshan Xiao, Shiqiang Li, Xiaoyun Jia, Panfeng Wang, Wenmin Sun, Yan Xu, Wei Xin, Xiangming Guo, and Qingjiong Zhang. 2016. "Molecular Genetics of Cone-Rod Dystrophy in Chinese Patients: New Data from 61 Proband and Mutation Overview of 163 Proband." *Experimental Eye Research*.
- Huang, Xiu-Feng, Juan Wu, Ji-Neng Lv, Xiao Zhang, and Zi-Bing Jin. 2015. "Identification of False-Negative Mutations Missed by next-Generation Sequencing in Retinitis Pigmentosa Patients: A Complementary Approach to Clinical Genetic Diagnostic Testing." *Genetics in Medicine* 17 (4): 307–11.
- Hutton, Saunie M, and Richard A Spritz. 2008. "A Comprehensive Genetic Study of Autosomal Recessive Ocular Albinism in Caucasian Patients." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49 (3): 868–72.
- Inglehearn, C F, T J Keen, R Bashir, M Jay, F Fitzke, A C Bird, A Crombie, and S Bhattacharya. 1992. "A Completed Screen for Mutations of the Rhodopsin Gene in a Panel of Patients with Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa." *Human Molecular Genetics* 1 (1): 41–45.
- Jacobson, Samuel G., Artur V. Cideciyan, Tomas S. Aleman, Alexander Sumaroka, Alejandro J. Roman, Malgorzata Swider, Sharon B. Schwartz, Eyal Banin, and Edwin M. Stone. 2011. "Human Retinal Disease from AIPL1 Gene Mutations: Foveal Cone Loss with Minimal Macular Photoreceptors and Rod Function Remaining." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (1): 70.
- Jacobson, Samuel G., Katsuya Yagasaki, William J. Feuer, and Alejandro J. Román. 1989. "Interocular Asymmetry of Visual Function in Heterozygotes of X-Linked Retinitis Pigmentosa." *Experimental Eye Research* 48 (5): 679–91.
- Jacobson, Samuel G, and Artur V Cideciyan. 2010. "Treatment Possibilities for Retinitis Pigmentosa." *The New England Journal of Medicine* 363 (17): 1669–71.
- Jacobson, Samuel G, Artur V Cideciyan, Alexander Sumaroka, Alejandro J Roman, and Alan F Wright. 2014. "Late-Onset Retinal Degeneration Caused by C1QTNF5 Mutation: Sub-Retinal Pigment Epithelium Deposits and Visual Consequences." *JAMA Ophthalmology* 132 (10): 1252–55.
- Jaganathan, Kishore, Sofia Kyriazopoulou Panagiotopoulou, Jeremy F. McRae, Siavash Fazel Darbandi, David Knowles, Yang I. Li, Jack A. Kosmicki, et al. 2019. "Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning." *Cell* 176 (3): 535-548.e24.
- Janecke, Andreas R., Debra A. Thompson, Gerd Utermann, Christian Becker, Christian A. Hübner,

- Eduard Schmid, Christina L. McHenry, et al. 2004. "Mutations in RDH12 Encoding a Photoreceptor Cell Retinol Dehydrogenase Cause Childhood-Onset Severe Retinal Dystrophy." *Nature Genetics* 36 (8): 850–54.
- Janssen, Sabine, Gokul Ramaswami, Erica E. Davis, Toby Hurd, Rannar Airik, Jennifer M. Kasanuki, Lauren Van Der Kraak, et al. 2011. "Mutation Analysis in Bardet-Biedl Syndrome by DNA Pooling and Massively Parallel Resequencing in 105 Individuals." *Human Genetics* 129 (1): 79–90.
- Jayasundera, Thiran, Kari E H Branham, Mohammad Othman, William R Rhoades, Athanasios J Karoukis, Hemant Khanna, Anand Swaroop, and John R Heckenlively. 2010. "RP2 Phenotype and Pathogenetic Correlations in X-Linked Retinitis Pigmentosa." *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 128 (7): 915–23.
- Jespersgaard, Cathrine, Mingyan Fang, Mette Bertelsen, Xiao Dang, Hanne Jensen, Yulan Chen, Niels Bech, et al. 2019. "Molecular Genetic Analysis Using Targeted NGS Analysis of 677 Individuals with Retinal Dystrophy." *Scientific Reports* 9 (1): 1219.
- Kaiserman, Nadia, Alexey Obolensky, Eyal Banin, and Dror Sharon. 2007. "Novel USH2A Mutations in Israeli Patients with Retinitis Pigmentosa and Usher Syndrome Type 2." *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 125 (2): 219–24.
- Kajiwara, Kazuto, Eliot L. Berson, and Thaddeus P. Dryja. 1994. "Digenic Retinitis Pigmentosa Due to Mutations at the Unlinked Peripherin/RDS and ROM1 Loci." *Science* 264 (5165): 1604–8.
- Kamao, Hiroyuki, Michiko Mandai, Satoshi Okamoto, Noriko Sakai, Akiko Suga, Sunao Sugita, Junichi Kiryu, and Masayo Takahashi. 2014. "Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Sheets Aiming for Clinical Application." *Stem Cell Reports* 2 (2): 205–18.
- Kanski, Jack J, and Brad Bowling. 2011. *Clinical Ophthalmology: A Systematic Approach*. Edited by Elsevier. 7th ed.
- Katsanis, Nicholas. 2004. "The Oligogenic Properties of Bardet-Biedl Syndrome." *Human Molecular Genetics* 13 Spec No (90001): R65-71.
- Keen, T. Jeffrey, Matthew M. Hims, Arthur B. McKie, Anthony T. Moore, Rob M. Doran, David A. Mackey, David C. Mansfield, et al. 2002. "Mutations in a Protein Target of the Pim-1 Kinase Associated with the RP9 Form of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa." *European Journal of Human Genetics* 10 (4): 245–49.
- Khateb, Samer, Mor Hanany, Ayat Khalaileh, Avigail Beryozkin, Segev Meyer, Alaa Abu-Diab, Fathieh Abu Turky, et al. 2016. "Identification of Genomic Deletions Causing Inherited Retinal Degenerations by Coverage Analysis of Whole Exome Sequencing Data." *Journal of Medical Genetics* 53 (9): 600–607.
- Kim, Linda S., William Seiple, Gerald A. Fishman, and Janet P. Szyk. 2007. "Multifocal ERG Findings in Carriers of X-Linked Retinoschisis." *Documenta Ophthalmologica* 114 (1): 21–26.
- Kjellström, Ulrika. 2014. "Association between Genotype and Phenotype in Families with Mutations in the ABCA4 Gene." *Molecular Vision* 20: 89–104.
- Klein, D., and F. Ammann. 1969. "The Syndrome of Laurence-Moon-Bardet-Biedl and Allied Diseases in Switzerland. Clinical, Genetic and Epidemiological Studies." *Journal of the Neurological Sciences* 9 (3): 479–513.
- Koenekoop, Robert K. 2004. "An Overview of Leber Congenital Amaurosis: A Model to Understand Human Retinal Development." *Survey of Ophthalmology* 49 (4): 379–98.
- Kohl, Susanne, B Baumann, M Broghammer, H Jägle, P Sieving, U Kellner, R Spegal, et al. 2000. "Mutations in the CNGB3 Gene Encoding the Beta-Subunit of the Cone Photoreceptor CGMP-Gated Channel Are Responsible for Achromatopsia (ACHM3) Linked to Chromosome 8q21." *Human Molecular Genetics* 9 (14): 2107–16.
- Kohl, Susanne, Frauke Coppieters, Françoise Meire, Simone Schaich, Susanne Roosing, Christina Brennenstuhl, Sylvia Bolz, et al. 2012. "A Nonsense Mutation in PDE6H Causes Autosomal-

- Recessive Incomplete Achromatopsia." *American Journal of Human Genetics* 91 (3): 527–32.
- Kohl, Susanne, Tim Marx, Ian Giddings, Herbert Jägle, Samuel G. Jacobson, Eckhart Apfelstedt-Sylla, Eberhart Zrenner, Lindsay T. Sharpe, and Bernd Wissinger. 1998. "Total Colourblindness Is Caused by Mutations in the Gene Encoding the α -Subunit of the Cone Photoreceptor CGMP-Gated Cation Channel." *Nature Genetics* 19 (3): 257–59.
- Kohl, Susanne, Balazs Varsanyi, Gesine Abadin Antunes, Britta Baumann, Carel B. Hoyng, Herbert Jägle, Thomas Rosenberg, et al. 2005. "CNGB3 Mutations Account for 50% of All Cases with Autosomal Recessive Achromatopsia." *European Journal of Human Genetics* 13 (3): 302–8.
- Kolb, Helga. 2002. "Photoreceptors by Helga Kolb." In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, edited by Helga Kolb, Ralph Nelson, Eduardo Fernandez, and Bryan Jones.
- Koyanagi, Yoshito, Masato Akiyama, Koji M Nishiguchi, Yukihide Momozawa, Yoichiro Kamatani, Sadaaki Takata, Chihiro Inai, et al. 2019. "Genetic Characteristics of Retinitis Pigmentosa in 1204 Japanese Patients." *Journal of Medical Genetics* 56 (10): 662–70.
- Krumm, Niklas, Peter H Sudmant, Arthur Ko, Brian J O’Roak, Maika Malig, Bradley P Coe, NHLBI Exome Sequencing Project, Aaron R Quinlan, Deborah A Nickerson, and Evan E Eichler. 2012. "Copy Number Variation Detection and Genotyping from Exome Sequence Data." *Genome Research* 22 (8): 1525–32.
- Kumaran, Neruban, Anthony T Moore, Richard G Weleber, and Michel Michaelides. 2017. "Leber Congenital Amaurosis/Early-Onset Severe Retinal Dystrophy: Clinical Features, Molecular Genetics and Therapeutic Interventions." *British Journal of Ophthalmology* 101 (9): 1147–54.
- Kurata, Kentaro, Katsuhiko Hosono, Takaaki Hayashi, Kei Mizobuchi, Satoshi Katagiri, Daisuke Miyamichi, Sachiko Nishina, et al. 2019. "X-Linked Retinitis Pigmentosa in Japan: Clinical and Genetic Findings in Male Patients and Female Carriers." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (6).
- Langlo, Christopher S., Emily J. Patterson, Brian P. Higgins, Phyllis Summerfelt, Moataz M. Razeen, Laura R. Erker, Maria Parker, et al. 2016. "Residual Foveal Cone Structure in CNGB3-Associated Achromatopsia." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 57 (10): 3984–95.
- Langmann, Thomas, Silvio Alessandro Di Gioia, Isabella Rau, Heidi Stöhr, Nela S. Maksimovic, Joseph C. Corbo, Agnes B. Renner, et al. 2010. "Nonsense Mutations in FAM161A Cause RP28-Associated Excessive Retinitis Pigmentosa." *American Journal of Human Genetics* 87 (3): 376–81.
- Lee, Yeon, and Donald C. Rio. 2015. "Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing." *Annual Review of Biochemistry* 84 (1): 291–323.
- Leijendeckers, Joop M., Ronald J.E. Pennings, Ad F.M. Snik, Arjan J. Bosman, and Cor W.R.J. Cremers. 2009. "Audiometric Characteristics of USH2a Patients." *Audiology and Neurotology* 14 (4): 223–31.
- Leroy, Bart P, José A Aragon-Martin, Michael D Weston, David A.R Bessant, Catherine Willis, Andrew R Webster, Alan C Bird, William J Kimberling, Annette M Payne, and Shomi S Bhattacharya. 2001. "Spectrum of Mutations in USH2A in British Patients with Usher Syndrome Type II." *Experimental Eye Research* 72 (5): 503–9.
- Lewis, Richard Alan, Noah F Shroyer, Nanda Singh, Rando Allikmets, Amy Hutchinson, Yixin Li, James R Lupski, Mark Leppert, and Michael Dean. 1999. "Genotype/Phenotype Analysis of a Photoreceptor-Specific ATP-Binding Cassette Transporter Gene, ABCR, in Stargardt Disease." *The American Journal of Human Genetics* 64 (2): 422–34.
- Li, Ningdong, Han Mei, Ian M MacDonald, XiaoDong Jiao, and J Fielding Hejtmancik. 2010. "Mutations in ASCC3L1 on 2q11.2 Are Associated with Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa in a Chinese Family." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51 (2): 1036–43.
- Liquori, Alessandro, Christel Vaché, David Baux, Catherine Blanchet, Christian Hamel, Sue Malcolm, Michel Koenig, Mireille Claustres, and Anne-Françoise Roux. 2016. "Whole USH2A Gene Sequencing Identifies Several New Deep Intronic Mutations." *Human Mutation* 37 (2): 184–93.
- Lith-Verhoeven, J J C van, S D van der Velde-Visser, M M Sohocki, A F Deutman, H M A Brink, F P M

- Cremers, and C B Hoyng. 2002. "Clinical Characterization, Linkage Analysis, and PRPC8 Mutation Analysis of a Family with Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa Type 13 (RP13)." *Ophthalmic Genetics* 23 (1): 1–12.
- Lotery, Andrew J, S G Jacobson, G A Fishman, R G Weleber, A B Fulton, P Namperumalsamy, E Héon, et al. 2001. "Mutations in the CRB1 Gene Cause Leber Congenital Amaurosis." *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 119 (3): 415–20.
- Lotery, Andrew J, Francis L Munier, Gerald A Fishman, Richard G Weleber, Samuel G Jacobson, Louisa M Affatigato, Brian E Nichols, Daniel F Schorderet, Val C Sheffield, and Edwin M Stone. 2000. "Allelic Variation in the VMD2 Gene in Best Disease and Age-Related Macular Degeneration." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41 (6): 1291–96.
- Lyon, Mary F. 1961. "Gene Action in the X-Chromosome of the Mouse (*Mus Musculus* L.)." *Nature* 190 (4773): 372–73.
- Ma, Chu Jian, Winston Lee, Nicholas Stong, Jana Zernant, Stanley Chang, David Goldstein, Takayuki Nagasaki, and Rando Allikmets. 2019. "Late-Onset Pattern Macular Dystrophy Mimicking ABCA4 and PRPH2 Disease Is Caused by a Homozygous Frameshift Mutation in ROM1." *Molecular Case Studies* 5 (3): a003624.
- Macke, J P, C M Davenport, S G Jacobson, J C Hennessey, F Gonzalez-Fernandez, B P Conway, J Heckenlively, R Palmer, I H Maumenee, and P Sieving. 1993. "Identification of Novel Rhodopsin Mutations Responsible for Retinitis Pigmentosa: Implications for the Structure and Function of Rhodopsin." *American Journal of Human Genetics* 53 (1): 80–89.
- MacLaren, Robert E, Markus Groppe, Alun R Barnard, Charles L Cottrill, Tanya Tolmachova, Len Seymour, K Reed Clark, et al. 2014. "Retinal Gene Therapy in Patients with Choroideremia: Initial Findings from a Phase 1/2 Clinical Trial." *The Lancet* 383 (9923): 1129–37.
- Maguire, Albert M., Francesca Simonelli, Eric A. Pierce, Edward N. Pugh, Federico Mingozzi, Jeannette Bencicelli, Sandro Banfi, et al. 2008. "Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber's Congenital Amaurosis." *New England Journal of Medicine* 358 (21): 2240–48.
- Mandai, Michiko, Akira Watanabe, Yasuo Kurimoto, Yasuhiko Hiram, Chikako Morinaga, Takashi Daimon, Masashi Fujihara, et al. 2017. "Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration." *The New England Journal of Medicine* 376 (11): 1038–46.
- Mandal, Md Nawajes A., John R. Heckenlively, Tracy Burch, Lianchun Chen, Vidyllatha Vasireddy, Robert K. Koenekoop, Paul A. Sieving, and Radha Ayyagari. 2005. "Sequencing Arrays for Screening Multiple Genes Associated with Early-Onset Human Retinal Degenerations on a High-Throughput Platform." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46 (9): 3355.
- Maniatis, Tom, and Bosiljka Tasic. 2002. "Alternative Pre-mRNA Splicing and Proteome Expansion in Metazoans." *Nature* 418 (6894): 236–43.
- Marchant, D., K. Yu, K. Bigot, O. Roche, A. Germain, D. Bonneau, V. Drouin-Garraud, et al. 2007. "New VMD2 Gene Mutations Identified in Patients Affected by Best Vitelliform Macular Dystrophy." *Journal of Medical Genetics* 44 (3): 1–7.
- Marquardt, A, H Stöhr, L A Passmore, F Krämer, A Rivera, and B H Weber. 1998. "Mutations in a Novel Gene, VMD2, Encoding a Protein of Unknown Properties Cause Juvenile-Onset Vitelliform Macular Dystrophy (Best's Disease)." *Human Molecular Genetics* 7 (9): 1517–25.
- Martin-Merida, Inmaculada, Domingo Aguilera-Garcia, Patricia Fernandez-San Jose, Fiona Blanco-Kelly, Olga Zurita, Berta Almoguera, Blanca Garcia-Sandoval, et al. 2018. "Toward the Mutational Landscape of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa: A Comprehensive Analysis of 258 Spanish Families." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 59 (6): 2345–54.
- Martin-Merida, Inmaculada, Almudena Avila-Fernandez, Marta Del Pozo-Valero, Fiona Blanco-Kelly, Olga Zurita, Raquel Perez-Carro, Domingo Aguilera-Garcia, et al. 2019. "Genomic Landscape of Sporadic Retinitis Pigmentosa." *Ophthalmology* 126 (8): 1181–88.
- Martin-Merida, Inmaculada, Rocio Sanchez-Alcudia, Patricia Fernandez San Jose, Fiona Blanco-Kelly,

- Raquel Perez-Carro, Luciana Rodriguez Jacy Da Silva, Berta Almoguera, et al. 2017. "Analysis of the PRPF31 Gene in Spanish Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa Patients: A Novel Genomic Rearrangement." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 58 (2): 1045–53.
- Maubaret, Cécilia G., Veronika Vaclavik, Rajarshi Mukhopadhyay, Naushin H. Waseem, Amanda Churchill, Graham E. Holder, Anthony T. Moore, Shomi S. Bhattacharya, and Andrew R. Webster. 2011. "Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa with Intrafamilial Variability and Incomplete Penetrance in Two Families Carrying Mutations in PRPF8." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (13): 9304.
- Maugeri, A, M A van Driel, D J van de Pol, B J Klevering, F J van Haren, N Tijmes, A A Bergen, et al. 1999. "The 2588G-->C Mutation in the ABCR Gene Is a Mild Frequent Founder Mutation in the Western European Population and Allows the Classification of ABCR Mutations in Patients with Stargardt Disease." *American Journal of Human Genetics* 64 (4): 1024–35.
- Maugeri, A, B J Klevering, K Rohrschneider, A Blankenagel, H G Brunner, A F Deutman, C B Hoyng, and F P Cremers. 2000. "Mutations in the ABCA4 (ABCR) Gene Are the Major Cause of Autosomal Recessive Cone-Rod Dystrophy." *American Journal of Human Genetics* 67 (4): 960–66.
- Mayer, Anja K., Caroline Van Cauwenbergh, Christine Rother, Britta Baumann, Peggy Reuter, Elfride De Baere, Bernd Wissinger, and Susanne Kohl. 2017a. "CNGB3 Mutation Spectrum Including Copy Number Variations in 552 Achromatopsia Patients." *Human Mutation* 38 (11): 1579–91.
- Mayer, Anja K, Klaus Rohrschneider, Tim M Strom, Nicola Glöckle, Susanne Kohl, Bernd Wissinger, and Nicole Weisschuh. 2016. "Homozygosity Mapping and Whole-Genome Sequencing Reveals a Deep Intronic PROM1 Mutation Causing Cone-Rod Dystrophy by Pseudoexon Activation." *European Journal of Human Genetics : EJHG* 24 (3): 459–62.
- McCulloch, Daphne L., Michael F. Marmor, Mitchell G. Brigell, Ruth Hamilton, Graham E. Holder, Radouil Tzekov, and Michael Bach. 2015. "ISCEV Standard for Full-Field Clinical Electroretinography (2015 Update)." *Documenta Ophthalmologica* 130 (1): 1–12.
- McGee, T. L., B. J. Seyedahmadi, M. O. Sweeney, T. P. Dryja, and E. L. Berson. 2010. "Novel Mutations in the Long Isoform of the USH2A Gene in Patients with Usher Syndrome Type II or Non-Syndromic Retinitis Pigmentosa." *Journal of Medical Genetics* 47 (7): 499–506.
- McKie, A B, J C McHale, T J Keen, E E Tarttelin, R Goliath, J J van Lith-Verhoeven, J Greenberg, et al. 2001. "Mutations in the Pre-mRNA Splicing Factor Gene PRPC8 in Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa (RP13)." *Human Molecular Genetics* 10 (15): 1555–62.
- Meighan, Peter C., Changhong Peng, and Michael D. Varnum. 2015. "Inherited Macular Degeneration-Associated Mutations in CNGB3 Increase the Ligand Sensitivity and Spontaneous Open Probability of Cone Cyclic Nucleotide-Gated Channels." *Frontiers in Physiology* 6 (June): 177.
- Meindl, A, K Dry, K Herrmann, F Manson, A Ciccodicola, A Edgar, M R Carvalho, et al. 1996. "A Gene (RPGR) with Homology to the RCC1 Guanine Nucleotide Exchange Factor Is Mutated in X-Linked Retinitis Pigmentosa (RP3)." *Nature Genetics* 13 (1): 35–42.
- Messchaert, Muriël, Lonneke Haer-Wigman, Muhammad I. Khan, Frans P. M. Cremers, and Rob W. J. Collin. 2018. "EYS Mutation Update: In Silico Assessment of 271 Reported and 26 Novel Variants in Patients with Retinitis Pigmentosa." *Human Mutation* 39 (2): 177–86.
- Metzker, Michael L. 2010. "Sequencing Technologies — the next Generation." *Nature Reviews Genetics* 11 (1): 31–46.
- Meunier, Isabelle, Audrey Sénéchal, Claire Marie Dhaenens, Carl Arndt, Bernard Puech, Sabine Defoort-Dhellemmes, Gaël Manes, et al. 2011. "Systematic Screening of BEST1 and PRPH2 in Juvenile and Adult Vitelliform Macular Dystrophies: A Rationale for Molecular Analysis." *Ophthalmology* 118 (6): 1130–36.
- Michaelides, M., L. L. Chen, M. A. Brantley, J. L. Andorf, E. M. Isaak, S. A. Jenkins, G. E. Holder, A. C. Bird, E. M. Stone, and A. R. Webster. 2007. "ABCA4 Mutations and Discordant ABCA4 Alleles in Patients and Siblings with Bull's-Eye Maculopathy." *British Journal of Ophthalmology* 91 (12): 1650–55.

- Michaelides, Michel. 2003. "The Genetics of Inherited Macular Dystrophies." *Journal of Medical Genetics* 40 (9): 641–50.
- Michaelides, Michel. 2004. "The Cone Dysfunction Syndromes." *British Journal of Ophthalmology* 88 (2): 291–97.
- Michaelides, Michel, Alison J. Hardcastle, David M. Hunt, and Anthony T. Moore. 2006. "Progressive Cone and Cone-Rod Dystrophies: Phenotypes and Underlying Molecular Genetic Basis." *Survey of Ophthalmology* 51 (3): 232–58.
- Molday, Robert S., Ulrich Kellner, and Bernhard H.F. Weber. 2012. "X-Linked Juvenile Retinoschisis: Clinical Diagnosis, Genetic Analysis, and Molecular Mechanisms." *Progress in Retinal and Eye Research* 31 (3): 195–212.
- Morimura, H, Gerald A Fishman, Sandeep A Grover, Anne B Fulton, Eliot L Berson, and Thaddeus P Dryja. 1998. "Mutations in the RPE65 Gene in Patients with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa or Leber Congenital Amaurosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (6): 3088–93.
- Moritz, O L, and R S Molday. 1996. "Molecular Cloning, Membrane Topology, and Localization of Bovine Rom-1 in Rod and Cone Photoreceptor Cells." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 37 (2): 352–62.
- Mullins, Robert F, Kean T Oh, Edward Heffron, Gregory S Hageman, and Edwin M Stone. 2005. "Late Development of Vitelliform Lesions and Flecks in a Patient with Best Disease: Clinicopathologic Correlation." *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 123 (11): 1588–94.
- Murphy, Daniel, Benjamin Cieply, Russ Carstens, Visvanathan Ramamurthy, and Peter Stoilov. 2016. "The Musashi 1 Controls the Splicing of Photoreceptor-Specific Exons in the Vertebrate Retina." *PLoS Genetics* 12 (8): e1006256. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006256>.
- Nakanishi, Hiroshi, Masafumi Ohtsubo, Satoshi Iwasaki, Yoshihiro Hotta, Shin Ichi Usami, Kunihiro Mizuta, Hiroyuki Mineta, and Shinsei Minoshima. 2011. "Novel USH2A Mutations in Japanese Usher Syndrome Type 2 Patients: Marked Differences in the Mutation Spectrum between the Japanese and Other Populations." *Journal of Human Genetics* 56 (7): 484–90.
- Nanda, Anika, Anna P. Salvetti, Penny Clouston, Susan M. Downes, and Robert E. Maclaren. 2018. "Exploring the Variable Phenotypes of RPGR Carrier Females in Assessing Their Potential for Retinal Gene Therapy." *Genes* 9 (12): 1–9.
- Nassisi, Marco, Saddek Mohand-Saïd, Claire-marie Dhaenens, Fiona Boyard, Vanessa Démontant, Camille Andrieu, Aline Antonio, et al. 2018. "Expanding the Mutation Spectrum in ABCA4: Sixty Novel Disease Causing Variants and Their Associated Phenotype in a Large French Stargardt Cohort." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (8): 2196.
- Neveling, Kornelia, Rob W.J. Collin, Christian Gilissen, Ramon A.C. Van Huet, Linda Visser, Michael P. Kwint, Sabine J. Gijzen, et al. 2012. "Next-Generation Genetic Testing for Retinitis Pigmentosa." *Human Mutation* 33 (6): 963–72.
- Neveling, Kornelia, Anneke I. den Hollander, Frans P. M. Cremers, and Rob W. J. Collin. 2013. "Identification and Analysis of Inherited Retinal Disease Genes." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 935: 3–23.
- Nikopoulos, Konstantinos, Almudena Avila-Fernandez, Marta Corton, Maria Isabel Lopez-Molina, Raquel Perez-Carro, Lara Bontadelli, Silvio Alessandro Di Gioia, et al. 2015. "Identification of Two Novel Mutations in CDHR1 in Consanguineous Spanish Families with Autosomal Recessive Retinal Dystrophy." *Scientific Reports* 5 (March): 1–10.
- Nishiguchi, Koji. M., R. G. Tearle, Y. P. Liu, E. C. Oh, N. Miyake, P. Benaglio, S. Harper, et al. 2013. "Whole Genome Sequencing in Patients with Retinitis Pigmentosa Reveals Pathogenic DNA Structural Changes and NEK2 as a New Disease Gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (40): 16139–44.
- Nishiguchi, Koji M., Michael A. Sandberg, Nasim Gorji, Eliot L. Berson, and Thaddeus P. Dryja. 2005.

- “Cone CGMP-Gated Channel Mutations and Clinical Findings in Patients with Achromatopsia, Macular Degeneration, and Other Hereditary Cone Diseases.” *Human Mutation* 25 (3): 248–58.
- Nishiguchi, Koji M, and Carlo Rivolta. 2012. “Genes Associated with Retinitis Pigmentosa and Allied Diseases Are Frequently Mutated in the General Population.” *PloS One* 7 (7): e41902.
- Norman, Chelsea S, Luke O’Gorman, Jane Gibson, Reuben J Pengelly, Diana Baralle, J Arjuna Ratnayaka, Helen Griffiths, et al. 2017. “Identification of a Functionally Significant Tri-Allelic Genotype in the Tyrosinase Gene (TYR) Causing Hypomorphic Oculocutaneous Albinism (OCA1B).” *Scientific Reports* 7 (1): 4415.
- Nour, May, Xi-Qin Ding, Heidi Stricker, Steven J. Fliesler, and Muna I. Naash. 2004. “Modulating Expression of Peripherin/ Rds in Transgenic Mice: Critical Levels and the Effect of Overexpression.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45 (8): 2514.
- Oh, KeanT., RICHARD G. WELEBER, DAWN M. OH, ANDREA M. BILLINGSLEA, JUSTIN ROSENOW, and EDWIN M. STONE. 2004. “CLINICAL PHENOTYPE AS A PROGNOSTIC FACTOR IN STARGARDT DISEASE.” *Retina* 24 (2): 254–62.
- Osterberg, G. 1935. “Topography of the Layer of Rods and Cones in the Human Retina.” *Acta Ophthalmologica Supplement* 6 (1): 103.
- Otto, Edgar A., Bart Loeys, Hemant Khanna, Jan Hellemans, Ralf Sudbrak, Shuling Fan, Ulla Muerb, et al. 2005. “Nephrocystin-5, a Ciliary IQ Domain Protein, Is Mutated in Senior-Loken Syndrome and Interacts with RPGR and Calmodulin.” *Nature Genetics* 37 (3): 282–88.
- Paloma, Eva, Amalia Martínez-Mir, Lluïsa Vilageliu, Roser González-Duarte, and Susana Balcells. 2001. “Spectrum of ABCA4 (ABCR) Gene Mutations in Spanish Patients with Autosomal Recessive Macular Dystrophies.” *Human Mutation* 17 (6): 504–10.
- Parfitt, David A., Amelia Lane, Conor M. Ramsden, Amanda-Jayne F. Carr, Peter M. Munro, Katarina Jovanovic, Nele Schwarz, et al. 2016a. “Identification and Correction of Mechanisms Underlying Inherited Blindness in Human iPSC-Derived Optic Cups.” *Cell Stem Cell* 18 (6): 769–81.
- Parfitt, David A, Amelia Lane, Conor M Ramsden, Amanda-Jayne F Carr, Peter M Munro, Katarina Jovanovic, Nele Schwarz, et al. 2016b. “Identification and Correction of Mechanisms Underlying Inherited Blindness in Human iPSC-Derived Optic Cups.” *Cell Stem Cell* 18 (6): 769–81.
- Park, H Y, and B A Gilchrist. 1999. “Signaling Pathways Mediating Melanogenesis.” *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)* 45 (7): 919–30.
- Patil, Suresh B, Toby W Hurd, Amiya K Ghosh, Carlos A Murga-Zamalloa, and Hemant Khanna. 2011. “Functional Analysis of Retinitis Pigmentosa 2 (RP2) Protein Reveals Variable Pathogenic Potential of Disease-Associated Missense Variants.” *PloS One* 6 (6): e21379.
- Perez-Carro, Raquel, Marta Corton, Iker Sánchez-Navarro, Olga Zurita, Noelia Sanchez-Bolivar, Roció Sánchez-Alcudia, Stefan H. Lelieveld, et al. 2016. “Panel-Based NGS Reveals Novel Pathogenic Mutations in Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa.” *Scientific Reports* 6 (December 2015): 1–9.
- Perrault, Isabelle, Sylvain Hanein, Sylvie Gerber, Fabienne Barbet, Dominique Ducroq, Helene Dollfus, Christian Hamel, et al. 2004. “Retinal Dehydrogenase 12 (RDH12) Mutations in Leber Congenital Amaurosis.” *The American Journal of Human Genetics* 75 (4): 639–46.
- Pertea, M. 2001. “GeneSplicer: A New Computational Method for Splice Site Prediction.” *Nucleic Acids Research* 29 (5): 1185–90.
- Petrukhin, K, M J Koisti, B Bakall, W Li, G Xie, T Marknell, O Sandgren, et al. 1998. “Identification of the Gene Responsible for Best Macular Dystrophy.” *Nature Genetics* 19 (3): 241–47.
- Pieke-Dahl, S, A van Aarem, A Dobin, C W Cremers, and W J Kimberling. 1996. “Genetic Heterogeneity of Usher Syndrome Type II in a Dutch Population.” *Journal of Medical Genetics* 33 (9): 753–57.
- Pieras, Juan I, Isabel Barragán, Salud Borrego, Isabelle Audo, María González-Del Pozo, Sara Bernal, Montserrat Baiget, Christina Zeitz, Shomi S Bhattacharya, and Guillermo Antiñolo. 2011. “Copy-

- Number Variations in EYS: A Significant Event in the Appearance of ArRP." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (8): 5625–31.
- Pierce, Eric A., Tracey Quinn, Terrence Meehan, Terri L. McGee, Eliot L. Berson, and Thaddeus P. Dryja. 1999. "Mutations in a Gene Encoding a New Oxygen-Regulated Photoreceptor Protein Cause Dominant Retinitis Pigmentosa." *Nature Genetics* 22 (3): 248–54.
- Pierrache, Laurence H. M., Muriël Messchaert, Alberta A. H. J. Thiadens, Lonneke Haer-Wigman, Yvonne de Jong-Hesse, Wendy A. G. van Zelst-Stams, Rob W. J. Collin, Caroline C. W. Klaver, and L. Ingeborgh van den Born. 2019. "Extending the Spectrum of EYS -Associated Retinal Disease to Macular Dystrophy." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 60 (6): 2049.
- Poloschek, Charlotte M, Michael Bach, Wolf A Lagrèze, Esther Glaus, Johannes R Lemke, Wolfgang Berger, and John Neidhardt. 2010. "ABCA4 and ROM1: Implications for Modification of the PRPH2-Associated Macular Dystrophy Phenotype." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51 (8): 4253–65.
- Pons Moreno, Álvaro M, and Francisco M. Martínez Verdú. 2004. "La Visión Binocular." In *Fundamentos de La Visión Binocular*, edited by Publicacions de la Universitat D'Alacant and Publicacions de la Universitat de València, 1^a, 15.
- Potter, Michael J., Edward Wong, Shelagh M. Szabo, and Kerry E. McTaggart. 2004. "Clinical Findings in a Carrier of a New Mutation in the Choroideremia Gene." *Ophthalmology* 111 (10): 1905–9.
- Pounraja, Vijay Kumar, Gopal Jayakar, Matthew Jensen, Neil Kelkar, and Santhosh Girirajan. 2019. "A Machine-Learning Approach for Accurate Detection of Copy Number Variants from Exome Sequencing." *Genome Research* 29 (7): 1134–43.
- Pras, Eran, A Abu, Y Rotenstreich, I Avni, O Reish, Y Morad, and H Reznik-Wolf. 2009. "Cone-Rod Dystrophy and a Frameshift Mutation in the PROM1 Gene." *Molecular Vision* 15 (183–84): 1709–16.
- Pras, Eran, Elon Pras, Haike Reznik-Wolf, Dror Sharon, Svetlana Raivech, Yaniv Barkana, Almogit Abu-Horowitz, Rotenstreich Ygal, and Eyal Banin. 2012. "Fundus Albipunctatus: Novel Mutations and Phenotypic Description of Israeli Patients." *Molecular Vision* 18 (February): 1712–18.
- Preising, Markus N, Hedwig Forster, Miriam Gonser, and Birgit Lorenz. 2011. "Screening of TYR, OCA2, GPR143, and MC1R in Patients with Congenital Nystagmus, Macular Hypoplasia, and Fundus Hypopigmentation Indicating Albinism." *Molecular Vision* 17 (April): 939–48.
- Querques, Giuseppe, and Eric H. Souied, eds. 2016. *Macular Dystrophies*. Cham: Springer International Publishing.
- Quesne Stabej, Polona Le, Zubin Saihan, Nell Rangesh, Heather B. Steele-Stallard, John Ambrose, Alison Coffey, Jenny Emmerson, et al. 2012. "Comprehensive Sequence Analysis of Nine Usher Syndrome Genes in the UK National Collaborative Usher Study." *Journal of Medical Genetics* 49 (1): 27–36.
- Raff, Hershel, and Michael Levitzky. 2011. *Medical Physiology: A Systems Approach*. McGraw-Hill Companies.
- Ramón y Cajal, Santiago. 1893. "La Rétine Des Vertébrés." *La Cellule* 9 (17): 257.
- Reese, Martin G., Frank H. Eeckman, David Kulp, and David Haussler. 1997. "Improved Splice Site Detection in Genie." *Journal of Computational Biology* 4 (3): 311–23.
- Reuter, Peggy, Katja Koeppen, Thomas Ladewig, Susanne Kohl, Britta Baumann, Bernd Wissinger, Carmen Ayuso, et al. 2008. "Mutations in CNGA3 Impair Trafficking or Function of Cone Cyclic Nucleotide-Gated Channels, Resulting in Achromatopsia." *Human Mutation* 29 (10): 1228–36.
- Richards, Sue, Nazneen Aziz, Sherri Bale, David Bick, Soma Das, Julie Gastier-Foster, Wayne W. Grody, et al. 2015. "Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology." *Genetics in Medicine* 17 (5): 405–23.

- Riera, Marina, Rafael Navarro, Sheila Ruiz-Nogales, Pilar Méndez, Anniken Burés-Jelstrup, Borja Corcóstegui, and Esther Pomares. 2017. "Whole Exome Sequencing Using Ion Proton System Enables Reliable Genetic Diagnosis of Inherited Retinal Dystrophies." *Scientific Reports* 7 (August 2016): 1–13.
- Rio Frio, Thomas, Natacha Civic, Adriana Ransijn, Jacques S Beckmann, and Carlo Rivolta. 2008. "Two Trans-Acting EQTLs Modulate the Penetrance of PRPF31 Mutations." *Human Molecular Genetics* 17 (20): 3154–65.
- Rio Frio, Thomas, Terri L McGee, Nicholas M Wade, Christian Iseli, Jacques S Beckmann, Eliot L Berson, and Carlo Rivolta. 2009. "A Single-Base Substitution within an Intronic Repetitive Element Causes Dominant Retinitis Pigmentosa with Reduced Penetrance." *Human Mutation* 30 (9): 1340–47.
- Riveiro-Alvarez, R., J. Aguirre-Lamban, M. Angel Lopez-Martinez, M. Jose Trujillo-Tiebas, D. Cantalapiedra, E. Vallespin, A. Avila-Fernandez, C. Ramos, and C. Ayuso. 2009. "Frequency of ABCA4 Mutations in 278 Spanish Controls: An Insight into the Prevalence of Autosomal Recessive Stargardt Disease." *British Journal of Ophthalmology* 93 (10): 1359–64.
- Riveiro-Alvarez, Rosa, Miguel Angel Lopez-Martinez, Jana Zernant, Jana Aguirre-Lamban, Diego Cantalapiedra, Almudena Avila-Fernandez, Ascension Gimenez, et al. 2013. "Outcome of ABCA4 Disease-Associated Alleles in Autosomal Recessive Retinal Dystrophies: Retrospective Analysis in 420 Spanish Families." *Ophthalmology* 120 (11): 2332–37.
- Rivera, Andrea, Karen White, Heidi Stöhr, Klaus Steiner, Nadine Hemmrich, Timo Grimm, Bernhard Jurklics, et al. 2000. "A Comprehensive Survey of Sequence Variation in the ABCA4 (ABCR) Gene in Stargardt Disease and Age-Related Macular Degeneration." *The American Journal of Human Genetics* 67 (4): 800–813.
- Rivolta, Carlo, Radha Ayyagari, Paul A Sieving, Eliot L Berson, and Taddeus P Dryja. 2003. "Evaluation of the ELOVL4 Gene in Patients with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa and Leber Congenital Amaurosis." *Molecular Vision* 9 (February): 49–51.
- Rivolta, Carlo, Dror Sharon, Margaret M DeAngelis, and Thaddeus P Dryja. 2002. "Retinitis Pigmentosa and Allied Diseases: Numerous Diseases, Genes, and Inheritance Patterns." *Human Molecular Genetics* 11 (10): 1219–27.
- Rivolta, Carlo, Elizabeth A Sweklo, Eliot L Berson, and Thaddeus P Dryja. 2000. "Missense Mutation in the USH2A Gene: Association with Recessive Retinitis Pigmentosa without Hearing Loss." *The American Journal of Human Genetics* 66 (6): 1975–78.
- Roberts, M Flynn, G A Fishman, D K Roberts, J R Heckenlively, R G Weleber, R J Anderson, and S Grover. 2002. "Retrospective, Longitudinal, and Cross Sectional Study of Visual Acuity Impairment in Choroideraemia." *The British Journal of Ophthalmology* 86 (6): 658–62.
- Roepman, Ronald, and Uwe Wolfgram. 2007. "Protein Networks and Complexes in Photoreceptor Cilia." *Sub-Cellular Biochemistry* 43: 209–35.
- Rose, Anna M., Amna Z. Shah, Giulia Venturini, Abhay Krishna, Aravinda Chakravarti, Carlo Rivolta, and Shomi S. Bhattacharya. 2016. "Transcriptional Regulation of PRPF31 Gene Expression by MSR1 Repeat Elements Causes Incomplete Penetrance in Retinitis Pigmentosa." *Scientific Reports* 6 (1): 19450.
- Rotenstreich, Ygal, Michael Belkin, Siegal Sadetzki, Angela Chetrit, Gili Ferman-Attar, Ifat Sher, Ayelet Harari, Aviv Shaish, and Dror Harats. 2013. "Treatment With 9- Cis β -Carotene-Rich Powder in Patients With Retinitis Pigmentosa." *JAMA Ophthalmology* 131 (8): 985.
- Rozen, S, and H Skaletsky. 2000. "Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 132: 365–86.
- Rozet, Jean Michel, Sylvie Gerber, Eric Souied, Isabelle Perrault, Sophie Châtelin, Imad Ghazi, Corinne Leowski, Jean Louis Dufier, Arnold Munnich, and Josseline Kaplan. 1998. "Spectrum of ABCR Gene Mutations in Autosomal Recessive Macular Dystrophies." *European Journal of Human Genetics* 6 (3): 291–95.

- Ruiz, Agustín, Salud Borrego, Javier Sánchez, and Guillermo Antiñolo. 1997. "P313L: A Novel Amino Acid Substitution within the C-Terminal Domain of the Human RDS/Peripherin Gene." *Human Mutation* 11 (5): 415–16.
- Sahel, J.-A., K. Marazova, and I. Audo. 2015. "Clinical Characteristics and Current Therapies for Inherited Retinal Degenerations." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5 (2): a017111–a017111.
- Sangermano, Riccardo, Mubeen Khan, Stéphanie S Cornelis, Valerie Richelle, Silvia Albert, Alejandro Garanto, Duaa Elmelik, et al. 2018. "ABCA4 Midigenes Reveal the Full Splice Spectrum of All Reported Noncanonical Splice Site Variants in Stargardt Disease." *Genome Research* 28 (1): 100–110.
- Schatz, Patrik, Magnus Abrahamson, Louise Eksandh, Vesna Ponjavic, and Sten Andréasson. 2003. "Macular Appearance by Means of OCT and Electrophysiology in Members of Two Families with Different Mutations in RDS (the Peripherin/RDS Gene)." *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 81 (5): 500–507.
- Schatz, Patrik, Markus Preising, Birgit Lorenz, Birgit Sander, Michael Larsen, Christoph Eckstein, and Thomas Rosenberg. 2010. "Lack of Autofluorescence in Fundus Albipunctatus Associated with Mutations in RDH5." *Retina* 30 (10): 1704–13.
- Schil, Kristof Van, Sarah Naessens, Stijn Van de Sompele, Marjolein Carron, Alexander Aslanidis, Caroline Van Cauwenbergh, Anja Kathrin Mayer, et al. 2018. "Mapping the Genomic Landscape of Inherited Retinal Disease Genes Prioritizes Genes Prone to Coding and Noncoding Copy-Number Variations." *Genetics in Medicine* 20 (2): 202–13.
- Schnapf, J L, and D A Baylor. 1987. "How Photoreceptor Cells Respond to Light." *Scientific American* 256 (4): 40–47.
- Schön, Christian, Martin Biel, and Stylianos Michalakis. 2013. "Gene Replacement Therapy for Retinal CNG Channelopathies." *Molecular Genetics and Genomics* 288 (10): 459–67.
- Seyedahmadi, Babak Jian, Carlo Rivolta, Julia A. Keene, Eliot L. Berson, and Thaddeus P. Dryja. 2004. "Comprehensive Screening of the USH2A Gene in Usher Syndrome Type II and Non-Syndromic Recessive Retinitis Pigmentosa." *Experimental Eye Research* 79 (2): 167–73.
- Shahzad, Mohsin, Sairah Yousaf, Yar M Waryah, Hadia Gul, Tasleem Kausar, Nabeela Tariq, Umair Mahmood, et al. 2017. "Molecular Outcomes, Clinical Consequences, and Genetic Diagnosis of Oculocutaneous Albinism in Pakistani Population." *Scientific Reports* 7: 44185.
- Sharon, Dror, Tamar Ben-Yosef, Nitza Goldenberg-Cohen, Eran Pras, Libe Gradstein, Shiri Soudry, Eedy Mezer, et al. 2019. "A Nationwide Genetic Analysis of Inherited Retinal Diseases in Israel as Assessed by the Israeli Inherited Retinal Disease Consortium (IIRDC)." *Human Mutation*, September, humu.23903.
- Sharon, Dror, Michael A. Sandberg, Vivian W. Rabe, Melissa Stillberger, Thaddeus P. Dryja, and Eliot L. Berson. 2003. "RP2 and RPGR Mutations and Clinical Correlations in Patients with X-Linked Retinitis Pigmentosa." *The American Journal of Human Genetics* 73 (5): 1131–46.
- Shroyer, N F, R A Lewis, and J R Lupski. 2000. "Complex Inheritance of ABCR Mutations in Stargardt Disease: Linkage Disequilibrium, Complex Alleles, and Pseudodominance." *Human Genetics* 106 (2): 244–48.
- Siemiakowska, Anna M., L. Ingeborgh Van Den Born, P. Martin Van Hagen, Monique Stoffels, Kornelia Neveling, Arjen Henkes, Mieke Kipping-Geertsema, et al. 2013. "Mutations in the Mevalonate Kinase (MVK) Gene Cause Nonsyndromic Retinitis Pigmentosa." *Ophthalmology* 120 (12): 2697–2705.
- Simeonov, Dimitre R, Xinjing Wang, Chen Wang, Yuri Sergeev, Monika Dolinska, Matthew Bower, Roxanne Fischer, et al. 2013. "DNA Variations in Oculocutaneous Albinism: An Updated Mutation List and Current Outstanding Issues in Molecular Diagnostics." *Human Mutation* 34 (6): 827–35.
- Simonelli, Francesca, Francesco Testa, Jana Zernant, Anna Nesti, Settimio Rossi, Rando Allikmets, and

- Ernesto Rinaldi. 2005. "Genotype-Phenotype Correlation in Italian Families with Stargardt Disease." *Ophthalmic Research* 37 (3): 159–67.
- Simpson, David A., Graeme R. Clark, Sharon Alexander, Giuliana Silvestri, and Colin E. Willoughby. 2011. "Molecular Diagnosis for Heterogeneous Genetic Diseases with Targeted High-Throughput DNA Sequencing Applied to Retinitis Pigmentosa." *Journal of Medical Genetics* 48 (3): 145–51.
- Sippel, K C, J D DeStefano, E L Berson, and T P Dryja. 1998. "Evaluation of the Human Arrestin Gene in Patients with Retinitis Pigmentosa and Stationary Night Blindness." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 39 (3): 665–70.
- Siva, Kavitha, Giuseppina Covello, and Michela A Denti. 2014. "Exon-Skipping Antisense Oligonucleotides to Correct Missplicing in Neurogenetic Diseases." *Nucleic Acid Therapeutics* 24 (1): 69–86.
- Slijkerman, Radulfus WN, Christel Vaché, Margo Dona, Gema García-García, Mireille Claustres, Lisette Hetterschijt, Theo A Peters, et al. 2016. "Antisense Oligonucleotide-Based Splice Correction for USH2A-Associated Retinal Degeneration Caused by a Frequent Deep-Intronic Mutation." *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 5 (10): e381.
- Small, Kent W., Adam P. DeLuca, S. Scott Whitmore, Thomas Rosenberg, Rosemary Silva-Garcia, Nitin Udar, Bernard Puech, et al. 2016. "North Carolina Macular Dystrophy Is Caused by Dysregulation of the Retinal Transcription Factor PRDM13." *Ophthalmology* 123 (1): 9–18.
- Smith, Duncan J, Charles C Query, and Maria M Konarska. 2008. "Nought May Endure but Mutability': Spliceosome Dynamics and the Regulation of Splicing." *Molecular Cell* 30 (6): 657–66.
- Soens, Zachry T., Justin Branch, Shijing Wu, Zhisheng Yuan, Yumei Li, Hui Li, Keqing Wang, et al. 2017. "Leveraging Splice-Affecting Variant Predictors and a Minigene Validation System to Identify Mendelian Disease-Causing Variants among Exon-Captured Variants of Uncertain Significance." *Human Mutation* 38 (11): 1521–33.
- Spandau, Ulrich H., and Klaus Rohrschneider. 2002. "Prevalence and Geographical Distribution of Usher Syndrome in Germany." *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 240 (6): 495–98.
- Stanton, Chloe M, Shyamanga Boroovah, Camilla Drake, Joseph A Marsh, Susan Campbell, Alan Lennon, Dinesh C Soares, et al. 2017. "Novel Pathogenic Mutations in C1QTNF5 Support a Dominant Negative Disease Mechanism in Late-Onset Retinal Degeneration." *Scientific Reports* 7 (1): 1–15.
- Steele-Stallard, Heather B, Polona Le Quesne Stabej, Eva Lenassi, Linda M Luxon, Mireille Claustres, Anne-Francoise Roux, Andrew R Webster, and Maria Bitner-Glindzicz. 2013. "Screening for Duplications, Deletions and a Common Intronic Mutation Detects 35% of Second Mutations in Patients with USH2A Monoallelic Mutations on Sanger Sequencing." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8 (August): 122.
- Stingl, Katarina, Ruth Schippert, Karl U. Bartz-Schmidt, Dorothea Besch, Charles L. Cottrill, Thomas L. Edwards, Florian Gekeler, et al. 2017. "Interim Results of a Multicenter Trial with the New Electronic Subretinal Implant Alpha AMS in 15 Patients Blind from Inherited Retinal Degenerations." *Frontiers in Neuroscience* 11 (August).
- Stockman, Andrew, and Lindsay T. Sharpe. 2000. "The Spectral Sensitivities of the Middle- and Long-Wavelength-Sensitive Cones Derived from Measurements in Observers of Known Genotype." *Vision Research* 40 (13): 1711–37.
- Stone, Edwin M., Jeaneen L. Andorf, S. Scott Whitmore, Adam P. DeLuca, Joseph C. Giacalone, Luan M. Streb, Terry A. Braun, et al. 2017. "Clinically Focused Molecular Investigation of 1000 Consecutive Families with Inherited Retinal Disease." *Ophthalmology* 124 (9): 1314–31.
- Sullivan, Lori S, Sara J Bowne, David G Birch, Dianna Hughbanks-Wheaton, John R Heckenlively, Richard Alan Lewis, Charles A Garcia, et al. 2006. "Prevalence of Disease-Causing Mutations in Families with Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa: A Screen of Known Genes in 200 Families." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47 (7): 3052–64.

- Sun, Hui, Takashi Tsunenari, King-Wai Yau, and Jeremy Nathans. 2002. "The Vitelliform Macular Dystrophy Protein Defines a New Family of Chloride Channels." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (6): 4008–13.
- Sung, Ching-Hwa, and Jen-Zen Chuang. 2010. "The Cell Biology of Vision." *The Journal of Cell Biology* 190 (6): 953–63.
- Suzuki, Toshifumi, Yoshinori Tsurusaki, Mitsuko Nakashima, Noriko Miyake, Hiroto Saito, Satoru Takeda, and Naomichi Matsumoto. 2014. "Precise Detection of Chromosomal Translocation or Inversion Breakpoints by Whole-Genome Sequencing." *Journal of Human Genetics* 59 (12): 649–54.
- Tan, E., Q. Wang, A. B. Quiambao, X. Xu, N. M. Qtaishat, N. S. Peachey, J. Lem, et al. 2001. "The Relationship between Opsin Overexpression and Photoreceptor Degeneration." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 42 (3): 589–600.
- Taneri, Bahar, Esra Asilmaz, and Terry Gaasterland. 2012. "Biomedical Impact of Splicing Mutations Revealed through Exome Sequencing." *Molecular Medicine* 18 (2): 314–19.
- Tang, Zhimin, Yi Zhang, Yuyao Wang, Dandan Zhang, Bingqiao Shen, Min Luo, and Ping Gu. 2017. "Progress of Stem/Progenitor Cell-Based Therapy for Retinal Degeneration." *Journal of Translational Medicine* 15 (1): 99.
- Tanna, Preena, Rupert W Strauss, Kaoru Fujinami, and Michel Michaelides. 2017. "Stargardt Disease: Clinical Features, Molecular Genetics, Animal Models and Therapeutic Options." *British Journal of Ophthalmology* 101 (1): 25–30.
- Tassabehji, May, Zhi Ming Fang, Emma N. Hilton, Julie McGaughan, Zhongming Zhao, Charles E. de Bock, Emma Howard, et al. 2008. "Mutations in GDF6 Are Associated with Vertebral Segmentation Defects in Klippel-Feil Syndrome." *Human Mutation* 29 (8): 1017–27.
- Tatour, Yasmin, Jonathan Tamaiev, Shamaly Shamaly, Roberto Colombo, Ephrat Bril, Tom Rabinowitz, Alona Yaakobi, et al. 2019. "A Novel Intronic Mutation of PDE6B Is a Major Cause of Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa among Caucasus Jews." *Molecular Vision* 25: 155–64.
- Tattini, Lorenzo, Romina D'Aurizio, and Alberto Magi. 2015. "Detection of Genomic Structural Variants from Next-Generation Sequencing Data." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 3: 92.
- Testa, Francesco, V Marini, S Rossi, E Interlandi, A Nesti, M Rinaldi, M Varano, C Garré, and F Simonelli. 2005. "A Novel Mutation in the RDS Gene in an Italian Family with Pattern Dystrophy." *The British Journal of Ophthalmology* 89 (8): 1066–68.
- Testa, Francesco, Settimio Rossi, Andrea Sodi, Ilaria Passerini, Valentina Di orio, Michele Della Corte, Sandro Banfi, et al. 2012. "Correlation between Photoreceptor Layer Integrity and Visual Function in Patients with Stargardt Disease: Implications for Gene Therapy." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 53 (8): 4409–15.
- Testa, Francesco, Enrico Maria Surace, Settimio Rossi, Elena Marrocco, Annagiusti Gargiulo, Valentina Di Iorio, Carmela Ziviello, et al. 2011. "Evaluation of Italian Patients with Leber Congenital Amaurosis Due to AIPL1 Mutations Highlights the Potential Applicability of Gene Therapy." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 52 (8): 5618–24.
- The Retinoschisis Consortium. 1998. "Functional Implications of the Spectrum of Mutations Found in 234 Cases with X-Linked Juvenile Retinoschisis. The Retinoschisis Consortium." *Human Molecular Genetics* 7 (7): 1185–92.
- Thiadens, A. A H J, Susanne Roosing, R. W J Collin, Norka van Moll-Ramirez, J. J C van Lith-Verhoeven, Mary J. van Schooneveld, Anneke I. den Hollander, et al. 2010. "Comprehensive Analysis of the Achromatopsia Genes CNGA3 and CNGB3 in Progressive Cone Dystrophy." *Ophthalmology* 117 (4): 825-830.e1.
- Thiadens, Alberta A. H. J., Gyan G. Soerjoesing, Ralph J. Florijn, A. G. Tjiam, Anneke I. den Hollander, L. Ingeborgh van den Born, Frans C. Riemsdag, Arthur A. B. Bergen, and Caroline C. W. Klaver. 2011. "Clinical Course of Cone Dystrophy Caused by Mutations in the RPGR Gene." *Graefes's*

Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology 249 (10): 1527–35.

- Thiadens, Alberta A.H.J., T. My Lan Phan, Renate C. Zekveld-Vroon, Bart P. Leroy, L. Ingeborgh van den Born, Carel B. Hoyng, Caroline C.W. Klaver, et al. 2012. "Clinical Course, Genetic Etiology, and Visual Outcome in Cone and Cone–Rod Dystrophy." *Ophthalmology* 119 (4): 819–26.
- Thyagarajan, S., M. van Wyk, K. Lehmann, S. Lowel, G. Feng, and H. Wässle. 2010. "Visual Function in Mice with Photoreceptor Degeneration and Transgenic Expression of Channelrhodopsin 2 in Ganglion Cells." *Journal of Neuroscience* 30 (26): 8745–58.
- Tian, Rong, Guoxing Yang, Jing Wang, and Youxin Chen. 2014. "Screening for BEST1 Gene Mutations in Chinese Patients with Bestrophinopathy." *Molecular Vision* 20 (January 2014): 1594–1604.
- Tiwari, Amit, Angela Bahr, Luzy Bähr, Johannes Fleischhauer, Martin S. Zinkernagel, Niklas Winkler, Daniel Barthelmes, et al. 2016. "Next Generation Sequencing Based Identification of Disease-Associated Mutations in Swiss Patients with Retinal Dystrophies." *Scientific Reports* 6 (January): 28755.
- Tripathi, R K, L B Giebel, K M Strunk, and R A Spritz. 1991. "A Polymorphism of the Human Tyrosinase Gene Is Associated with Temperature-Sensitive Enzymatic Activity." *Gene Expression* 1 (2): 103–10.
- Tripathi, R K, K M Strunk, L B Giebel, R G Weleber, and R A Spritz. 1992. "Tyrosinase Gene Mutations in Type I (Tyrosinase-Deficient) Oculocutaneous Albinism Define Two Clusters of Missense Substitutions." *American Journal of Medical Genetics* 43 (5): 865–71.
- Stephen H. Tsang and Tarun Sharma. 2018a. "Best Vitelliform Macular Dystrophy." In , 79–90.
- Stephen H. Tsang and Tarun Sharma. 2018b. "Genetic Testing for Inherited Retinal Dystrophy: Basic Understanding." In , 261–68.
- Tuson, Miquel, Gemma Marfany, and Roser González-Duarte. 2004. "Mutation of CERKL, a Novel Human Ceramide Kinase Gene, Causes Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa (RP26)." *American Journal of Human Genetics* 74 (1): 128–38.
- Vaché, Christel, Thomas Besnard, Pauline le Berre, Gema García-García, David Baux, Lise Larrieu, Caroline Abadie, et al. 2012. "Usher Syndrome Type 2 Caused by Activation of an USH2A Pseudoexon: Implications for Diagnosis and Therapy." *Human Mutation* 33 (1): 104–8.
- Vallespin, Elena, Diego Cantalapiedra, Rosa Riveiro-Alvarez, Robert Wilke, Jana Aguirre-Lamban, Almudena Avila-Fernandez, Miguel Angel Lopez-Martinez, et al. 2007. "Mutation Screening of 299 Spanish Families with Retinal Dystrophies by Leber Congenital Amaurosis Genotyping Microarray." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48 (12): 5653–61.
- Venturini, Giulia, Anna M Rose, Amna Z Shah, Shomi S Bhattacharya, and Carlo Rivolta. 2012. "CNOT3 Is a Modifier of PRPF31 Mutations in Retinitis Pigmentosa with Incomplete Penetrance." *PLoS Genetics* 8 (11): e1003040.
- Verbakel, Sanne K., Ramon A.C. van Huet, Camiel J.F. Boon, Anneke I. den Hollander, Rob W.J. Collin, Caroline C.W. Klaver, Carel B. Hoyng, Ronald Roepman, and B. Jeroen Klevering. 2018. "Non-Syndromic Retinitis Pigmentosa." *Progress in Retinal and Eye Research* 66 (November 2017): 157–86.
- Vervoort, Raf, Alan Lennon, Alan C. Bird, Brian Tulloch, Richard Axton, Maria G. Miano, Alfons Meindl, Thomas Meitinger, Alfredo Ciccodicola, and Alan F. Wright. 2000. "Mutational Hot Spot within a New RPGR Exon in X-Linked Retinitis Pigmentosa." *Nature Genetics* 25 (4): 462–66.
- Wada, Y, T Abe, T Takeshita, H Sato, K Yanashima, and M Tamai. 2001. "Mutation of Human Retinal Fascin Gene (FSCN2) Causes Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42 (10): 2395–2400.
- Wada, Y, M Nakazawa, T Abe, and M Tamai. 2000. "A New Leu253Arg Mutation in the RP2 Gene in a Japanese Family with X-Linked Retinitis Pigmentosa." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41 (1): 290–93.

- Wada, Yuko, Toshiaki Abe, Toshitaka Itabashi, Hajime Sato, Miyuki Kawamura, and Makoto Tamai. 2003. "Autosomal Dominant Macular Degeneration Associated with 208delG Mutation in the FSCN2 Gene." *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 121 (11): 1613–20.
- Wada, Yuko, Michael A. Sandberg, Terri L. McGee, Melissa A. Stillberger, Eliot L. Berson, and Thaddeus P. Dryja. 2005. "Screen of the IMPDH1 Gene among Patients with Dominant Retinitis Pigmentosa and Clinical Features Associated with the Most Common Mutation, Asp226Asn." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 46 (5): 1735–41.
- Wang, D.Y., W. M. Chan, P O S Tam, L. Baum, D S C Lam, K K L Chong, B. J. Fan, and C. P. Pang. 2005. "Gene Mutations in Retinitis Pigmentosa and Their Clinical Implications." *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 351 (1–2): 5–16.
- Wang, Feng, Hui Wang, Han-fang Tuan, Duy H Nguyen, Vincent Sun, Vafa Keser, Sara J Bowne, et al. 2014. "Next Generation Sequencing-Based Molecular Diagnosis of Retinitis Pigmentosa: Identification of a Novel Genotype-Phenotype Correlation and Clinical Refinements." *Human Genetics* 133 (3): 331–45.
- Wang, Likun, Jinlu Zhang, Ningning Chen, Lei Wang, Fengsheng Zhang, Zhizhong Ma, Genlin Li, and Liping Yang. 2018. "Application of Whole Exome and Targeted Panel Sequencing in the Clinical Molecular Diagnosis of 319 Chinese Families with Inherited Retinal Dystrophy and Comparison Study." *Genes* 9 (7): 1–11.
- Wassle, H., and B. B. Boycott. 1991. "Functional Architecture of the Mammalian Retina." *Physiological Reviews* 71 (2): 447–80.
- Webb, Tom R., David A. Parfitt, Jessica C. Gardner, Ariadna Martinez, Dalila Bevilacqua, Alice E. Davidson, Ilaria Zito, et al. 2012. "Deep Intronic Mutation in OFD1, Identified by Targeted Genomic next-Generation Sequencing, Causes a Severe Form of X-Linked Retinitis Pigmentosa (RP23)." *Human Molecular Genetics* 21 (16): 3647–54.
- Webster, A R, E Héon, A J Lotery, K Vandenburg, T L Casavant, K T Oh, G Beck, et al. 2001. "An Analysis of Allelic Variation in the ABCA4 Gene." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42 (6): 1179–89.
- Weigell-Weber, M, S Fokstuen, B Török, G Niemeyer, A Schinzel, and M Hergersberg. 2000. "Codons 837 and 838 in the Retinal Guanylate Cyclase Gene on Chromosome 17p: Hot Spots for Mutations in Autosomal Dominant Cone-Rod Dystrophy?" *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 118 (2): 300.
- Weitz, Dietmar, Nicole Ficek, Elisabeth Kremmer, Paul J. Bauer, and U. Benjamin Kaupp. 2002. "Subunit Stoichiometry of the CNG Channel of Rod Photoreceptors." *Neuron* 36 (5): 881–89.
- Weleber, Richard G. 1989. "Fast and Slow Oscillations of the Electro-Oculogram in Best's Macular Dystrophy and Retinitis Pigmentosa." *Archives of Ophthalmology* 107 (4): 530.
- Wells, John, John Wroblewski, Jeffrey Keen, Christopher Inglehearn, Christopher Jubb, Anja Eckstein, Marcelle Jay, et al. 1993. "Mutations in the Human Retinal Degeneration Slow (RDS) Gene Can Cause Either Retinitis Pigmentosa or Macular Dystrophy." *Nature Genetics* 3 (3): 213–18.
- Wen, Xiao Hong, Lixin Shen, Richard S. Brush, Norman Michaud, Muayyad R. Al-Ubaidi, Vsevolod V. Gurevich, Heidi E. Hamm, et al. 2009. "Overexpression of Rhodopsin Alters the Structure and Photoresponse of Rod Photoreceptors." *Biophysical Journal* 96 (3): 939–50.
- Wheway, Gabrielle, Miriam Schmidts, Dorus A Mans, Katarzyna Szymanska, Thanh-Minh T Nguyen, Hilary Racher, Ian G Phelps, et al. 2015. "An siRNA-Based Functional Genomics Screen for the Identification of Regulators of Ciliogenesis and Ciliopathy Genes." *Nature Cell Biology* 17 (8): 1074–87.
- Wissinger, B, D Gamer, H Jägle, R Giorda, T Marx, S Mayer, S Tippmann, et al. 2001. "CNGA3 Mutations in Hereditary Cone Photoreceptor Disorders." *American Journal of Human Genetics* 69 (4): 722–37.
- Wiszniewski, Wojciech, Richard Alan Lewis, David W Stockton, Jianlan Peng, Graeme Mardon, Rui

- Chen, and James R. Lupski. 2011. "Potential Involvement of More than One Locus in Trait Manifestation for Individuals with Leber Congenital Amaurosis." *Human Genetics* 129 (3): 319–27.
- Wright, Alan F., Christina F. Chakarova, Mai M. Abd El-Aziz, and Shomi S. Bhattacharya. 2010. "Photoreceptor Degeneration: Genetic and Mechanistic Dissection of a Complex Trait." *Nature Reviews Genetics* 11 (4): 273–84.
- Wu, Hao, Junjie Luo, Huimin Yu, Amir Rattner, Alisa Mo, Yanshu Wang, Philip M. Smallwood, Bracha Erlanger, Sarah J. Wheelan, and Jeremy Nathans. 2014. "Cellular Resolution Maps of X Chromosome Inactivation: Implications for Neural Development, Function, and Disease." *Neuron* 81 (1): 103–19.
- Wu, Wen-Hsuan, Yi-Ting Tsai, Sally Justus, Ting-Ting Lee, Lijuan Zhang, Chyuan-Sheng Lin, Alexander G Bassuk, Vinit B Mahajan, and Stephen H Tsang. 2016. "CRISPR Repair Reveals Causative Mutation in a Preclinical Model of Retinitis Pigmentosa." *Molecular Therapy* 24 (8): 1388–94.
- Wycisk, Katharina Agnes, Christina Zeitz, Silke Feil, Mariana Wittmer, Ursula Forster, John Neidhardt, Bernd Wissinger, et al. 2006. "Mutation in the Auxiliary Calcium-Channel Subunit CACNA2D4 Causes Autosomal Recessive Cone Dystrophy." *American Journal of Human Genetics* 79 (5): 973–77.
- Xu, Yan, Liping Guan, Tao Shen, Jianguo Zhang, Xueshan Xiao, Hui Jiang, Shiqiang Li, et al. 2014. "Mutations of 60 Known Causative Genes in 157 Families with Retinitis Pigmentosa Based on Exome Sequencing." *Human Genetics* 133 (10): 1255–71. <https://doi.org/10.1007/s00439-014-1460-2>.
- Yang, Zhenglin, Neal S Peachey, Darius M Moshfeghi, Sukanya Thirumalaichary, Lou Chorich, Yin Y Shugart, Keke Fan, and Kang Zhang. 2002. "Mutations in the RPGR Gene Cause X-Linked Cone Dystrophy." *Human Molecular Genetics* 11 (5): 605–11.
- Yatsenko, Alexander N, Noah F Shroyer, Richard A Lewis, and James R Lupski. 2003. "An ABCA4 Genomic Deletion in Patients with Stargardt Disease." *Human Mutation* 21 (6): 636–44.
- Yau, King-Wai, and Roger C. Hardie. 2009. "Phototransduction Motifs and Variations." *Cell* 139 (2): 246–64.
- Yi, Junhui, Shiqiang Li, Xiaoyun Jia, Xueshan Xiao, Panfeng Wang, Xiangming Guo, and Qingjiong Zhang. 2012. "Evaluation of the ELOVL4, PRPH2 and ABCA4 Genes in Patients with Stargardt Macular Degeneration." *Molecular Medicine Reports* 6 (5): 1045–49.
- Young, R. W., and D Bok. 1969. "Participation of the Retinal Pigment Epithelium in the Rod Outer Segment Renewal Process." *The Journal of Cell Biology* 42 (2): 392–403.
- Zangerl, Barbara, Orly Goldstein, Alisdair R. Philp, Sarah J.P. Lindauer, Susan E. Pearce-Kelling, Robert F. Mullins, Alexander S. Graphodatsky, et al. 2006. "Identical Mutation in a Novel Retinal Gene Causes Progressive Rod-Cone Degeneration in Dogs and Retinitis Pigmentosa in Humans." *Genomics* 88 (5): 551–63.
- Zeitz, Christina, Anthony G. Robson, and Isabelle Audo. 2015. "Congenital Stationary Night Blindness: An Analysis and Update of Genotype–Phenotype Correlations and Pathogenic Mechanisms." *Progress in Retinal and Eye Research* 45 (March): 58–110.
- Zernant, Jana, Maigi Külm, Sharola Dharmaraj, Anneke I. Den Hollander, Isabelle Perrault, Markus N. Preising, Birgit Lorenz, et al. 2005. "Genotyping Microarray (Disease Chip) for Leber Congenital Amaurosis: Detection of Modifier Alleles." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 46 (9): 3052–59.
- Zernant, Jana, Yajing Angela Xie, Carmen Ayuso, Rosa Riveiro-Alvarez, Miguel-Angel Lopez-Martinez, Francesca Simonelli, Francesco Testa, et al. 2014. "Analysis of the ABCA4 Genomic Locus in Stargardt Disease." *Human Molecular Genetics* 23 (25): 6797–6806.
- Zhang, Qingjiong, Shiqiang Li, Xueshan Xiao, Xiaoyun Jia, and Xiangming Guo. 2007. "The 208delG Mutation in FSCN2 Does Not Associate with Retinal Degeneration in Chinese Individuals." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48 (2): 530–33.

- Zhao, Chen, Deepti L. Bellur, Shasha Lu, Feng Zhao, Michael A. Grassi, Sara J. Bowne, Lori S. Sullivan, et al. 2009. "Autosomal-Dominant Retinitis Pigmentosa Caused by a Mutation in SNRNP200, a Gene Required for Unwinding of U4/U6 SnRNAs." *The American Journal of Human Genetics* 85 (5): 617–27.
- Zhao, Li, Feng Wang, Hui Wang, Yumei Li, Sharon Alexander, Keqing Wang, Colin E. Willoughby, et al. 2015. "Next-Generation Sequencing-Based Molecular Diagnosis of 82 Retinitis Pigmentosa Probands from Northern Ireland." *Human Genetics* 134 (2): 217–30.
- Ziviello, C, F Simonelli, F Testa, M Anastasi, S B Marzoli, B Falsini, D Ghiglione, et al. 2005. "Molecular Genetics of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa (ADRP): A Comprehensive Study of 43 Italian Families." *Journal of Medical Genetics* 42 (7): e47.
- Zobor, Ditta, Gergely Zobor, Stephanie Hipp, Britta Baumann, Nicole Weisschuh, Saskia Biskup, Ieva Sliesoraityte, Eberhart Zrenner, and Susanne Kohl. 2018. "Phenotype Variations Caused by Mutations in the RP1L1 Gene in a Large Mainly German Cohort." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 59 (7): 3041.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Datos clínicos

Tabla VIII.1 Datos clínicos de los pacientes diagnosticados genéticamente.

Family ID	Patient ID /Sex/ A ¹ (y)	A ² (y)	Dx	Symptoms onset	Additional findings	BCVA (logMAR) RE/LE	VF RE/LE (RE/LE VFI %)	Fundus examination	FAF	OCT	Vision electrophysiology
fRPN-38	RPN-104/F/40	at birth	LCA	Blind from birth, pendular nystagmus.	Morgagnian catar, epilepsy.	27y: null	NA	27y: typical of RP, macular RPE atrophy.	NA	NA	NA
	RPN-532/M/57	at birth	LCA	Blind from birth, pendular nystagmus.	Keratoconus, catar.	NA	NA	NA	NA	NA	NA
fRPN-39	RPN-106/M/41	9	BMD	Childhood: photo, decr VA; stationary since 16- 18y.	Hyperopia	37y: 0,6/0,2	NA	27y: yellow-white deposits in the macula.	NA	NA	NA
fRPN-43	RPN-113/F/51	20	arRP	Teenage: NB; 20s: const VF, dyschro; early 40s: decr VA.	40s: BE SCP catar.	49y: LP/null	49y: <10°/null	NA	NA	NA	NA
	RPN-114/F/50	20	arCRD	20s: decr VA, dyschro; 40s: NB, const VF.	Myopia, astigmatism.	NA	NA	NA	NA	NA	NA
fRPN-45	RPN-116/M/83	10	XL RP	Childhood: NB, photo; Teenage: const VF.	Total blind since early 40s.	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	RPN-117/F/55	39	XL RP	40s: NB, const VF; 50s: decr VA.	Myopia magna, astigmatism.	NA	39y: null sup field/ 20° affecting sup temporal field.	NA	NA	NA	39y: delayed lat VEP.
fRPN-50	RPN-125/F/51	19	STGD	Late teenage: photo, decr VA; 30s: dyschro.	Myopia, 48y: incipient facoescclerosis.	23y: 1,0/1,0 48y: CF/CF 51y: SP/SP	48y: central scotoma (19/35).	22y: macular RPE atrophy, perifoveal pigments, drusen; 48y: mild pale OpD, all posterior pole atrophied.	NA	NA	NA
	RPN-126/F/62	27	STGD	30s: decr VA, photo; 50s: dyschro.	Myopia	29y: 0,8/1,0 58y: CF/CF	58y: central scotoma (47/50).	58y: macular RPE atrophy, NV, atrophy OpD.	NA	58y: severe central NE thinning.	NA

Family ID	Patient ID /Sex/ A ¹ (y)	A ² (y)	Dx	Symptoms onset	Additional findings	BCVA (logMAR) RE/LE	VF RE/LE (RE/LE VFI %)	Fundus examination	FAF	OCT	Vision electrophysiology
fRPN-58	RPN-147/F/61	15	arCRD	20s: photo, decr VA; late 30s: dyschro; 50s: strabismus.	Hyperopia, 40s: BE SCP catar operated.	22y: 0,8/1,0 38y: 1,0/1,0 41y: 1,3/1,0 60y: 1,0/CF	45y: <20°; 57y: <10° (23/24); 59y: <10° (13/14).	38y: papillary atrophy, light BSP, light NV, drusen in LE.	NA	61y: periph and central NE thinning.	40y: NR VEP, NR cone and severe decr rod ffERG.
	RPN-148/F/64	25	arCRD	Childhood: strabismus operated; Teenage: photo, decr VA.	30s: BE cortical and SCP catar.	28y: 1,3/1,3 59y: 1,3/1,3 61y: 1,3/PL	60y: <10° (11/8).	60y: BSP in the mild-periph.	NA	60y: periph and central NE thinning, ERP atrophy.	NA
fRPN-66	RPN-170/M/22	5	ACHM	Early childhood: photo, CB, decr VA.	-	9y: 0,8/0,8 11y: 0,8/1,0 13y: 0,8/1,0	NA	11y: N	NA	NA	5y: abN lat and amp VEP, NR cone ffERG; 12y: N EOG.
	RPN-171/M/19	3	ACHM	Early childhood: photo, CB, decr VA, horizontal nystagmus.	-	5y: 0,3/0,3 8y: 0,8/0,8 10y: 0,8/0,8	NA	8y: N	NA	NA	3y: light delayed lat VEP, NR cone ffERG; 5y: abN lat and amp VEP; 9y: N EOG.
fRPN-68	RP-455/M/53	28	arRP	20s: NB; early 30s: const VF; late 30s: decr VA.	40s: SCP catar.	38y: 0,2/0,2 47y: 0,2/0,2 54y: 0,5/0,8	42y: <10°; 45y: null	42y: typical of RP, macular RPE atrophy.	NA	47y: centrally pres NE, RE CME and LE LMH.	29y: decr amp VEP, NR cone and decr rod ffERG.
	RPN-173/F/45	34	arRP	Early 30s: NB; late 30s: const VF; 40s: decr VA.	Myopia magna, 40s: SCP sclerosis.	35y: 0,1/0,1 45y: 0,5/0,3	45y: 15°	44y: typical of RP.	NA	44y: centrally pres NE.	34y: NR rod and decr cone ffERG, abN EOG; 44y: delayed lat VEP, periph dysf with central pres mfERG.
fRPN-71	RPN-187/F/45	3	arRP	Early childhood: NB, decr VA; late childhood: const VF.	-	32y: 0,8/LSP 39y: LSP/LSP	NA	NA	NA	32y: severe central thinning.	NA
	RPN-188/F/48	5	arRP	Early childhood: NB, decr VA; late childhood: const VF; 30s: photo.	46y: RE SCP operated, light LE SCP catar.	47y: LP/LP	NA	37y: typical of RP, severe macular RPE atrophy.	NA	37y: severe central thinning.	NA
fRPN-84	RPN-213/M/48	37	arRP	20s: NB, const VF; 40s: photo.	Myopia; 40s: BE SCP catar operated.	37y: 0,2/0,2	NA	37y: BSP in the periph, NV.	NA	NA	NA

Family ID	Patient ID /Sex/ A ¹ (y)	A ² (y)	Dx	Symptoms onset	Additional findings	BCVA (logMAR) RE/LE	VF RE/LE (RE/LE VFI %)	Fundus examination	FAF	OCT	Vision electrophysiology
	RPN-214/M/45	34	arRP	Teenage: NB; early 20s: const VF; 30s: decr VA; 40s: photo, dyschro.	Myopia; 30s: BE SCP catar operated.	35y: 0,3/0,1 39y: 0,3/0,3 41y: 0,8/0,7	35y: 5°; 41y: null	35y: BSP in the mild-periph, NV. 41y: typical of RP, macular RPE atrophy.	37y: hyper AF macular ring.	41y: severe central NE thinning, posterior staphyloma.	35y: NR ffERG, periph dysf with moderate central pres.
fRPN-97	RPN-230/F/52	15	XL RP	Childhood: NB; Teenage: const VF, decr VA.	50s: LE SCP catar operated.	48y: 0,1/1,3 52y: 0,0/1,3	52y: null nasal field /null	48y: temporal BSP RE, macular atrophy LE; 52y: wsc.	NA	52y: N RE, atrophy with central and periph NE thinning LE.	52y: light delayed lat RE, NR LE VEP.
	RPN-231/M/15	7	XL RP	Childhood: NB; Teenage: const VF, decr VA.	Myopia	7y: 0,3/0,1 14y: 0,1/0,2 16y: 0,1/0,2	14y: 15° (37/36); 16y: 15°	7y: BSP in the periph; 14y: papillary edema BE.	NA	14y: macular NE pres; 16y: wsc.	7y: delayed lat VEP, NR ffERG.
	RPN-234/M/67	56	LORD	50s: decr VA, NB.	-	65y: HM/HM	65y: central scotoma.	65y: severe central atrophy, affecting macula and mild periph retina.	NA	65y: severe atrophy retinal layers and choroid.	NA
fRPN-100	RPN-509/F/64	64	LORD	60y: NB, decr VA.	-	NA	64y central scotoma (27/29).	64y: areas of central retinal and peripapilar atrophy.	64y: areas of hypoAF, serpinginosa-like.	64y: atrophy of outer retinal layer and choroid.	64y: abN lat and amp VEP, decr rod ffERG, periph dysfunction with central LE pres mfERG.
	RPN-640/F/39	39	LORD	Asymptomatic	-	NA	NA	39y: multiple drusen in the temporal area of the retina.	39y: normal	39y: drusen and choroidal atrophy in BE.	NA
fRPN-108	RPN-253/M/57	40	adRP	40s: NB, const VF; 50s: decr VA, photo, dyschro.	Myopia; 50s: incipient BE catar.	48y: 0,3/0,2 56y: CF/CF	48y: <10°, inf pres.	48y: BSP in the nasal inf periph, NV; 56y: macular RPE atrophy, sup retina pres.	NA	48y: centrally pres NE.	48y: decr cone and rod ffERG, periph dysf with moderate central pres mfERG.
	RPN-254/F/50	40	adRP	30s: NB; 40s: decr VA.	40s: BE catar.	42y: 0,2/0,2	42y: <10°, inf pres.	42y: BSP in the inf periph.	NA	42y: N.	NA
fRPN-110	RPN-256/M/67	18	adRP	Childhood: NB; 30s: const VF; 40s: decr VA.	BE catar, total blindness since 50s.	NA	NA	NA	NA	NA	58y: N VEP, NR ffERG.

Family ID	Patient ID /Sex/ A ¹ (y)	A ² (y)	Dx	Symptoms onset	Additional findings	BCVA (logMAR) RE/LE	VF RE/LE (RE/LE VFI %)	Fundus examination	FAF	OCT	Vision electrophysiology
	RPN-258/M/39	31	adRP	Teenage: NB; 20s: const VF, 30s: decr VA.	-	32y: 0,1/0,0 37y: 0,0/0,0	31y: 10° (70/73); 35y: <10° (64/77); 38y: <10° (43/60)	39y: light BSP.	NA	35y: central and periph NE thinning.	32y: NR rod and decr cone ffERG; 35y: N VEP, periph dysf mfERG.
fRPN-125	RPN-282/F/33	33	adCRD	20s: decr VA.	-	33y: 0,5/0,5	NA	NA	33y: hyper AF macular ring.	33y: central NE disruption, RE central ERP atrophy.	NA
fRPN-126	RPN-283/M/25	20	STGD	Childhood: decr VA.	20y: Dark choroid on FA.	20y: 0,4/0,4 22y: 0,5/0,5 25y: 0,5/0,7	20y: light central scotoma (93/93).	25y: yellow flecks around the macula.	25y: hyper AF macular ring.	NA	20y: decr amp VEP; 25y: decr rod ffERG, central dysf mfERG, N EOG.
fRPN-131	RPN-288/F/44	38	arRP	Childhood: NB; 30s: const VF.	Myopia	44y: 0,0/0,0	42y: nasal/sup ring scotoma (81/71).	NA	NA	42y: centrally pres NE.	39y: N VEP, decr rod ffERG, abN EOG.
fRPN-132	RPN-289/M/15	12	STGD	Childhood: decr VA, photo.	Hyperopia	12y: 0,5/0,7 15y: 0,5/0,8	NA	11y: RPE atrophy.	NA	11y: central NE thinning, LE central ERP atrophy.	11y: abN lat and amp VEP, decr rod ffERG, abN EOG.
	RPN-587/M/10	9	STGD	Childhood: decr VA, photo.	Hyperopia	9y: 0,4/0,4	NA	9y: light macular lesion.	NA	9y: centrally pres NE.	NA
fRPN-133	RPN-290/M/43	27	STGD	30s: decr VA, photo.	Ankilosing spondylitis.	28y: 0,0/0,0 35y: 0,4/0,1 43y: 1,0/1,0	36y: central scotoma (56/ 63)	27y: yellow-white deposits around the macula.	NA	38y: central and periph NE thinning; 43y: wsc.	27y: N VEP, N ffERG, abN EOG; 36y: delayed lat RE VEP, decr cone and rod ffERG.
fRPN-134	RPN-291/F/49	39	STGD	20s: decr VA.	Myopia, astigmatism.	42y: 0,4/0,2 46y: 1,0/0,7 50y: 0,8/1,0	NA	42y: macular RPE atrophy; 46y: wsc.	NA	46y: central and periph NE thinning; 50y: central EPR atrophy.	NA
fRPN-137	RPN-294/F/26	24	STGD	20s: deacr VA, photo.	25y: dark choroid on FA.	25y: 0,8/0,4	25y: central scotoma (93/93).	25y: yellow flecks around the macula.	25y: hyper AF macular ring.	NA	24y: abN lat and amp VEP, decr cone ffERG.

Family ID	Patient ID /Sex/ A ¹ (y)	A ² (y)	Dx	Symptoms onset	Additional findings	BCVA (logMAR) RE/LE	VF RE/LE (RE/LE VFI %)	Fundus examination	FAF	OCT	Vision electrophysiology
fRPN-139	RPN-296/M/12	3	XL RP	Early childhood: NB.	Astigmatism	12y: 0,0/0,0 15y: 0,1/0,1	NA	12y: BSP in the periph; 15y: NV.	NA	15y: periph NE disruption, central NE thinning.	NA
	RPN-361/M/82	4	XL RP	Early childhood: NB; late childhood: const VF.	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	RPN-374/F/26	26	XL RP	Asymptomatic	Myopia, astigmatism	26y: 0,0/0,0	26y: (100/100)	26y: isolated BSP in the periph.	NA	26y: N	NA
	RPN-375/M/53	4	XL RP	Early childhood: NB; late childhood: const VF.	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
fRPN-140	RPN-271/M/97	NA	adRP	NA	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	RPN-297/F/61	32	adRP	20s: NB; 30s: const VF; 40s: decr VA.	-	58y: 0,5/0,3	58y: <10° (30/21)	58y: typical of RP.	NA	NA	NA
fRPN-144	RPN-304/F/49	49	adMD	40s: photo.	-	49y: 0,0/0,0 50y: 0,0/0,0	50y: (100/99)	49y: yellow flecks around the macula.	NA	49y: central NE thinning, dispersed flecks.	51y: N VEP, N ffERG, light central dysf with periph pres mfERG.
	RPN-415/F/77	65	adMD	50s: photo, 60s: metamorphopsia, decr VA.	68y: LE catar operated.	70y: 0,1/0,1 75y: 0,9/0,2	76y: null	70y: RE macular drusen, LE ERM; 75y: severe areas of EPR atrophy, LE ERM.	NA	70y: RE N, LE ERM; 75y: RE CME, LE ERM.	72y: delayed RE lat VEP, NR rod ffERG, abN EOG.
	RPN-416/F/54	48	adMD	40s: photo, decr VA.	-	NA	NA	52y: yellow flecks around the macula.	NA	NA	NA
fRPN-147	RPN-309/F/18	16	adRP	Teenage: NB.	-	18y: 0,1/0,1	18y: 10-20° (71/76)	18y: Typical of RP.	NA	18y: central and periph NE thinning BE CME.	18y: decr cone and rod ffERG; periph dysf with central pres mfERG.
	RPN-310/F/44	32	adRP	30s: NB; 40s: photo, decr VA.	30s: BE SCP catar.	32y: 0,4/0,5 44y: 0,7/1,3	32y: <10	32y: Typical of RP; 44y: wsc.	NA	32y: central and periph NE thinning, BE CME; 44y: wsc.	44y: delayed lat VEP, periph dysf with moderate central pres mfERG.
fRPN-150	RPN-313/M/13	2	LCA	At birth: nystagmus; Early childhood: NB, photo, fixation exotropia.	-	14y: 1,0/0,8	14y: null	2y: BSP in the periph, NV, foveal RPE hyperplasia. 14y: Typical of RP, macular RPE	NA	NA	3y: NR ffERG; 5y: N VEP.

Family ID	Patient ID /Sex/ A ¹ (y)	A ² (y)	Dx	Symptoms onset	Additional findings	BCVA (logMAR) RE/LE	VF RE/LE (RE/LE VFI %)	Fundus examination	FAF	OCT	Vision electrophysiology
								atrophy.			
fRPN-153	RPN-317/F/14	13	STGD	Teenage: decr VA.	13y: dark choroid on FA.	14y: 1,0/1,0	NA	13y: macular RPE atrophy, flecks in the mild-periph.	NA	NA	13y: severe decr cone and rod ffERG, central dysf mfERG.
fRPN-158	RPN-323/M/16	6	XL RP	Early childhood: NB, const VF.	Bruton disease, myopia.	8y: 0,4/0,4 11y: 0,2/0,2 16y: 0,0/0,0	13y: 10-20° (73/62)	11y: BSP in the periph, RPE atrophy.	10y: macular hyper AF without clear periph hypo AF.	13y: central and periph NE thinning.	6y: delayed lat VEP, NR ffERG; 10y: severe periph and central dysf.
fRPN-159	RPN-324/F/38	24	arCRD	Childhood: dyschro, photo, decr VA, const VF.	Psoriasis; 24y: bull's eye maculopathy on FA; 30s: SCP catar.	26y: 0,8/0,9 32y: CF/CF 38y: HM/HM 40y: LP/LP	24y: null	32y: yellow-white deposits in the mild-periph; 40y: typical of RP.	32y: hypo AF spotted lesions, macular hyper AF.	32y: central and periph NE disruption, severe ERP atrophy. 40y: retinal atrophy.	24y: abN lat and amp VEP, NR cone and severe decr rod ffERG.
fRPN-162	RPN-327/F/22	16	STGD	Teenage: decr VA, photo.	Myopia. 16s: dark choroid on FA.	16y: 0,2/0,2 21y: 1,0/1,0	21y: central scotoma.	16y: bull's eye maculopathy, yellow deposits around the macula.	21y: foveal atrophy.	21y: central NE thinning.	16y: abN lat and amp VEP, central dysf mfERG, N EOG.
fRPN-166	RPN-331/F/62	56	AVMD	50s: NB, photo, decr VA.	DM (type 1); 50s: SCP catar operated.	57y: 0,1/0,3 61y: 0,2/0,4 63y: 0,1/0,1	NA	NA	NA	57y: fovel VL; 63y: central and periph NE thinning, VL.	NA
	RPN-332/F/37	29	AVMD	30s: NB, photo, decr VA.	-	29y: 0,2/0,1 33y: 0,1/0,2 38y: 0,2/0,2	NA	NA	NA	32y: intraretinal RPE migration, VL; 38y: central NE thinning.	29y: N VEP, N ffERG, N mfERG, N EOG.
fRPN-167	RPN-333/F/53	6	ACHM	Early childhood: photo, CB.	-	48y: 1,0/0,8 50y: 1,3/1,3 55y: 1,3/1,3	NA	48y: macular RPE atrophy.	NA	52y: central NE thinning.	NA
	RPN-334/F/49	5	ACHM	Early childhood: photo, dyschro.	50s: LE SCP catar, glaucoma.	44y: 0,8/0,8 48y: 0,8/0,8 51y: 1,0/0,8	NA	NA	NA	43y: central NE thinning.	43y: decr cone ffERG, N EOG.

Family ID	Patient ID /Sex/ A ¹ (y)	A ² (y)	Dx	Symptoms onset	Additional findings	BCVA (logMAR) RE/LE	VF RE/LE (RE/LE VFI %)	Fundus examination	FAF	OCT	Vision electrophysiology
fRPN-168	RPN-335/M/28	20	arRP	Early teenage: NB; 20s: const VF, decr VA.	-	20y: 0,0/0,4 23y: 0,0/0,4 30y: 0,1/0,2	25y: <10° (37/27); 27y: <10° (25/17).	20y: typical of RP; 27y: wsc.	27y: hyper AF macular ring.	20y: centrally pres NE, LE CME; 27y: centrally pres NE, RE CME.	NA
	RPN-584/M/24	17	arRP	Early teenage: NB, const VF.	-	17y: 0,1/0,1 19y: 0,0/0,0 26y: 0,1/0,0	21y: <10° (39/37); 24y: <10° (43/34).	23y: typical of RP.	23y: hyper AF macular ring.	23y: centrally pres NE, BE CME.	NA
	RPN-585/F/19	12	arRP	Early teenage: NB, const VF.	-	14y: 0,1/0,1 22y: 0,0/0,0	16y: 10° (60/64); 17y: 10° (65/47); 18y: <10° (48/42).	18y: typical of RP.	18y: hyper AF macular ring.	20y: centrally pres NE, BE CME.	NA
fRPN-173	RPN-342/M/47	30	STGD	Teenage: decr VA, photo.	30y: dark choroid on FA.	45y: 0,7/0,7	NA	30y: white foveal lesion; 45y: macular RPE atrophy, yellow flecks around the macula.	NA	NA	NA
fRPN-174	RPN-343/M/34	24	XL RP	20s: NB, early 30s: const VF, decr VA; late 30s: photo.	-	28y: 0,1/0,1 36y: 0,2/0,2 38y: 0,5/0,5	31y: <10°	28y: BSP in the periph; 38y: typical of RP.	38y: hyper AF spots, macular dystrophy.	36y: central and periph NE thinning, RE ERM.	28y: NR ffERG.
	RPN-488/F/67	NA	XL RP	NA	RE severe amblyopia.	67y: NLP/0,1	NA	67: LE sectorial atrophy, affecting the inf nasal mild-periph.	67: LE sectorial atrophy, affecting the inf nasal mild-periph.	67y: no valuable RE, sectorial NE disruption inf nasal mild-periph LE.	NA
fRPN-175	RPN-347/F/53	45	SRP	40s: NB, const VF.	42y: BE catar operated.	45y: 0,1/0,2 47y: 0,2/0,1	45y: <10°	47y: BSP in the mild-periph.	NA	47y: centrally pres NE, LE ERM.	45y: N VEP, decr cone and rod ffERG.
fRPN-178	RPN-363/M/33	24	BMD	NA	-	30y: 0,2/0,4 31y: 0,3/0,3	24y: paracentral scotoma (89/86); 31y: (84/86).	NA	NA	30y: BE CME.	30y: abN lat and amp VEP, NR rod and severe decr cone ffERG, abN EOG.
fRPN-179	RPN-379/F/11	10	STGD	Childhood: decr VA, photo.	-	10y: 0,5/0,8 11y: 0,8/0,8 12y: 0,8/0,8	10y: central scotoma (91/84).	NA	NA	10y: central NE thinning.	12y: N VEP, decr cone and rod ffERG.

Family ID	Patient ID /Sex/ A ¹ (y)	A ² (y)	Dx	Symptoms onset	Additional findings	BCVA (logMAR) RE/LE	VF RE/LE (RE/LE VFI %)	Fundus examination	FAF	OCT	Vision electrophysiology
fRPN-183	RPN-402/F/14	5	arCRD	Early childhood: exotropia, decr VA, photo.	-	6y: 0,4/0,4 8y: 0,3/0,2 11y: 0,4/0,3	7y: 10-20° (78/67); 14y: 10-20° (73/68).	8y: N; 11y: N.	NA	11y: centrally pres NE.	7y: decr cone ffERG; 12y: delayed lat PEV, decr cone and rod ffERG.
	RPN-403/M/9	5	arCRD	Early childhood: photo.	-	NA	8y: 10-20° (80/77); 9y: 10-20° (77/72).	NA	NA	NA	NA
fRPN-185	RPN-406/M/46	36	arCRD	Late teenage: photo; 30s: decr VA, const VF.	-	36y: 0,2/0,3 41y: 0,0/0,7 43y: 0,3/1,1 46y: 0,6/1,3	39y: 59/71; 41y: 40/63; 43y: 25/29; 46y: <10° (15/15)	36y: NV, pallor of the OpD, macular RPE atrophy.	NA	46y: central and periph NE thinning.	36y: delayed lat VEP, NR cone and severe decr rod ffERG.
fRPN-187	RPN-410/F/59	40	STGD	Childhood: photo, NB, decr VA.	Myopia, 60y: BE SCP catar.	48y: 1,0/1,0 50y: 1,0/1,0 60y: 1,3/1,3	NA	50y: macular RPE atrophy, yellow flecks around the macula.	NA	50y: central and periph NE thinning.	NA
fRPN-191	RPN-426/F/3	2	SRP	Early childhood: decr VA, photo, LE exotropia.	Hyperopia, astigmatism.	4y: 0,0/CF	NA	2y: macular pigments.	NA	NA	5y: delayed lat VEP, NR rod and severe decr cone ffERG.
fRPN-197	RPN-442/F/32	12	SRP	Teenage: NB; 20s: photo, decr VA.	32y: BE SCP catar operated.	26y: 0,5/1,3 32y: 1,3/1,3	26y: <10°	26y: typical of RP.	NA	26y: central and periph NE thinning; 32y: wsc.	NA
fRPN-198	RPN-444/F/49	7	Fundus albipunctatus	Childhood: NB, photo.	DM (type 1).	25y: 0,0/0,0	NA	25y: fundus albipunctatus without macular atrophy.	NA	NA	48y: NR rod ffERG.
fRPN-199	RPN-445/F/56	48	STGD	Late 40s: photo, metamorphopsia.	-	48y: 0,0/0,1 52y: 0,0/0,3 57y: 0,5/0,3	NA	48y: macular RPE atrophy, yellow flecks around the macula.	50y: macular RPE atrophy, fovea pres.	52y: macular RPE atrophy, centrally pres NE.	52y: abN lat and amp VEP, decr cone ffERG, central and periph dysf, N EOG.
fRPN-200	RPN-450/F/38	<1	LCA	At birth: nistagmus; early childhood: decr VA; totally blind since 15 y.	-	-	-	-	-	-	-
fRPN-202	RPN-448/F/36	35	arRP	30s: NB, const VF.	-	35y: 0,0/0,0 37y: 0,1/0,1	35y: <10° (29/23); 38y: <10° (9/7).	NA	NA	36y: centrally pres NE.	36y: N VEP, decr cone and rod ffERG, periph dysf mfERG.

Family ID	Patient ID /Sex/ A ¹ (y)	A ² (y)	Dx	Symptoms onset	Additional findings	BCVA (logMAR) RE/LE	VF RE/LE (RE/LE VFI %)	Fundus examination	FAF	OCT	Vision electrophysiology
	RPN-455/F/35	26	arRP	Late 20s: NB, const VF.	-	30y: 0,0/0,1	27y: 10-20°; 30y: 10-20° (63/57).	30y: NV, BSP in the periph.	NA	30y: centrally pres NE.	27y: NR ffERG, periph dysf mfERG.
fRPN-203	RPN-451/M/29	12	SRP	Childhood: NB; teenage: const VF, decr VA.	19y: BE catar operated, LE vitrectomy.	27y: LP/LP	27y: central scotome.	27y: typical of RP, severe macular atrophy.	NA	27y: severe macular atrophy.	NA
fRPN-204	RPN-452/M/51	47	SRP	40s: NB, const VF; 50s: photo, decr VA.	-	48y: 0,1/0,2	47y: <10° (3/3).	48y: BSP in the periph, light RE ERM; 51y: typical of RP.	NA	48y: centrally pres NE, light RE ERM.	48y: N VEP, NR ffERG.
fRPN-206	RPN-463/F/30	27	STGD	20s: photo, decr VA.	-	26y: 1,0/1,0 27y: 0,8/0,8	NA	26y: N; 27y: macular RPE atrophy.	30y: macular atrophy with hyper AF spotted lesions.	27y: severe central atrophy.	27y: decr cone LE ffERG, periph RE and central LE dysf mfERG.
fRPN-211	RPN-475/F/27	27	arCRD	20s: photo, decr VA, decr VF.	-	NA	27y: peripheral and central scotoma.	27y: typical of RP, macular RPE atrophy.	27y: macular atrophy.	27y: central and periph NE thinning.	NA
fRPN-212	RPN-478/M/13	3	arCRD	Early childhood: decr VA; Late childhood: photo, decr VF.	-	10y: 1,0/1,3	10y: <10° (9/14)	7y: diffused retinal atrophy, macular hypoplasia.	NA	7y: macular hypoplasia; 12y: severe NE thinning.	10y: NR VEP, severe decr cone and rod ffERG, abN EOG.
fRPN-214	RPN-482/M/24	24	SRP	Teenage: NB, const VF.	-	24y: 0,0/0,0	24y: tunnel vision.	24y: NV, isolated BSP in the periph.	NA	24y: centrally pres NE.	24y: N VEP, NR ffERG, periph dysf with central pres mfERG.
fRPN-217	RPN-495/F/57	31	arRP	Early 30s: NB, photo, decr VA; late 30s: dyschro, const VF.	Epilepsy, myopia magna, 40s: SCP catar.	45y: HM/HM; 54y: LSP/LSP	NA	45y: typical of RP, macular ERP atrophy.	NA	NA	NA
	RPN-496/F/55	25	arRP	20s: NB, photo; 30s: decr VA; 40s: dyschro, const VF.	Myopia magna.	NA	NA	43y: typical of RP, macular ERP atrophy.	NA	NA	NA

Family ID	Patient ID /Sex/ A ¹ (y)	A ² (y)	Dx	Symptoms onset	Additional findings	BCVA (logMAR) RE/LE	VF RE/LE (RE/LE VFI %)	Fundus examination	FAF	OCT	Vision electrophysiology
	RPN-498/F/48	25	arRP	Teenage: photo; 20s: NB, const VF; 30s: decr VA; 40s: dyschro.	30s: SCP catar.	43y: 0,7/0,5	NA	43y: typical of RP, macular ERP atrophy.	NA	NA	NA
fRPN-220	RPN-510/F/16	15	STGD	Teenage: decr VA.	-	15y: 0,5/0,5	NA	15y: bull's eye maculopathy.	NA	NA	16y: central dysf mfERG.
fRPN-224	RPN-525/F/28	23	SRP	Teenage: NB, photo.	23y: periph atrophy on AF.	23y: 0,0/0,0 29y: 0,0/0,0	23y: 10-20° (77/69); 29y: 10-20°.	23y: BSP in the periph; 29y: wsc.	23y: hyper AF macular ring.	23y: central and periph NE thinning; 29y: wsc.	23y: decr cone and rod ffERG.
fRPN-226	RPN-551/M/59	59	SRP	40s: NB, const VF.	DM (type 2), glaucoma.	51y: 0,0/0,0	51y: 10°	51y: BSP in the periph.	NA	NA	51y: decr cone and rod ffERG; 59y: decr LE amp VEP, NR ffERG, abN EOG.
fRPN-232	RPN-602/M/39	20	SRP	Childhood: NB; 20s: const VF; middle 30s: photo, decr VA.	Asymptomatic hyperckemia; 30s: BE catar.	27y: 0,0/0,2 30y: 0,1/0,3 39y: 0,2/0,2	28y: <20° (68/28); 30y: 10° (65/32); 39y: <10°.	27y: typical of RP; 30y: wsc; 39y: RPE atrophy.	NA	NA	27y: NR ffERG.
fRPN-233	RPN-603/F/28	25	SRP	20s: NB, const VF, photo, decr VA.	-	29y: 1,0/0,5	27y: 10-20° (42/41); 29y: <10°	25y: N; 29y: BSP in the periph.	NA	27y: centrally pres NE; 29y: central and periph NE thinning.	NA
fRPN-235	RPN-605/F/31	6	LCA	Early childhood: nystagmus, strabismus, NB, decr VA, const VF.	Hyperopia, BE catar.	6y: <0,1/<0,1	6y: <5°	6y: N; 10y: NV.	NA	NA	6y: NR ffERG.
fRPN-238	RPN-608/F/41	21	adMD	Teenage: decr VA, photo.	Myopia magna; 41y: dark choroid on FA.	41y: CF/CF	21y: central scotoma.	41y: yellow-white deposits in the macula.	21y: foveal hypo AF, perifoveal hyper AF.	41y: macular NE thinning.	21y: abN lat and amp VEP, N ffERG, abN EOG.
fRPN-239	RPN-609/M/53	48	STGD	40s: photo, decr VF, decr VA.	-	53y: 1,0/1,0	53y: central scotoma.	53y: macular RPE atrophy.	NA	53y: atrophy and thinning of the macula.	NA
fRPN-AP	RP-434/F/71	46	adRP	20s: NB; 30s: const VF; 40s: decr VA.	-	47y: 0,0/0,0	47y: <30°	NA	NA	NA	47y: decr amp VEP, decr rod ffERG.

Family ID	Patient ID /Sex/ A ¹ (y)	A ² (y)	Dx	Symptoms onset	Additional findings	BCVA (logMAR) RE/LE	VF RE/LE (RE/LE VFI %)	Fundus examination	FAF	OCT	Vision electrophysiology
	RPN-461/F/54	33	adRP	Early teenage: NB; 30s: const VF; 40s: decr VA.	Myopia, astigmatism; 44y: incipient SCP catar.	44y: 0,0/0,0 47y: 0,2/0,4 49y: 0,8/1,0	44y: <5°; 47y: <5° (1/3).	44y: typical of RP.	NA	49y: macular atrophy, LE ERM.	NA
fRPN-BT	RP-543/F/48	9	arCRD	Childhood: photo; teenage: decr VA, dyschro.	Hyperopia and astigmatism; 20s: incipient catar, total blindness.	9y: 0,8/0,7 13y: 1,0/1,0	NA	NA	NA	NA	NA
	RP-545/M/51	8	arRP	Childhood: photo; teenage: const VF.	20s: total blindness.	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	RP-547/M/55	13	arCRD	Childhood: photo; teenage: decr VA.	Early 20s: total blindness.	13y: 0,8/0,7	NA	NA	NA	NA	NA
fRPN-GB	RPN-26/M/83	10	XL RP	Early childhood: NB; teenage: const VF, photo; 20s: decr VA.	70y: catar operated.	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	RPN-27/F/56	56	XL RP	Asymptomatic	-	NA	NA	NA	NA	NA	42y: N VEP, light decr rod ffERG.
	RPN-60/F/66	40	XL RP	Early 40s: flashing lights; 50s: NB, const VF.	-	50y: 0,0/0,3	57y: 20°-30°, affecting sup filed/<10°	40y: BSP in the periph.	NA	57y: macular NE pres RE, periph NE thinning LE.	50y: decr amp LE VEP, decr cone and rod ffERG.
	RPN-560/M/52	45	XL RP	Late 20s: NB, photo; early 30s; 40s: const VF, decr VA.	Myopia, astigmatism, BE catar.	51y: 0,3/0,3	NA	51y: BSP in the mild-periph.	NA	NA	NA
fRPN-GG	RP-506/F/57	10	SRP	Childhood: NB, photo; early teenage: const VF; late teenage: decr VA.	Nuclear and SCP catar; 20s: total blindness.	NA	NA	57y: typical of RP and chorioretinal atrophy.	NA	NA	NA

Family ID	Patient ID /Sex/ A ¹ (y)	A ² (y)	Dx	Symptoms onset	Additional findings	BCVA (logMAR) RE/LE	VF RE/LE (RE/LE VFI %)	Fundus examination	FAF	OCT	Vision electrophysiology
fRPN-SRT	RPN-443/M/64	18	SRP	Childhood: NB; early 20s: photo, const VF.	40s: BE catar operated.	39y: 1,0/1,0	39y: <10°; 49y: 5°	49y: typical of RP.	NA	60y: central and periph NE thinning.	55y: abN lat and amp VEP, NR rod and decr cone ffERG, central and periph dysf mfERG.

Abbreviations: abN: abnormal; ACHM: achromatopsia; adRP: autosomal dominant RP; adMD STGD-like: autosomal dominant macular dystrophy STGD disease-like; A¹: Age at genetic testing; A²: Age at time of diagnosis; amp: amplitude; arRP: autosomal recessive RP; AVMD: adult-onset vitelliform macular dystrophy; BCVA: best-corrected visual acuity; BE: both eyes; BMD: Best macular dystrophy; BSP: bone spicule pigmentation; catar: cataracts; CB: colour blindness; CF: counting fingers; CME: cystoid macular edema; const: constricted; decr: decreased; DM: Diabetes mellitus; Dx: diagnosis; dyschro: dyschromatopsia; dysf: dysfunction; EOG: electrooculogram (Arden index); ffERG: full field electroretinography; ERM: epiretinal membrane; FA: fluorescein angiography; FAF: fundus autofluorescence; HM: hand motion; hyper AF: hyperautofluorescence; hypo AF: Hypoautofluorescence; inf: inferior; lat: latency; LCA: Leber congenital amaurosis; LE: left eye; LMH: lamellar macular hole; LORD: late-onset retinal degeneration; LP: light perception; LSP: light and shadow perception; mfERG, multifocal electroretinography, N: normal; NA: data not available; NB: night blindness; NE: neuroepithelium; NLP: no light perception; NR: no response; NV: narrowed vessels; OCT: optical coherence tomography; OpD: optic disc; periph: peripheral, periphery; photo: photophobia; pres: preserved, preservation; RE: right eye; RPE: Retinal pigment epithelium; RP: retinitis pigmentosa; SCP: subcapsular posterior; SP: shadow perception; SRP: sporadic retinitis pigmentosa; STGD: Stargardt disease; sup: superior; typical of RP, comprised bone spicule pigmentation, narrowed vessels and pallor of the optic disc; VA: visual acuity; VEP: visual evoked potentials; VF: visual field; VFI: Visual Field Index; VL: vitelliform lesions; wsc: without significant changes; y: years.

ANEXO 2. Cuestionario

Estudio de las DHR mediante NGS

IIS-la Fe

RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS

FECHA:

DATOS PERSONALES

SOSPECHA DIAGNÓSTICA.....

DATOS OFTALMOLÓGICOS

- | | | | |
|--|----|----|------------|
| 1. CEGUERA NOCTURNA | SI | NO | Edad |
| 2. FOTOFobia | SI | NO | Edad |
| 3. TARDAR EN ADAPTARME A LA OSCURIDAD | SI | NO | Edad |
| 4. TROPIEZA CON FACILIDAD | SI | NO | Edad |
| 5. DISMINUCIÓN DEL CAMPO VISUAL | SI | NO | Edad |
| -Prácticamente no le queda campo visual | | | |
| -Solo ve como por el cañón de una escopeta | | | |
| -Escotoma central | | | |
| -Mitad campo (nasal/temporal) | | | |
| 6. DIFICULTAD PARA LEER, COSER, VER LA TV | SI | NO | Edad |
| 7. ALTERACIÓN EN LA PERCEPCIÓN DE COLORES | SI | NO | Edad |
| 8. CATARATAS | SI | NO | Edad |
| -¿Tiene o ha tenido catarata? ¿En qué ojo? | | | |
| -¿A qué edad le apareció? | | | |
| -¿Se ha operado? ¿Cuándo? | | | |
| 9. NISTAGMO | SI | NO | Edad |
| 10. ESTRABISMO | SI | NO | Edad |
| 11. OTROS SÍNTOMAS OFTALMOLÓGICOS | | | |
| | | | |
| | | | |

OTROS SÍNDROMES

- | | | | |
|--|----|----|------------|
| -Auditivos | SI | NO | Edad |
| -Endocrinológicos (diabetes, tiroides, ciclo menstrual...) | SI | NO | Edad |
| -Renal / Hepático / Cardíaco | SI | NO | Edad |
| -Obesidad | | | |
| -Polidactilia | | | |
| -Dismorfología facial | | | |
| -Ataxia | | | |
| -Dificultad en el aprendizaje | | | |
| -Retraso psicomotor | | | |

Otros

-Tto farmacológico:

ANTECEDENTES FAMILIARES

- | | | | |
|----------------------------------|----|----|--|
| -Consanguinidad entre los padres | SI | NO | |
| -Árbol: | | | |

ANEXO 3. Consentimiento informado

HOJA INFORMATIVA PARA EL PACIENTE

El paciente acepta entrar a formar parte del proyecto de investigación titulado: **DIAGNOSTICO GENÉTICO MOLECULAR DE LAS DISTROFIAS HEREDITARIAS DE LA RETINA MEDIANTE SECUENCIACION MASIVA DE NUEVA GENERACIÓN (NGS)** cuyos objetivos y características se detallan en este documento y que, en ningún caso, podrá comportar peligro adicional para su salud. Para ello se solicita la autorización por escrito del paciente y la aceptación por parte del investigador y de la Dirección del Hospital Universitario La Fe según el art. 10 de la Ley General de Sanidad 14/86.

OBJETIVOS DEL PROYECTO:

El principal objetivo del presente proyecto es el diagnóstico genético molecular en pacientes con distrofias hereditarias de la retina (DHR) mediante secuenciación de alto rendimiento o nueva generación (NGS) de todos los genes asociados a distrofias hereditarias de retina conocidos hasta la fecha de redacción de este proyecto

METODOLOGÍA EMPLEADA

Como participante:

1. Será entrevistado por un experto en Genética Humana que le interrogará acerca de posibles antecedentes familiares, consanguinidad y diversos aspectos clínicos de relevancia en las DHR. Usted tiene derecho a negarse a responder cualquier pregunta que no desee contestar.
2. Se le podrá pedir una muestra de sangre de unos 10cc que se le extraerá del brazo. De la muestra de sangre se aislará el material genético (ADN). El ADN será utilizado por los Investigadores de la Unidad de Genética del Hospital Universitario La Fe.
3. Las muestras obtenidas se guardarán para su empleo en el presente proyecto de investigación hasta un máximo de 6 años.

BENEFICIOS ESPERADOS PARA EL PARTICIPANTE O LA SOCIEDAD

Los beneficios directos para el participante serían la posible identificación de las mutaciones responsables de la enfermedad de cara a poder ofrecer un consejo genético al paciente.

Así mismo, los conocimientos que se puedan adquirir en el diagnóstico y la identificación de mutaciones implicadas en las DHR podrían ser beneficiosos para la sociedad en general y para las personas que padecen esta enfermedad y sus familiares.

INCOMODIDADES Y RIESGOS DERIVADOS DEL ESTUDIO

1. La toma de la muestra de sangre puede ser incómoda y ocasionalmente puede provocar un pequeño hematoma.
2. En alguna ocasión se le podría solicitar la consulta por parte de especialistas en neurofisiología y/o oftalmología.

CARÁCTER VOLUNTARIO DE SU PARTICIPACIÓN

Su participación en este estudio es VOLUNTARIA.

Si usted decide no participar, su relación con los médicos que lo atienden, su derecho a los servicios de salud u otros servicios que le corresponden no se verán afectados en absoluto.

Si usted decide participar, puede libremente dejar de participar en el momento que lo decida, sin que ello altere la relación médico-enfermo ni se produzca perjuicio en su atención sanitaria.

CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, garantizando los derechos del paciente de acceso, rectificación y petición de cancelación.

Su sangre y muestras de ADN y ARN serán codificadas con un número de identificación que no incluye ninguna información personal, siendo el responsable del registro el investigador principal del presente proyecto. En dicho registro se disociarán los datos de identificación personal del paciente de los obtenidos mediante el presente trabajo. Ninguna información suya será transferida a otras personas ajenas al personal investigador sin su permiso por escrito.

El acceso a su información personal quedará restringido al Investigador principal y sus colaboradores, autoridades sanitarias, al Comité Ético de Investigación Biomédica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente en nuestro país.

El propietario de las muestras y responsable del Registro será el Dr. José M. Millán Salvador, investigador principal de este proyecto. Las muestras quedarán custodiadas por él en las instalaciones de la Unidad de Genética del Hospital La Fe por un período de 6 años. Transcurrido este tiempo los datos obtenidos serán fácilmente consultables, el material genético dejará de ser propiedad del promotor del estudio y el destino del mismo será decidido y/o regulado por los Organismo Gubernamentales o será destruido. En ningún caso las muestras serán motivo de lucro directo, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

El paciente puede revocar el estudio en cualquier momento sin que la no participación suponga perjuicio para él ni se le discrimine en el trato con el clínico o en el tratamiento si lo hubiese.

Tendrá acceso a la información referente a este proyecto el personal investigador adscrito al mismo, siendo el investigador principal el Dr. José M. Millán Salvador, con quien podrá contactar personalmente o en caso de urgencias al teléfono 961973153.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

Este consentimiento informado ha sido autorizado por el Comité de Ética Asistencial del Hospital Universitario La Fe de Valencia para participar en el proyecto de investigación: “**DIAGNOSTICO GENÉTICO MOLECULAR DE LAS DISTROFIAS HEREDITARIAS DE LA RETINA MEDIANTE SECUENCIACION MASIVA DE NUEVA GENERACIÓN (NGS)**”, dirigido por el Dr. José M. Millán, de la Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal del Hospital Universitario La Fe de Valencia.

Yo,

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha:.....

Firma del participante:.....

CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO ORAL ANTE TESTIGOS

Este consentimiento informado ha sido autorizado por el Comité de Ética Asistencial del Hospital Universitario La Fe de Valencia para participar en el proyecto de investigación: “**DIAGNOSTICO GENÉTICO MOLECULAR DE LAS DISTROFIAS HEREDITARIAS DE LA RETINA MEDIANTE SECUENCIACION MASIVA DE NUEVA GENERACIÓN (NGS)**”, dirigido por el Dr. José M. Millán, de la Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal del Hospital Universitario La Fe de Valencia.

Nombre:

DNI:

Ha recibido la hoja de información sobre el estudio.

Ha podido hacer preguntas sobre el estudio.

Ha recibido suficiente información sobre el estudio.

Ha sido informado por

Comprende que su participación es voluntaria.

Comprende que puede retirarse del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Y ha expresado libremente su conformidad para participar en el estudio.

Fecha:

Firma del testigo.....

CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO DEL REPRESENTANTE (menores o incapaces)

Este consentimiento informado ha sido autorizado por el Comité de Ética Asistencial del Hospital Universitario La Fe de Valencia para participar en el proyecto de investigación: “**DIAGNOSTICO GENÉTICO MOLECULAR DE LAS DISTROFIAS HEREDITARIAS DE LA RETINA MEDIANTE SECUENCIACION MASIVA DE NUEVA GENERACIÓN (NGS)**”, dirigido por el Dr. José M. Millán, de la Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal del Hospital Universitario La Fe de Valencia.

Yo,.....
(nombre y apellidos)
en calidad de.....
(relación con el participante)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.
He podido hacer preguntas sobre el estudio.
He recibido suficiente información sobre el estudio.
He hablado con:.....

Comprendo que su participación es voluntaria.
Comprendo que puede retirarse del estudio:
-Cuando quiera
-Sin tener que dar explicaciones
-Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos

En mi presencia se ha dado a
(nombre del participante)
toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar.

Y presto mi conformidad con que.....
(nombre del participante)
participe en el estudio.

Fecha:.....

Firma del representante:

ANEXO 4. Cebadores

Tabla VIII.2 Cebadores utilizados en la validación y segregación familiar.

Gen (exón)	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)
ABCA4 (5D)	ACTAAATTGGGCCAGCTGC	547
ABCA4 (5R)	ACCAGGATGTGTACAGCTTCG	
ABCA4 (6D)	TTCCTGTCCGATGTAACAC	405
ABCA4 (6R)	GTCCAGAACACCAGGCTCAC	
ABCA4 (8D)	GCAGCTGGATTAAGGATTGC	501
ABCA4 (8R)	AGGCCACTCAGCAAGACAAG	
ABCA4 (3D)	CTACACCGGGAGCTTGAGAG	505
ABCA4 (3R)	AGAGAGGAAACCTGCTCTGC	
ABCA4 (10D)	GGAAGTTGGGAGATGGTGAA	459
ABCA4 (10R)	CAC TTGGT GACTGCTTGAA	
ABCA4 (12D)	ACAGCAGCCCTTATCCTGTG	382
ABCA4 (12R)	CCAGTCTCAATCCCTTTCTCTC	
ABCA4 (13D)	GAGTTCCGAGTCACCCTGTG	410
ABCA4 (13R)	GTCAGAGCTCCATGCTCTCC	
ABCA4 (14D)	CAGCCATTAAATGTCCAGG	450
ABCA4 (14R)	AATCCAGGCACATGAACAGG	
ABCA4 (17D)	AAGATTATTGGTCTTGCTGTTGC	527
ABCA4 (17R)	TCATCCATGATCAGCCATTC	
ABCA4 (20D)	TCTCACTGAACCTGGTGTGG	454
ABCA4 (20R)	CACCCTTCTGAGGGAGGAG	
ABCA4 (21D)	CCACCACAGTGAGCATCTTG	357
ABCA4 (21R)	AAGCTCTCCTGCTCCAAGC	
ABCA4 (22D)	CTAAGAGGCAGCACCAAACC	428
ABCA4 (22R)	CAGGAGGCTTTAGCTGGAAC	
ABCA4 (23D)	CCAGGAAATTGCTGTACACC	390
ABCA4 (23R)	AAGACACTGATTCTGGTGGC	
ABCA4 (27D)	TGGCATTAGAGATCCAGACC	447
ABCA4 (27R)	TCTAAAGAGGGTGCTCCTTG	
ABCA4 (28D)	GCTCTTTGAAATGCCCTTTG	587
ABCA4 (28R)	CTGCCTGTCCACTAGGATCG	
ABCA4 (30D)	GAAAGGGCCTGGGTCTAAAG	504
ABCA4 (30R)	TTTTGGTGAGTGCTTCCTC	
ABCA4 (34D)	GAAACTCTCATGAGTGATAAC	264
ABCA4 (34R)	CCTTGCTAGATTTT CAGCAGG	
ABCA4 (39D)	ATGCTCTGCTGGACAAATCC	452
ABCA4 (39R)	AAACAGAGGCACCCTAATCC	
ABCA4 (40D)	AGATGTCTATGCCCGTTTG	574
ABCA4 (40R)	GGCTCCTGAGGAAAGAAATG	
ABCA4 (41D)	TGAGCACCTGACCTCTCTACC	500
ABCA4 (41R)	TAGCAGGGAACACACATTGG	
ABCA4 (42D)	GAGATGTCTCAGTACTCACC	313
ABCA4 (42R)	TGAATAGCTCTGCCTTATGG	
ABCA4 (43D)	CCGTGTCAACTGGGACTTAG	401
ABCA4 (43R)	CAGATCTTTCAGGGCCTCAG	
ABCA4 (45D)	AGCACATGCCAGAGGACAG	381
ABCA4 (45R)	TAAATCTGCCGACCCAGAAC	
ABCA4 (48D)	CCCAACCACTAACAGAGGCC	437
ABCA4 (48R)	CAGCTTTTACCCAATAAACA	
ADAM9(9D)	GGTCTCCAACCTGATCTCC	574
ADAM9(9R)	GGTCACAGGAATCCAAAACAG	
ADAMTS18 (18D)	CAATGCTGGTAAATCAGAAGC	456
ADAMTS18 (18R)	GACTCACTGGAGCCTGGAAC	
ADAMTS18 (20D)	TGGAGTTTATCCACCTTTT CAC	563
ADAMTS18 (20R)	TCAAGAAACCTCCAGCAGTG	
AIPL1 (2D)	AGGATTTCTGGACGCACAGG	547

Gen (exón)	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)
AIPL1 (2R)	AGTTTGCAGGACTGGCTTTG	
AIPL1 (3D)	CCTGGCACACAGTTAACCAC	486
AIPL1 (3R)	CGTATTCTCCCATGGCTTATG	
BBS1 (9D)	CAGCTGCACGGTTGTTTAAG	539
BBS1 (9R)	TCACAAGCCTCCAGGTATCC	
BBS1 (8D)	GGCATTCTGGGAGTATCTTGG	277
BBS1 (8R)	CAGAACTAACTGTGGAGCATGG	
BBS2 (10D)	GCAAGGGAGCACTAATGAGG	456
BBS2 (10R)	ACAGGAGAATGGCATGAACC	
BEST1 (2D)	GCCTTGAGACCACCTTCATC	525
BEST1 (2R)	GCAGCCTCTCAGTCTGACTTC	
BEST1 (4D)	CAGCAGAAAGCTGGAGGAG	520
BEST1 (4R)	CACCTTCAGACACCCGACTC	
BEST1 (5D)	ATCCCTTCTGCAGGTTCTCC	295
BEST1 (5R)	CCCAAGGCTTCTCTTTGTAGG	
BEST1 (6D)	CAGCCAGGAATGGACCATAG	287
BEST1 (6R)	AGCCTCTAGGTGAGCCCTTC	
BEST1 (9D)	CTGCAGCCAGTCATTCACTC	671
BEST1 (9R)	GCCTGACACTTACTGAAGCAAC	
C1QTNF5 (15D)	GGGGTACGGTGACCTTAGAG	547
C1QTNF5 (15R)	GGTGCTGTCTGTCTTGATGC	
C21orf2 (2D)	TTGCCATGCCATTAATCC	239
C21orf2 (2R)	AAAATTCTCTTGGGAAAGAAGC	
C21orf2 (4D)	ACACAGGTCCCATGAGTGC	450
C21orf2 (4R)	ATCTATGTCCCGCCAGACC	
C2orf71 (1cD)	CAGCCAAATCTCCTGCAAC	596
C2orf71 (1cR)	ATCCCAAAGGAATCACATGG	
C2orf71 (1dD)	CAGGACTGCCTGCTCTCAG	568
C2orf71 (1dR)	ACGACTCTGACTGGGACCTC	
C8orf37 (5D)	ATGACGATCTCCCTCAGACG	582
C8orf37 (5R)	CAGTCCATCGTTGACTGAAGC	
CA4 (8D)	TAATGAGGGCTCCCAGGAC	500
CA4 (8R)	CCTGGAACAGGAGGAACAGG	
CACNA1F (16-17D)	GATCTGGAGACCATGGGATG	494
CACNA1F (16-17R)	CTAGAGGCATCTCTGGTGTTG	
CACNA1F (20D)	TCCTGGAGGAGCTGACATTC	503
CACNA1F (20R)	AAGACATGATGGTGGATGAGG	
CACNA1F (3-4D)	CCAGGACCTGTACACCTTGG	654
CACNA1F (3-4R)	AAAGAGTCGCTTTCCTGAGC	
CACNA1F (5-6 D)	TTTCTAGTTACAGGGACTTGTGC	576
CACNA1F (5-6 R)	TTTCAGTGGGTTTCCCTGAG	
CACNA1F (6int)	TTCGATGTGAAGGCATTGAG	
CACNA2D4 (21-22D)	GGGACCTGTGCAGACTTAGC	502
CACNA2D4 (21-22R)	GCTAATGGGATAGGGCTGTG	
CACNA2D4 (23D)	GCTCCCTCAAGCTCACAGAG	443
CACNA2D4 (23R)	CAACCCAGAGAAAGGAGCTG	
CACNA2D4 (25D)	AATTGCTGGGAAGCATTGTC	518
CACNA2D4 (25R)	GCTGGCTAGGGAATCAAATG	
CDH3 (11D)	TCCCTCCTGCATAGTTCTC	532
CDH3 (11R)	CAAATAGCCCTCCTCGACAC	
CDH3 (14D)	CAGTTAGAGGGGCTCTGAGG	378
CDH3 (14R)	GCAATGGACCAGAGAAGTGC	
CDHR1(11D)	AGCCAGGACACACTCAAACG	487
CDHR1(11R)	TGGTTACTCTCCCTCCTCTCC	
CDHR1(13D)	GAAGATGCCAGGCCTTAGAG	482
CDHR1(13R)	TGAGGCTAAGAGAGGGCAAG	
CEP290 (14 D)	CCACCATGTTGGGATCACTG	331
CEP290 (14 R)	AAATGGTATGCAGTAAATAGCACAG	
CEP290 (16-17D)	CTTGGGTTACAGTTTAAATATCTGG	598

Gen (exón)	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)
CEP290 (16-17R)	GGACTGAACCCACTGACACTC	
CEP290 (33D)	AGTTTCTTCAATGTGTTGTGAGG	482
CEP290 (33R)	TTGGAAGGGGCAAACCTAGG	
CEP290 (8-9D)	TTTCTTTGGTTATTCAAGATAATATGC	530
CEP290 (8-9R)	CCAGGGAATTTACATGTAGGG	
CEP290 (21D)	CATAAATAAGAATTTGAATTGGCATAAC	570
CEP290 (21R)	CTCAACCATACTTCAGTTTCTGC	
CERKL (6D)	CCTGTGTTGTGTTTGTGTTGTC	443
CERKL (6R)	TGCCAGAAGTCTGGATCTTTC	
CHM (2D)	GCAAGGATGGGTCTCTTTGG	390
CHM (2R)	TTTCACAAAATAGTAAAACCTGTATGC	
CHM (5D)	TCTGAGTCACATAAGCAAAAACG	580
CHM (5R)	ACAAAACAAATGTTCTGCATCTC	
CNGA1 (10c D)	TCTTTGTGGTGGTTGATTTCC	676
CNGA1 (10c R)	TGCTTCCCTTTCTCTTCCAG	
CNGA1 (10Da)	GACCTCAACAAAAGTTAATTGACAG	297
CNGA1 (10Ra)	TGTTTCTGTTCTCTGGAAGAACTC	
CNGA1 (10Db)	GTTAGGGTGGAACTATCCAG	450
CNGA1 (10Rb)	GCTTGAAATTCTGCTCTGGC	
CNGA1 (3D)	TGCTTTCTGCCATGATTGTG	477
CNGA1 (3R)	GACAAGTTATGCAGTTCCAAAGTG	
CNGA3 (5D)	AAGCAGTGGGATAGGGATTG	248
CNGA3 (5R)	TAAGGAGAGAGGCCAAGCTG	
CNGA3 (6D)	GTGGACAGCCACATCTTGG	350
CNGA3 (6R)	TAAGTGGTGGCCGTGAGG	
CNGA3 (7D)	CAATCCCAGCTCTTCTCAGG	478
CNGA3 (7R)	ACCACCTACCCTCACTGTCTG	
CNGA3 (8b D)	AAAGATGAGGAGTATCTCTTTGTGG	600
CNGA3 (8b R)	GTAGCCAATGCTGCGGATG	
CNGA3 (8c D)	GGTCACCCAGTTCGTGGTC	586
CNGA3 (8c R)	AGCTGGAATTCAACCCTGAC	
CNGB1 (11D)	CTGGAGACCTGGGCTCTG	367
CNGB1 (11R)	AGGGAGTGGGTGGAATGAAC	
CNGB1 (20D)	ATAATGGTGCCAGGGTCCTC	375
CNGB1 (20R)	CCATCCCACCTCTTGAATCC	
CNGB1 (21 D)	GAAAGAACAAAACCCTACCTGA	380
CNGB1 (21 R)	TATGACAGCATCAGGGGTCA	
CNGB1 (25D)	GTGTCTATACCTCACCTCCC	351
CNGB1 (25R)	GGCCAAGATGTGGCTCTTG	
CNGB1 (28-29D)	AATCCAGAGTGGTTCCATGC	570
CNGB1 (28-29R)	CTCTTGGGTCTGGTCAGGTC	
CNGB1 (30-31D)	CCAGTGCCTAGGTTCTCTCT	696
CNGB1 (30-31R)	TGTGGTTATGTAAGAGAAATTC	
CNGB3 (10D)	CCAGTCAAGACATTGCCATC	441
CNGB3 (10R)	TGGCCAAATAGCATTACCAG	
CNGB3 (18D)	AAGCAAAGCAGACATGATTCC	589
CNGB3 (18R)	TTGCCTTTCGTTTCTCAAGG	
CNGB3 (2D)	AACCAGAGGGCAGCTGTG	513
CNGB3 (2R)	TGGCACATGTCAGGTGATG	
CNGB3 (2R)int	TTTCAGACTGCATTCTGACC	
CNGB3 (6D)	AGTCCAGAGGCAGAATGGTG	485
CNGB3 (6R)	TTCTTGCAATTATCCATGCAG	
CNGB3(12D)	CAAGTAATCAGGGCATTAGAAGG	373
CNGB3(12R)	TTTTCAACCTTTTGTCAAATCC	
CNNM4 (1aD)	GGGCCTCCAATGCAAATG	590
CNNM4 (1aR)	GGTGAGCACCACCAGCAC	
CNNM4 (1aD)v2	CAGAGCCAGAGCAACATGG	536
CNNM4 (1aR)v2	TCCACCATGAAGAGCAGTGA	
CNNM4 (1cD)	CCAACACCATCCTTCTCACC	594

Gen (exón)	Secuencia (5'-3')	Amplificación (pb)
CNNM4 (1cR)	CAGAACACTAAAGCCAGCAGAC	
CNNM4 (6 D)	TGTTTGGTTGATTTGTTTTGG	688
CNNM4 (6 R)	AGCCACATGCACACCTGTAG	
CRB1 (11D)	GAGATAAGGCAAACTTTTCTTCC	298
CRB1 (11R)	TCATTCATACGCAAATGAGG	
CRB1 (12D)	ACTGAGTGGTACCAGCTTGC	444
CRB1 (12R)	TTCCAGTGTAATCCCAGTTGC	
CRB1 (4D)	AGATGATGCCATGGGTCTTG	400
CRB1 (4R)	TGTGAGCACTGAAGAATAAACTAAAC	
CRB1 (7D)	GTCTTCCATCCCTTCTGTC	821
CRB1 (7R)	CTGGTGGGTCAGTAACATC	
CRB1 (8D)	TGTAAAGATGCAGGGAAATTAGC	605
CRB1 (8R)	TTCCAGTAATGAGGGAAGG	
CRB1 (2D)	GGTTGAGGCAGCACAAAGG	794
CRB1 (2R)	TGGATTTTCAGCAGTTTAGGG	
CRX (4 D)	AGATGTGAACCCAGCACCTC	537
CRX (4 R)	ACCATGGGAGAAAGGTAGGG	
DTHD1 (5D)	GCATAATTCCTGGCACATAG	464
DTHD1 (5R)	CAGATAGCATACCCATGTC	
DTHD1 (9D)	CACTGCTCCAAGGCCAAAC	597
DTHD1 (9R)	CGTGCTTCTCCCTTTGTCTC	
EFEMP1 (10-11D)	TGCAAACAGAATCTGCCAGT	596
EFEMP1 (10-11R)	GTTTGCTTTCCTTCCACATG	
EYS (24D)	AAACTGATCATGAAGATACACTGAGG	391
EYS (24R)	GAAGGAGAGATGCGCTGAAG	
EYS (26aD)	GCAATTTGCCTGAGATTTATCC	591
EYS (26aR)	CAACTGGAGTTGCACTTATGG	
EYS (26bD)	CCCACCTTTATGAGACATTCTGG	593
EYS (26bR)	CAATGGTGGCAGATTATTTTTG	
EYS (26cD)	AACTATGGGACCCACTGAGG	638
EYS (26cR)	CTGCTGCCCTGATTACAATG	
EYS (29D)	TGCTTCTGGCTTTGTTTTATTG	395
EYS (29R)	CAGATGGCCCCACTAGCC	
EYS (33D)	TCTTTGATGGCAAAGATTGTG	376
EYS (33R)	GAGGCGGAGGTTGTAGTGAG	
EYS (36D)	TTCAGTGGAAAGCACACAGC	486
EYS (36R)	GAACCCAGAAGAAGATTTGATG	
EYS (40D)	CTACAGCTTAGTGCAGATTG	556
EYS (40R)	GTTTGTACAAGTGGAATGAC	
EYS (43aD)	GGACAGCCTGTGGGTACAAC	590
EYS (43aR)	TGGATCAATATCCTCGGAAAG	
EYS (43bD)	CAGTTGCCTGTGTACTTTGG	722
EYS (43bR)	CAGTTGATTCCCCGTAAGC	
FLVCR1 (1D)	TCGTGGTGCTCCTGATCTTC	552
FLVCR1 (1R)	TTCAACGGCTTCATCTCCTC	
FSCN2 (1bD)	GCCTGTGAGGCAGAGCAG	732
FSCN2 (1bR)	ACGCACAGACACGATACCAC	
FSCN2 (3D)	CACTCCTTGAACCTGAG	315
FSCN2 (3R)	CAGCTCTTGGTGGAGATG	
GDF6 (2D)	TGCACGTGAACTTCAAGGAG	426
GDF6 (2R)	ATCCAGGCTGTTCCCTCAC	
GNAT2 (4D)	ATAGTGCCACCTCTGCATC	437
GNAT2 (4R)	GTGAGGTTTCTCCCAACCAG	
GNAT2 (8D)	CAAAGGTGGAAAGACACCTCTC	574
GNAT2 (8R)	TGCAATAGCTATCCCCTTTG	
GUCA1B (2D)	AGGCCACATGGATTTAAAGG	473
GUCA1B (2R)	CCAAACAGATGGGGATTTTC	
GUCA1B (4D)	TGAGGTCTGAGACTGCAGGA	365
GUCA1B (4R)	GAAGTCAACACCAGGGGAAG	

Gen (exón)	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)
GUCY2D (10D)	TGTTCAAGTCCTCCCTCCTG	507
GUCY2D (10R)	GGCAGCTCAGGTACAAGTCC	
GUCY2D (13D)	GGGTGCTTGATGAATAGTAGATG	458
GUCY2D (13R)	TCAAAGTACTCGGGCTCCAC	
IMPDH1 (10D)	CTTGGGAAGAGGGCTAGGTC	477
IMPDH1 (10R)	GGCACAGGCTTAATCAGAGG	
IMPG2 (5D)	GGGTGATTCTAGTGGAGTAGGC	592
IMPG2 (5R)	AAATGGTGGCGTTAGAATGG	
IQCB1 (8D)	TTCTTGATCAGGACACAGTC	496
IQCB1 (8R)	TCTCCACATGCTATCTGTAGTGAC	
IQCB1 (14D)	CTTGCATAAGAGTACAAGATAGACATC	535
IQCB1 (14R)	GGGTGACACATATGAATGATGG	
KCNJ13 (3D)	TGACTCACTGAAAGGCATGG	864
KCNJ13 (3R)	ATTACCGTGATGTAGAGAGC	
KCNV2 (1a D)	GCCACGTGATCCATCCTC	596
KCNV2 (1a R)	CCCGGACAGGTAGAAATTGTAG	
KCNV2 (1b D)	TAAGCCTGTGCGACGACTAC	549
KCNV2 (1b R)	GCAGGTA CTGAGCGTGAAG	
KCNV2 (1c D)	GTGGAGGAGATGCAGCAG	599
KCNV2 (1c R)	AGCCTGGTGGCTGATAACC	
KIZ (10D)	TGGGGAACCTATCCACAGAC	553
KIZ (10R)	CAACAAAAGGGCTTTTCCAC	
LCA5 (9D)	AAACATCAGAGAGGTCAAATCC	600
LCA5 (9R)	CCTTCATTCTTGGAACACTATC	
MAK (6 D)	TGAACACCCACTGGAGTCAC	600
MAK (6 R)	AATAAACCAATCCTTCGCTTTC	
MAK (14D)	CCCATCAAATGAGAGGATG	379
MAK (14R)	TTTGCCCTTCCAAGTACCC	
MERTK (2D)	AGTTGGGCATGAAGGACTTG	795
MERTK (2R)	GCCTGGGCTACAGAATGATAC	
MERTK (9D)	CTGTGGAAGTGTGGCTTCTG	551
MERTK (9R)	TCCCAAGTAGCTGGGACAAC	
MVK (9D)	GAACACCTCCTCCCTCCAC	400
MVK (9R)	TTCTGAGCACAGCCAGATTG	
MVK (10D)	GTGCCAGGTAGGCAAAGC	295
MVK (10R)	ACACAGCGGAGCTGAGACC	
NMNAT1 (5D)	CCACTTGGAGGAGGTAGAG	535
NMNAT1 (5R)	CCCCAGTTATTA ACTCCCAG	
NR2E3 (2-3D)	TCGTTCAAATGCGGGTGAGC	588
NR2E3 (2-3R)	AGGCAGGAAGGGTCAGGACG	
NRL (2D)	AGAGGGACTTGGTGAAGAG	551
NRL (2R)	AGCTCCCTTCTCTCTTG	
OFD1 (15D)	GGGACCCTGTTGTTTACTGTG	368
OFD1 (15R)	TGGCTTTTCCCCTAAAACAA	
PDE6A (8D)	CCTTGACAAGAACATGGTG	374
PDE6A (8R)	AGGCCAGAAAGCAAAGAGTG	
PDE6B (10D)	GAGACCCACACAGAAGCAC	577
PDE6B (10R)	GACCTGCCTCTGCTGCAC	
PDE6B (11D)	TTGACAGCACCTTCTCTAGC	297
PDE6B (11R)	CACACACAGCACCAACATCC	
PDE6B (12D)	CTGAGGTGTCTGAGGCTTGG	392
PDE6B (12R)	GCCCTCTAAACTTCTGTGG	
PDE6B (13-14D)	ACTGTGAAGTCAGCCACAGG	699
PDE6B (13-14R)	CCCACAGTGCTGGAGTACG	
PDE6B (15D)	CCATGATTGCACCACTGC	356
PDE6B (15R)	CACACACCCAGTGCTCACC	
PDE6B (16-17D)	GAGCAGCAGGCGGATTAG	744
PDE6B (16-17R)	AGGGCTACAGACCAATGCAG	
PDE6B (16-17iR)	AGGTGGGAGCAAGTGTGG	

Gen (exón)	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)
PDE6B (18-19D)	GGGCAACAGAGCAAGACTCC	666
PDE6B (18-19R)	ACCCACAGACCTCAGAACC	
PDE6B (1D)	TACTCCCAGCCTTCATTCC	768
PDE6B (1R)	GGATCCGAGCTGACCCTTAG	
PDE6B (20D)	TCCATGAGCACATCTGAGTGA	269
PDE6B (20R)	GAGTCCACGCGACTCCAG	
PDE6B (21D)	CGAGGTTTCTCCCTTCACAG	536
PDE6B (21R)	TTTCAGTCCGGGTTTGCTAC	
PDE6B (22aD)	GGGTTGGTAGAGGTCACACC	400
PDE6B (22aR)	ACGAGAATCGCTTGAACCTG	
PDE6B (22bD)	TGGAGTCTTGCTCTGTCACC	490
PDE6B (22bR)	CCTGAGCATGTGTGTTTTCC	
PDE6B (22cD)	ACCACTGGGAGACCTTTGAA	365
PDE6B (22cR)	CTGCACTGCCCTCCTGGT	
PDE6B (2D)	CCCCACAGAGCTTGACG	338
PDE6B (2R)	GCAGGTAAGAGGTGGATGC	
PDE6B (3D)	AGCTTGTGTGTGCCAATCC	397
PDE6B (3R)	CATGGAGCCCTCCTCTCC	
PDE6B (3'D)	CAGAACATCAGCCAAACC	479
PDE6B (3'R)	AGAGTGAAGCATTGCTGACG	
PDE6B (4D)	GGCAGGTGGTCAGATCAGG	353
PDE6B (4R)	ATTCCTGGGCAGAGAAGAGG	
PDE6B (4-5 D)	GCCACCAATCAGGGTCTG	571
PDE6B (4-5 R)	AGTTCCACCTCCCTAAACC	
PDE6B (6D)	GCACGGTTACGTGTGTGG	296
PDE6B (6R)	GACTGCACCGTGGGAAGC	
PDE6B (7-8D)	TGCACACAGACATCCAGTCC	522
PDE6B (7-8R)	AAACGAATTCATTCATCATCG	
PDE6B (9D)	AGAGAGGGAATGCAGAGAGC	394
PDE6B (9R)	ACACAGCCGAATGCTTGG	
PDE6C (1D)	CTGCCTCAGGTAGTGCTCTG	657
PDE6C (1R)	TGCCAAACTAATGCCACAAG	
PDE6C (15D)	AATTGAGTGAGGAGGGAGAAG	378
PDE6C (15R)	GCTACTTCCAACCTGGCTGTTC	
PDE6H (2D)	TCCATTAAGTGCCTGCATTG	592
PDE6H (2R)	GTAAATTCGGCCACAGACC	
PITPNM3 (6D)	CTGCTTCTCTGGCCTCAGTC	499
PITPNM3 (6R)	TCTGACACCCAGAGAGTCC	
PITPNM3 (13D)	AGTCTGTGCAATGGGAGACC	380
PITPNM3 (13R)	GTAGGTGCTCCAATGCCTTC	
POC1B (11D)	CCCTCAGATCAGTGTATGGAAAG	577
POC1B (11R)	CCCTGCTCTGCTAGTTCTGC	
PROM1 (11D)	GCTCACAGCTTGCTGTTTTG	479
PROM1 (11R)	GGCCTCCTTGTAACAATTTGC	
PROM1 (12 D)	CTCCAGCCTTAGTCCAGCAG	398
PROM1 (12 R)	CAAGGAAGTCCCATCACAG	
PROM1 (18D)	CAGCCCTCCTGGCTACAC	295
PROM1 (18R)	TGGGACCTATGAGAGATGAGC	
PRPF3 (11D)	GCAAATGCTGAAGTGATTGG	631
PRPF3 (11R)	ATTCTGCCTCAAGCACTTGG	
PRPF3 (7D)	ATGCAGTCTCCTTGTTGG	682
PRPF3 (7R)	GAACCATCACGAAACCATCC	
PRPF4 (10D)	TCATTTGGATCTTGGAAACAGG	506
PRPF4 (10R)	AATCCCTGCAGCCCAAG	
PRPF6 (21 D)	GCTCCTTTGAGGAACACACC	571
PRPF6 (21 R)	GAGGCTTCTGTCCAAGCAAG	
PRPF8 (4-5D)	GAGGCAGGGTTTCTGGTTAG	685
PRPF8 (4-5R)	CCTTCTGCATTTCCAGAACTC	
PRPF8 (43D)	GGATAGCAGTAGGGATAAGG	519

Gen (exón)	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)
PRPF8 (43R)	TCAGGATGACAAGCCATCAG	
PRPF31 (2-3 D)	GAAGGACCAGGGTCTTCTGG	547
PRPF31 (2-3 R)	GATATACCCAGCCACAAGCAG	
PRPF31 (11D)	GGTAGGCATGGGGTTCATG	365
PRPF31 (11R)	CAGCGGAGACACAGGCTC	
PRPF31 (14D)	CCACCCTCTCCCTCTAGACC	495
PRPF31 (14R)	AGAGGGCTTTTTCTTCTGG	
PRPH2 (1D)	TGGGCTCGTTAAGTTTGG	780
PRPH2 (1R)	TACGCAGCAATAAGTTGTGC	
PRPH2 (2D)	CAAATATATACCAAGTGTGCG	480
PRPH2 (2R)	CTGTTTCCAAAGAGGGAGG	
RBP3 (1a D)	GATACCCAGGGTTGATGTGC	489
RBP3 (1a R)	TGGGCTCATAGGAGATGACC	
RBP3 (1b D)	AAGAGCCATGAGATTCTGAGC	497
RBP3 (1b R)	CCGTACCTTTCTCCAGGAC	
RBP3 (1c D)	TGCACGTGGACACTATCTACAAC	491
RBP3 (1c R)	CATGCTGGCCAAGTGCTG	
RBP3 (1d D)	TGGCCATCCTCACTCTGC	588
RBP3 (1d R)	GGCGATCATAGGTGGTGAAG	
RD3 (2D)	GGTCCCAGCTCTCCTCTCTC	500
RD3 (2R)	TCCCTGACTCTAGTCCCTGGTG	
RDH12 (5D)	CCCGAAGTGGCAATATGTTT	466
RDH12 (5R)	TCTACCCACCATCCTCTTGC	
RDH12 (8D)	TTCCTGAGTCCCTCCTTCTC	394
RDH12 (8R)	TCATCAGGCACAAACTCAGC	
RDH5 (2D)	ATGGTTGGCCAATTATCTGC	566
RDH5 (2R)	TAGCTTACCACAGCCCTTGC	
RDH5 (4D)	CCCCTTGACCCCTTGTC	438
RDH5 (4R)	CATCCTGTTACCCCTCAACC	
RDH5 (5D)	GGGACTGAGGGTGACAAGC	481
RDH5 (5R)	TCCACTGGGCACATTTCTG	
RGS9 (18D)	TAGGAGGCAGCCATATCAGG	771
RGS9 (18R)	GAATATCTTCCAGTGGCCAAG	
RHO (1D)	AGAACCAGAGTCATCCAGC	634
RHO (1R)	GGCTATCACCATGAATGGTG	
RHO (2D)	TGGTTGCCTTCTAGCTACC	345
RHO (2R)	ACACTACTGGGTTTGAGTCC	
RHO (3-4D)	CATGCAGACGTTTATGATCC	769
RHO (3-4R)	AAGACTGCTGCCAGTAACC	
RHO (5D)	AGCTGGATTTGAGTGGATGG	356
RHO (5R)	CTTCGTTCACTTCTGCACAGG	
RIMS1 (6a D)	TGAAATGATTTAAGACTGGAATGAG	591
RIMS1 (6a R)	CTGGTCTCCGCAGTTCTCTC	
RIMS1 (14D)	GCGACACATCATTTAGAATGTACC	568
RIMS1 (14R)	TACCAATGCGGTTTCATCATC	
ROM1 (2D)	TGAAGATGTGAATTATGCTTGG	481
ROM1 (2R)	AGTCAGCGGTTCCAAGAGG	
RP1 (1b D)	ACCCTCGCTCCTTTAAGTCC	592
RP1 (1b R)	ATCGGAGCACACACTCAC	
RP1 (3D)	TTTGGAAAGGAGTGGCAAAG	528
RP1 (3R)	AAACTGGTCATTGAAGCATGG	
RP1 (4aD)	TGCTGCCTCTTCTTTGG	454
RP1 (4aR)	TGCTGCAAGCTTTAAACCAG	
RP1 (4bD)	AGACGGCACTATGACAGTTGAG	496
RP1 (4bR)	CCCCTTTCCCTTTCTTAC	
RP1 (4cD)	CTGTGATTGGCAGTGTGACC	536
RP1 (4cR)	CCAGTTTTGTTGTCCAATACCA	
RP1 (4dD)	GGTATTGGACAACAAAACCTGG	430
RP1 (4dR)	CAAAGTATCCCTCCTTTAAGG	

Gen (exón)	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)
RP1 (4eD)	CCATTGGTGATATATTTGATC	473
RP1 (4eR)	TATGTCTTCCTCTTCCCAAATG	
RP1L1 (2aD)	TGGAGTGGAGCACATTTGG	700
RP1L1 (2aR)	CAGGAGATCTGAGGCTTTGC	
RP1L1 (2bD)	GATGGAGGCTGCTACCTCTG	461
RP1L1 (2bR)	GTGTCTCCATGCTGTTCCACC	
RP1L1 (3D)	TGTGCAGAAATCAGGACAGG	344
RP1L1 (3R)	TTTCCTGAATTACCTGGAAGG	
RP1L1 (4aD)	AGCAGTGTGTTTCCCAACC	458
RP1L1 (4aR)	GTGGACGCTTCCTTCTTCTG	
RP1L1 (4bD)	CAGCTTGAGCCTGGTTTGG	592
RP1L1 (4bR)	GGCTCACTTTCTTCCTCACG	
RP1L1 (4cD)	TGACCAAGATCCAGGACAGA	648
RP1L1 (4cR)	GGTCTCCACTTCAACCTCCA	
RP2 (2D)	CCTGGCAGCCAATAGTCC	848
RP2 (2R)	TTGCCTGTATTTCCAATAGCC	
RP2 (5D)	GACTCTTATTCAGTAGCTTCC	651
RP2 (5R)	CAGAGAAACAAAACCTGCAAG	
RP9 (6D)	AAGGACTGTGGAAACATGCAG	547
RP9 (6R)	CTCTCGGCGTCTCTATCCTG	
RPE65 (4-5D)	TCAAGGGACATTGTGTCTGC	698
RPE65 (4-5R)	AGAGGCAATCAGTGCAGTCC	
RPE65 (8D)	GCACTGTTGATTCTTGTAAC	294
RPE65 (8R)	CATTATTAACACATCTTCTTC	
RPGR (12D)	TCCCTGACATGAGGTTAAAGG	441
RPGR (12R)	TCCGCTCTCAATTGCCATAC	
RPGR (13D)	CTATCTGAACTGTTTTCCCTT	369
RPGR (13R)	GCAAAATGGAGGTTATCTAC	
RPGR (3D)	TGCTTTGTGGTGACCTCATC	394
RPGR (3R)	CATTACTTCCTTTGTGGTCC	
RPGR (8D)	CCCAGAGGCACTTAACCTTC	505
RPGR (8R)	ATCATCGGCCTATTGTGAGG	
RPGR (ORF15_D3)	GACTAAACCCATAATATCCAAATCCA	1211
RPGR (ORF15_R8b)	TCCTTCCTCCTCTTCCCCCTCCA	
RPGR (ORF15-F1)	AGTTCAGGAGCAGAACACTGG	1360
RPGR (ORF15_R9)	CCCTGTGTGTTAGTAACTGAC	
RPGR (ORF15_F4)	GTGAAAAGGAGGAAGGAGAG	TGAGGGGGAAGAGGAGGAAGG
RPGR (ORF15_F7b)	TGAGGGGGAAGAGGAGGAAGG	
RPGR (ORF15_F8b)	TGGGAGGGGGAAGAGGAGGAAGGA	GGAAATGGGAAAGAGCAGAGGTC
RPGR (ORF15_F10)	GGAAATGGGAAAGAGCAGAGGTC	
RPGR (ORF15_R4)	CTCTCCTCCTCCTTTTCCAC	ACTGGCCATAATCGGGTCACAT
RPGR (ORF15_R5)	ACTGGCCATAATCGGGTCACAT	
RPGR (ORF15_R6)	GCCAAAATTTACCAGTGCCTCCTAT	CCTTCCTCCTCTTCCCCCTCA
RPGR (ORF15_R7b)	CCTTCCTCCTCTTCCCCCTCA	
RPGRIP1 (13D)	GTCTGCAAGGAAATCAAACC	394
RPGRIP1 (13R)	ATGAGAGGCACCCTTCTTGA	
RPGRIP1 (17D)	AGGTGCTGACAAATGCTCAC	450
RPGRIP1 (17R)	CTGGTCTTGAACCTGACC	
RPGRIP1 (14D)	TGCTTTTCTTTTGAATCACG	677
RPGRIP1 (14R)	CACCAGAAAAGCAACTGTAGG	
SAG (2D)	CATAACTAGGATGTTCTTGAC	274
SAG (2R)	GATGTTGATCATGACTACAC	
SAG (8D)	CTCCATGGGGAGCATTCC	327
SAG (8R)	GGGGCTGGTGAAGAGAGG	
SAG (5D)	GTGTTGCTGCCATTCC	399
SAG (5R)	TTCAAGGGTGCAATTTCCAG	
SAG (11D)	AGTCTCAGGAGGAGGCTGTG	584
SAG (11R)	CACACTACACACGCCAGACC	
SEMA4A (8-9D)	CGAGGAAGCCTGTGTGTCC	825

Gen (exón)	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)
SEMA4A (8-9R)	GCTGGCTCATGTCAATTCC	
SEMA4A (8D)	CTCCAGGGCCAAACCAAC	586
SEMA4A (8R)	GGCCTTCAGGAAGGTGGTC	
SEMA4A (9D)	TCGGGGCGCCCCGGGGCGC	297
SEMA4A (9R)	TTCCTGCCTCCGCTCACGAGC	
SLC7A14 (7a D)	GTGGAGCAGGACCAGGAG	487
SLC7A14 (7a R)	TCATTGTCTCCCAAGGATGG	
SLC7A14 (7bD)	GGAGCACACCAAGAAGAAGG	473
SLC7A14 (7bR)	TCAGAACAACCAGAAGGATGG	
SNRNP200 (16D)	TCAGGAAAGACTGGGCAAAG	508
SNRNP200 (16R)	TCCTTCCAGTGGCTATAGGTTT	
SNRNP200 (31 D)	TTTGGCATCTCAGGTTTTTCC	568
SNRNP200 (31 R)	TGGAATAGGGCAGCAGGTAG	
SNRNP200 (5D)	TTTCCTGAGGAGAGGTAGTCG	288
SNRNP200 (5R)	GCCCAAGTCTGAAACCCATAC	
SPATA7 (5D)	TGTTCCATTTATTACTCTAACAAGACC	373
SPATA7 (5R)	GTGACAGAGGCCTGAACAGC	
TOPORS (3b D)	ACAACCTCCACCGGATAGTGG	480
TOPORS (3b R)	AAAAGGAGATCGGGCAAAC	
TTC8 (13D)	CATCCAGGTTTGGCAGTAGTC	473
TTC8 (13R)	AATCCACGCCTGTCAGATTC	
TULP1 (5D)	CCCTCATTCTTCTGGGAAGG	557
TULP1 (5R)	TCTGTCCTCCTCTGCCTCAC	
USH2A (13D)	TGCATTAAGCATTTTTCTTTGC	994
USH2A (13R)	AAATTTGTAGAAGCCACAAACC	
USH2A (22D)	GAATGTGGGCATAAGATTCC	576
USH2A (22R)	CCACAGATTCTCAGTCAGACC	
ZNF408 (5c D)	AGCGAGACCTCAAAGAGCAC	491
ZNF408 (5c R)	ACACTGGGGACAGGGAAAG	

Tabla VIII.3 Cebadores para la identificación de mutaciones intrónicas profundas no incluidas en el panel.

Gen (intrón)	Secuencia (5'-3')	Inserto (pb)
ABCA4 (i30D)	GCAGGGAGGAGCAAATAATG	434
ABCA4 (i30R)	ACAGACCGCGTGGGAAGTAAG	
ABCA4 (i36D)	CCAACATGAGCCTCCATTTT	552
ABCA4 (i36R)	CTCCCACCTCAGATGTCCAC	
PROM1 (i18D)	CATTCAGGTTAACCCTCTTGC	226
PROM1 (i18R)	TGTTAGCCAAGATGGTCTCG	
USH2A (i27D)	AGAGTACTGCCAGACTTCAC	377
USH2A (i27R)	ACATCAGCCTACAGAAGAGC	
USH2A (i44D)	ACTCGTCGCTCATTAGCAAG	345
USH2A (i44R)	TAGTCGTCAGGGATTGACAC	
USH2A (i50D)	TGTAGCCCCTAATGACTG	428
USH2A (i50R)	CACTTCTACACAACGCATCTG	
USH2A (i64D)	ACTTGCTTTTCTTCCCAAT	184
USH2A (i64R)	TTCTATGTGGGATCTCTGCTG	

Tabla VIII.4 Secuencias de los cebadores utilizados en la construcción de los minigenes.

Gen (exón)	Secuencia (5'-3')	Inserto (pb)
ABCA4(20D)_XhoI	AAGAATCTCGAGGGGAGCACCATGAAACAAGT	593
ABCA4(20R)_NheI	AAGAATGCTAGCGGAGGAGCCCTCAGCTCT	
ABCA4(45D)_XhoI	AAGAATCTCGAGCGAGACCCACTGTCTTGCTC	676
ABCA4(45R)_NheI	AAGAATGCTAGCACAGGAGACATCCTGGGAAC	
BEST(6D)_XhoI	AAGAATCTCGAGCTGAGGGTCTTCCGAGAGC	654

BEST(6R)_NheI	AAGAATGCTAGCTCAGCTTCCCAAAGTGCTG	
CACNA2D4 (23D)_XhoI	AAGAATCTCGAGTGAGGTCAGGAGGTTCTCC	566
CACNA2D4 (23R)_NheI	AAGAATGCTAGCCAACCCAGAGAAAGGAGCTG	
CNNM4(6 D)_XhoI	AAGAATCTCGAGTGTGGTTGATTTGTTTTGG	688
CNNM4(6 R)_NheI	AAGAATGCTAGCAGCCACATGCACACCTGTAG	
FSCN2 (3D)_XhoI	AAGAATCTCGAGCATCACCTGCACCATCACTC	557
FSCN2 (3R)_NheI	AAGAATGCTAGCTCCCAGCAGCGGAGATAAG	
IDH3B(7D)_XhoI	AAGAATCTCGAGATATGCGGCTGAGGTAGGTG	800
IDH3B(7R)_NheI	AAGAATGCTAGCTCCCATAGAGATTGGGCATC	
MAK(8D)_XhoI	AAGAATCTCGAGCGCATTGTTTCTAACTCTCAG	576
MAK(8R)_NheI	AAGAATGCTAGCTTTTCTGCATTTCTCCAATG	
MERTK(9D)_NheI	AAGAATGCTAGCGGGTCTCACTCTGTTACCTAGC	889
MERTK(9D)_XhoI	AAGAATCTCGAGGTGTGACTGGCGTATTGTGC	
PRCD (1D)_XhoI	AAGAATCTCGAGTTAGAGTGGCAGCTCCTTGC	979
PRCD (1R)_NheI	AAGAATGCTAGCTGGAGATGAGAGGCACAGC	
PRPF8(4D)_XhoI	AAGAATCTCGAGTGGCCTGACAGACATGAGAC	950
PRPF8(4R)_NheI	AAGAATGCTAGCAAGGCCACCTCAAGTAAGC	
PRPF31(3 D)_XhoI	AAGAATCTCGAGTAGCAAGGTGGCGGTCATAG	835
PRPF31(3 R)_NheI	AAGAATGCTAGCGTCTGGGAAACCTCAAGCTG	
RHO(1D)_XhoI	AAGAATCTCGAGGGACAGACAAGTCATGCAG	945
RHO(1R)_NheI	AAGAATGCTAGCGACAAGCGCATATTGCTCCA	
RIMS1 (14D)_XhoI	AAGAATCTCGAGGCGACACATCATTTAGAATGTACC	647
RIMS1 (14R)_NheI	AAGAATGCTAGCTCCATGAATATGTGCCTTG	
RPGRIP1(7D)_XhoI	AAGAATCTCGAGGAAATGGTGTGAATGATTGCAG	497
RPGRIP1(7R)_NheI	AAGAATGCTAGCAATTTGCTCCAGCAATAGGC	

Tabla VIII.5 Cebadores del vector pSPL3.

Identificación	Secuencia (5'-3')
pSPL3_D	CATGCTCCTGGGATGTTGATG
pSPL3_R	ACTGTGCGTTACAATTTCTGG
SD6_D	TCTGAGTCACCTGGACAACC
SA2_R	ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC

Tabla VIII.6 Regiones codificantes con una cobertura media <50x.

Región	Gen	Cobertura media
chr2:182402740-182403140	<i>CERKL</i>	36
chr6:35479283-35479723	<i>TULP1</i>	16
chr6:66112194-66112674	<i>EYS</i>	48
chr7:33134653-33135237	<i>RP9</i>	28
chr7:128045645-128046085	<i>IMPDH1</i>	50
chr10:95396585-95396985	<i>PDE6C</i>	40
chr10:95422138-95422578	<i>PDE6C</i>	28
chr11:119210760-119211240	<i>C1QTNF5</i>	32
chr12:88443950-88444390	<i>CEP290</i>	46
chr12:88449183-88449663	<i>CEP290</i>	49
chr12:89853234-89853674	<i>POC1B</i>	42
chr12:89919474-89919834	<i>POC1B</i>	16
chr14:88882881-88883361	<i>SPATA7</i>	50
chr17:6459581-6459941	<i>PITPNM3</i>	20
chr17:58227224-58227624	<i>CA4</i>	24
chrX:13785104-13785544	<i>OFD1</i>	42
chrX:38186426-38186786	<i>RPGR</i>	21

ANEXO 5. Variantes identificadas

Tabla VIII.7 Variantes con una MAF<0,01 identificadas en cada paciente y clasificadas según la ACMG.

ID familia	ID paciente	Dx	Gen:transcrito	Nucleótido	Proteína	Estado	Clasif.	Ref
fRPN-8	RPN-60	RP	PDE6B:NM_000283	c.G496A	p.E166K	het	PB	(Neveling et al. 2013)
			RP1L1:NM_178857	c.C2991G	p.D997E	het	PB	Novel
			RPGR:NM_000328	c.1506+1G>A		het	P	Novel
			SEMA4A:NM_001193301	c.A829G	p.K277E	het	SI	Novel
fRPN-38	RPN-104	ACL	AIPL1:NM_014336	c.97_104dup	p.(Phe35Leufs*2)	hom	P	(Testa et al. 2011)
			ELOVL4:NM_022726	c.T800C	p.I267T	het	PB	(Rivolta et al. 2003)
			FAM161A:NM_001201543	c.A812G	p.K271R	het	PB	Novel
			IQCB1:NM_001023570	c.1518_1519del	p.(His506Glnfs*13)	het	P	(Otto et al. 2005)
			RIMS1:NM_014989	c.2544+4A>G		het	SI	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.G704C	p.R235T	het	PB	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.A4046T	p.Q1349L	het	PB	Novel
fRPN-39	RPN-106	DMB	BEST1:NM_004183	c.T602C	p.I201T	het	PP	(Lotery et al. 2000)
			BEST1:NM_004183	c.637-2_637del	p.Glu213del	het	PP	Novel
			CABP4:NM_145200	c.A214C	p.N72H	het	PB	Novel
			CNGA1:NM_001142564	c.C2123T	p.T708I	het	SI	Novel
			PRPF3:NM_004698	c.G830A	p.R277H	het	SI	Novel
fRPN-43	RPN-113	RP	CERKL:NM_001030311	c.C847T	p.R283X	hom	P	(Tuson, Marfany, and González-Duarte 2004)
			PDE6C:NM_006204	c.G1755T	p.K585N	het	PB	(Langlo et al. 2016)
fRPN-45	RPN-116	RP	ABCA4:NM_000350	c.G5882A	p.G1961E	het	PP	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
			IQCB1:NM_001023570	c.A1549T	p.N517Y	het	SI	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.C6545A	p.A2182D	het	PB	Novel
			RPGR:NM_001034853	c.2357_2375del	p.(Lys786Thrfs*23)	hem	P	(D. Y. Wang et al. 2005)
			SLC7A14:NM_020949	c.G1129A	p.V377I	het	PB	Novel
fRPN-50	RPN-125	STGD	ABCA4:NM_000350	c.G3386T	p.R1129L	het	P	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
			ABCA4:NM_000350	c.G3988T	p.E1330X	het	P	(Rosa Riveiro-Alvarez et al. 2013)
			CNGA3:NM_001298	c.C440G	p.T147R	het	PB	Novel
			CNGA3:NM_001298	c.G1618A	p.V540I	het	SI	(A. A H J Thiadens et al. 2010)
			CNGB3:NM_019098	c.C2420G	p.A807G	het	SI	Novel
			DTHD1:NM_001170700	c.C920T	p.T307I	het	SI	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.A3971G	p.E1324G	het	PB	Novel

ID familia	ID paciente	Dx	Gen:transcrito	Nucleótido	Proteína	Estado	Clasif.	Ref
			RPGR:NM_001034853	c.G2148T	p.E716D	het	PB	Novel
fRPN-51	RPN-129	STGD	ABCA4:NM_000350	c.C1804T	p.R602W	het	P	(Lewis et al. 1999)
			ABCA4:NM_000350	c.G982T	p.E328X	het	P	(Fishman et al. 2003)
	RPN-544	STGD	BBS1:NM_024649	c.C751G	p.L251V	het	SI	Novel
			ABCA4:NM_000350	c.G5882A	p.G1961E	het	PP	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
			ABCA4:NM_000350	c.G982T	p.E328X	het	P	(Fishman et al. 2003)
fRPN-58	RPN-148	DCB	C21orf2:NM_004928	c.96+1G>A		hom	P	(L. Huang et al. 2016)
			EYS:NM_001142800	c.G5510C	p.W1837S	het	PB	(Audo et al. 2010)
			PDE6A:NM_000440	c.1113+1G>A		het	P	Novel
			PDE6C:NM_006204	c.G1926T	p.L642F	het	SI	Novel
			PRPF4:NM_004697	c.A233G	p.H78R	het	B	Novel
			RIMS1:NM_014989	c.T2803C	p.S935P	het	PB	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.G5598T	p.E1866D	het	PB	Novel
			RPGRIP1:NM_020366	c.G1767T	p.Q589H	het	PB	(Fernández-Martínez et al. 2011)
			SNRNP200:NM_014014	c.G5933C	p.G1978A	het	B	Novel
						CNGB3:NM_019098	c.C1432T	p.R478X
fRPN-66	RPN-170	ACRM	CNGB3:NM_019098	c.1148delC	p.T383fs	het	P	(Kohl et al. 2000)
			EYS:NM_001142800	c.G7941C	p.E2647D	het	SI	Novel
			ZNF513:NM_144631	c.G1483A	p.G495S	het	PB	Novel
fRPN-68	RPN-173	RP	ADAMTS18:NM_199355	c.C2500T	p.P834S	het	PB	Novel
			CACNA1F:NM_005183	c.2466_2474dup	p.E823_E825dup	het	SI	Novel
			CNGB3:NM_019098	c.852+1G>C		het	P	(Mayer et al. 2017b)
			IMPG1:NM_001563	c.A1673G	p.Y558C	het	SI	Novel
			RP9:NM_203288	c.664delT	p.X222D	het	B	(Keen et al. 2002)
			USH2A:NM_206933	c.G2276T	p.C759F	het	PP	(Rivolta et al. 2000)
			USH2A:NM_206933	c.G130A	p.G44R	het	PP	(García-García et al. 2011)
fRPN-70	RPN-179	RP	ADAMTS18:NM_199355	c.C3157T	p.R1053W	het	PB	Novel
			ADAMTS18:NM_199355	c.A2752G	p.K918E	het	SI	Novel
			DTHD1:NM_001170700	c.G2246A	p.R749H	het	B	Novel
			MAK:NM_005906	c.G1759C	p.G587R	het	PB	Novel
			MERTK:NM_006343	c.C436G	p.Q146E	het	SI	Novel
			USH1C:NM_153676	c.G403A	p.V135I	het	PB	Novel
			CDH3:NM_001793	c.C2041T	p.R681W	het	SI	Novel
fRPN-71	RPN-188	RP	ELOVL4:NM_022726	c.G814C	p.E272Q	het	PB	Novel
			GDF6:NM_001001557	c.C746A	p.A249E	het	PP	(Tassabehji et al. 2008)
			RDH12:NM_152443	c.C295A	p.L99I	het	PP	(Perrault et al. 2004)

ID familia	ID paciente	Dx	Gen:transcrito	Nucleótido	Proteína	Estado	Clasif.	Ref
			RDH12:NM_152443	c.806_810del	p.(Ala269Glyfs*2)	het	P	(Janecke et al. 2004)
			RP1L1:NM_178857	c.G3901T	p.V1301L	het	PB	Novel
			RP9:NM_203288	c.G34A	p.A12T	het	PB	Novel
			RPGR:NM_001034853	c.2694_2696del	p.E899del	het	PB	Novel
fRPN-72	RPN-189	RP	BBS1:NM_024649	c.T616G	p.L206V	het	SI	(Janssen et al. 2011)
			RP1L1:NM_178857	c.G389A	p.R130Q	het	PB	Novel
			ABCA4:NM_000350	c.G6148C	p.V2050L	het	SI	(Allikmets et al. 1998)
			CACNA1F:NM_005183	c.2466_2474dup	p.E823_E825dup	het	SI	Novel
fRPN-74	RPN-191	RP	CNGB1:NM_001297	c.C595T	p.R199C	het	PB	Novel
			CNGB1:NM_001297	c.G232A	p.A78T	het	PB	Novel
			RP9:NM_203288	c.G34A	p.A12T	het	PB	Novel
			TULP1:NM_003322	c.C659T	p.P220L	het	SI	Novel
			CNGA3:NM_001298	c.C458T	p.T153M	het	PB	(Kohl et al. 1998)
fRPN-84	RPN-214	RP	CRB1:NM_201253	c.T487G	p.C163G	het	PP	Novel
			EYS:NM_001142800	c.G8834A	p.G2945E	het	PP	(Barragán et al. 2010)
			EYS:NM_001142800	c.6714delT	p.I2239Sfs*16	het	P	(R. W. J. Collin et al. 2008)
			CACNA2D4:NM_172364	c.T2987C	p.F996S	het	PB	Novel
			CDHR1:NM_001171971	c.A2159C	p.H720P	het	PB	Novel
			CNGA3:NM_001298	c.C143T	p.P48L	het	PB	(Nishiguchi et al. 2005)
fRPN-85	RPN-217	RP	EYS:NM_001142800	c.G5510C	p.W1837S	het	PB	(Audo et al. 2010)
			RP1L1:NM_178857	c.G4444A	p.G1482R	het	PB	Novel
			SNRNP200:NM_014014	c.G4165A	p.V1389I	het	B	Novel
			USH2A:NM_206933	c.G14074A	p.G4692R	het	PB	(Leijendeckers et al. 2009)
			CNGA3:NM_001298	c.C616A	p.L206M	het	SI	Novel
fRPN-93	RPN-226	RP	CNNM4:NM_020184	c.273_275del	p.S92del	het	SI	Novel
			EYS:NM_001142800	c.A4093G	p.K1365E	het	PB	(Messchaert et al. 2018)
			RP1L1:NM_178857	c.G4444A	p.G1482R	het	PB	Novel
			SLC7A14:NM_020949	c.G1129A	p.V377I	het	PB	Novel
			C2orf71:NM_001029883	c.947delA	p.(Asn316Metfs*7)	het	P	(R. W. J. Collin et al. 2010)
			CNGA3:NM_001298	c.C143T	p.P48L	het	PB	(Nishiguchi et al. 2005)
fRPN-97	RPN-230	RP	CNGA3:NM_001298	c.G1280A	p.R427H	het	PP	Novel
			PDE6C:NM_006204	c.T413C	p.L138S	het	SI	Novel
			RPGR:NM_001034853	c.2442_2445del	p.(Gly817Lysfs*2)	het	P	(Vervoort et al. 2000)
			TCHHL1:NM_001008536	c.C1205T	p.T402I	het	PB	Novel
fRPN-99	RPN-246	RP	RP1:NM_006269	c.C2029T	p.R677X	het	P	(Pierce et al. 1999)
			RP1L1:NM_178857	c.C6545A	p.A2182D	het	PB	Novel

ID familia	ID paciente	Dx	Gen:transcrito	Nucleótido	Proteína	Estado	Clasif.	Ref
			RPGRIP1:NM_020366	c.A3358G	p.I1120V	het	PB	(Vallespin et al. 2007)
fRPN-100	RPN-234	DRIT	C1QTNF5:NM_015645	c.C563T	p.P188L	het	PP	Novel
			CHM:NM_000390	c.C116T	p.S39L	hem	SI	Novel
			CRB1:NM_201253	c.T614C	p.I205T	het	SI	(Bernal et al. 2003)
			IQCB1:NM_001023570	c.G708C	p.L236F	het	SI	Novel
			IQCB1:NM_001023570	c.T658A	p.S220T	het	SI	Novel
			PRPF6:NM_012469	c.T1158G	p.I386M	het	PB	Novel
fRPN-108	RPN-253	RP	CDHR1:NM_033100	c.G2431C	p.V811L	het	SI	Novel
			FSCN2:NM_001077182	c.C1172T	p.P391L	het	PB	Novel
			FSCN2:NM_001077182	c.C611G	p.P204R	het	SI	Novel
			PITPNM3:NM_031220	c.C1511T	p.S504L	het	PB	Novel
			RHO:NM_000539	c.G316A	p.G106R	het	P	(Inglehearn et al. 1992)
fRPN-110	RPN-258	RP	ABCA4:NM_000350	c.C3113T	p.A1038V	het	P	(Allikmets, Singh, et al. 1997)
			CNGB1:NM_001297	c.A2957T	p.N986I	het	PP	(Simpson et al. 2011)
			CNGB1:NM_001297	c.G1822T	p.E608X	het	P	Novel
			EYS:NM_001142800	c.C9214A	p.P3072T	het	PB	Novel
			EYS:NM_001142800	c.A2234G	p.N745S	het	PB	(Audo et al. 2010)
			RP1:NM_006269	c.G2833T	p.V945L	het	PB	Novel
fRPN-116	RPN-268	RP	CACNA1F:NM_005183	c.A2237C	p.N746T	hem	PB	(L. Zhao et al. 2015)
			RBP3:NM_002900	c.G1037A	p.R346H	het	PB	(den Hollander et al. 2009)
			RP1L1:NM_178857	c.C5821T	p.Q1941X	het	SI	Novel
			SAG:NM_000541	c.A548G	p.H183R	het	SI	Novel
fRPN-122	RPN-278	STGD	ADAMTS18:NM_199355	c.A389T	p.D130V	het	SI	Novel
			LCA5:NM_181714	c.2040_2051del	p.V681_A684del	het	SI	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.G5598T	p.E1866D	het	PB	Novel
fRPN-123	RPN-279	RP	ABCA4:NM_000350	c.G455A	p.R152Q	het	SI	(Zobor et al. 2018)
			TTC8:NM_144596	c.A284G	p.K95R	het	PB	Novel
fRPN-125	RPN-282	DC	CRB1:NM_201253	c.A2576G	p.N859S	het	SI	Novel
			EYS:NM_001142801	c.A1798G	p.I600V	het	PB	Novel
			GDF6:NM_001001557	c.G1022A	p.R341H	het	SI	Novel
			GUCY2D:NM_000180	c.G2513A	p.R838H	het	P	(Weigell-Weber et al. 2000)
			RP1L1:NM_178857	c.G1081A	p.E361K	het	SI	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.G4112C	p.G1371A	het	PB	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.A4046T	p.Q1349L	het	PB	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.A3914G	p.E1305G	het	PB	Novel
USH1C:NM_153676	c.C2191T	p.R731W	het	SI	Novel			

ID familia	ID paciente	Dx	Gen:transcrito	Nucleótido	Proteína	Estado	Clasif.	Ref
fRPN-126	RPN-283	STGD	USH2A:NM_206933	c.C5932T	p.P1978S	het	SI	(McGee et al. 2010)
			ABCA4:NM_000350	c.G3386T	p.R1129L	het	P	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
			ABCA4:NM_000350.2	c.4253+5G>A		het	P	(Rivera et al. 2000)
			CA4:NM_000717	c.C835T	p.R279C	het	SI	Novel
			EYS:NM_001142800	c.C281A	p.P94Q	het	PB	(Audo et al. 2010)
			KCNV2:NM_133497	c.C441A	p.D147E	het	SI	Novel
			USH2A:NM_206933	c.A7130G	p.N2377S	het	PB	(Garcia-Garcia et al. 2011)
fRPN-127	RPN-284	STGD	KIZ:NM_001163022	c.1450A>T	p.D484V	het	SI	Novel
			PDE6B:NM_000283	c.C793G	p.R265G	het	SI	Novel
			PRPF31:NM_015629	c.C182G	p.A61G	het	SI	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.G547C	p.G183R	het	SI	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.G2456A	p.G819D	het	SI	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.A2462C	p.H821P	het	PB	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.G5598T	p.E1866D	het	PB	Novel
TTC8:NM_144596	c.A1253G	p.Q418R	het	SI	Novel			
fRPN-128	RPN-285	RP	C21orf2:NM_004928	c.C316T	p.R106C	het	SI	Novel
			RPGR:NM_001034853	c.A1367G	p.Q456R	het	PB	(Breuer et al. 2002)
fRPN-129	RPN-286	DCB	POC1B:NM_172240	c.G1202A	p.C401Y	het	SI	Novel
			USH2A:NM_206933	c.A7130G	p.N2377S	het	PB	(Garcia-Garcia et al. 2011)
fRPN-130	RPN-287	DMB	USH2A:NM_206933	c.G12622A	p.D4208N	het	SI	Novel
			AIPL1:NM_014336	c.G971T	p.R324L	het	SI	(Wiszniewski et al. 2011)
			CNGA1:NM_001142564	c.304dupA	p.R102fs	het	PP	Novel
			FAM161A:NM_001201543	c.C197T	p.T66I	het	PB	(Langmann et al. 2010)
			PDE6C:NM_006204	c.G2082A	p.M694I	het	SI	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.G455A	p.R152Q	het	SI	(Zobor et al. 2018)
			EYS:NM_001142800	c.G5510C	p.W1837S	het	PB	(Audo et al. 2010)
fRPN-131	RPN-288	RP	FLVCR1:NM_014053	c.C595T	p.L199F	het	SI	Novel
			RBP3:NM_002900	c.G2626T	p.A876S	het	SI	Novel
			RP1:NM_006269	c.G3040C	p.D1014H	het	SI	Novel
			RP1:NM_006269	c.G4336A	p.E1446K	het	SI	Novel
			USH2A:NM_206933	c.C1390T	p.R464C	het	PP	(Seyedahmadi et al. 2004)
			USH2A:NM_206933	c.G12575A	p.R4192H	het	PP	(McGee et al. 2010)
			ABCA4:NM_000350	c.C2041T	p.R681X	het	P	(Maugeri et al. 1999)
fRPN-132	RPN-289	STGD	ABCA4:NM_000350	c.C184G	p.P62A	het	PP	Novel
			CDHR1:NM_001171971	c.C556T	p.H186Y	het	SI	Novel
			CNGB3:NM_019098	c.C2420G	p.A807G	het	SI	Novel

ID familia	ID paciente	Dx	Gen:transcrito	Nucleótido	Proteína	Estado	Clasif.	Ref
			NR2E3:NM_016346	c.C50T	p.A17V	het	PB	Novel
			RIMS1:NM_014989	c.1047_1049del	p.E349del	het	SI	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.G4865A	p.R1622Q	het	PB	Novel
			USH2A:NM_206933	c.G14074A	p.G4692R	het	PB	(Leijendeckers et al. 2009)
fRPN-133	RPN-290	STGD	ABCA4:NM_000350	c.C4457T	p.P1486L	hom	PP	(Lewis et al. 1999)
			C2orf71:NM_001029883	c.G2063A	p.C688Y	het	PB	(Audo et al. 2010)
			CNGB1:NM_001297	c.C1322T	p.A441V	het	PB	Novel
fRPN-134	RPN-291	STGD	ABCA4:NM_000350	c.T3311C	p.L1104P	het	PP	(Nassisi et al. 2018)
			ABCA4:NM_000350	c.G2588C	p.G863A	het	P	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
			ABCA4:NM_000350	c.G455A	p.R152Q	het	SI	(Zobor et al. 2018)
			CEP290:NM_025114	c.A2135G	p.N712S	het	SI	Novel
			CNGB3:NM_019098	c.1148delC	p.T383fs	het	P	(Kohl et al. 2000)
			PRPH2:NM_000322	c.C938T	p.P313L	het	PB	(Ruiz et al. 1997)
			SEMA4A:NM_001193301	c.C1265T	p.T422I	het	PB	Novel
			TULP1:NM_003322	c.G1486A	p.A496T	het	PB	(Gu et al. 1998)
fRPN-136	RPN-293	RP	IMPG2: NM_016247.3	c.534-4dup		het	SI	Novel
			RBP3:NM_002900	c.G1037A	p.R346H	het	PB	(den Hollander et al. 2009)
			RGS9:NM_003835	c.C1964T	p.T655I	het	SI	Novel
			USH2A:NM_206933	c.A7130G	p.N2377S	het	PB	(Garcia-Garcia et al. 2011)
fRPN-137	RPN-294	STGD	ABCA4:NM_000350	c.G3386T	p.R1129L	hom	P	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
fRPN-138	RPN-295	RP	ABCA4:NM_000350	c.G455A	p.R152Q	het	SI	(Zobor et al. 2018)
			PRPH2:NM_000322	c.C938T	p.P313L	het	PB	(Ruiz et al. 1997)
			RP1:NM_006269	c.A1595G	p.E532G	het	SI	Novel
			ZNF408:NM_024741	c.C1496T	p.P499L	het	SI	Novel
fRPN-139	RPN-296	RP	CLRN1:NM_174878	c.C401T	p.P134L	het	SI	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.C4825T	p.R1609C	het	PB	Novel
			RPGR:NM_001034853	c.2296_2299del	p.G766fs	hem	P	Novel
			SEMA4A:NM_001193301	c.G1973A	p.R658Q	het	SI	Novel
			SNRNP200:NM_014014	c.G4165A	p.V1389I	het	B	Novel
fRPN-140	RPN-297	RP	KCNV2:NM_133497	c.C979A	p.L327M	het	SI	Novel
			ROM1:NM_000327	ROM1 dup	p.?	het	PP	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.C4275A	p.D1425E	het	PB	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.G2899A	p.E967K	het	PB	Novel
fRPN-141	RPN-299	RP	C21orf2:NM_004928	c.G172T	p.V58L	het	SI	Novel
			C2orf71:NM_001029883	c.G1942A	p.A648T	het	PB	(Koyanagi et al. 2019)
			ELOVL4:NM_022726	c.G814C	p.E272Q	het	PB	Novel

ID familia	ID paciente	Dx	Gen:transcrito	Nucleótido	Proteína	Estado	Clasif.	Ref
			EYS:NM_001292009	c.G8130C	p.K2710N	het	PB	Novel
			IDH3B:NM_001258384	c.A532G	p.S178G	het	SI	Novel
			IMPG2:NM_016247	c.C1495A	p.P499T	het	PB	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.G5598T	p.E1866D	het	PB	Novel
			BEST1:NM_004183	c.978delC	p.H326fs	het	PP	Novel
			RBP3:NM_002900	c.G1923T	p.E641D	het	SI	Novel
fRPN-142	RPN-301	RP	RPGR:NM_001034853	c.247+2T>A		hem	P	Novel
			SNRNP200:NM_014014	c.594_597del	p.T198fs	het	P	Novel
			USH2A:NM_206933	c.G11008A	p.E3670K	het	PB	Novel
			C2orf71:NM_001029883	c.A1475C	p.E492A	het	SI	Novel
fRPN-143	RPN-303	RP	PRPF6:NM_012469	c.G2743A	p.V915M	het	SI	Novel
			RBP3:NM_002900	c.T2270G	p.V757G	het	SI	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.C6545A	p.A2182D	het	PB	Novel
fRPN-144	RPN-304	DM STGD- like	FSCN2:NM_012418	c.G1105A	p.G369S	het	SI	Novel
			GUCA1B:NM_002098	c.G584A	p.R195Q	het	SI	Novel
			PRPH2:NM_000322	c.G499A	p.G167S	het	P	(Testa et al. 2005)
			CACNA2D4:NM_172364	c.T2987C	p.F996S	het	PB	Novel
			KCNV2:NM_133497	c.183_185del	p.E64del	het	SI	Novel
			PDE6A:NM_000440	c.A763G	p.I255V	het	SI	Novel
fRPN-147	RPN-309	RP	PRPF3:NM_004698	c.C1477T	p.P493S	het	P	(Chakarova et al. 2002)
			RDH5:NM_002905	c.G261C	p.Q87H	het	SI	Novel
			TOPORS:NM_005802	c.A881G	p.H294R	het	SI	Novel
			USH1C:NM_153676	c.G946C	p.E316Q	het	PB	Novel
			C2orf71:NM_001029883	c.G1942A	p.A648T	het	PB	(Koyanagi et al. 2019)
			FAM161A:NM_001201543	c.A494G	p.Q165R	het	PB	Novel
fRPN-148	RPN-311	RP	GNAT2:NM_005272	c.G370A	p.V124M	het	SI	(Nishiguchi et al. 2005)
			IMPDH1:NM_000883	c.A967G	p.K323E	het	SI	(Yuko Wada et al. 2005)
			RIMS1:NM_014989	c.T3731C	p.L1244P	het	SI	Novel
			TOPORS:NM_005802	c.C74G	p.S25W	het	PB	(F. Wang et al. 2014)
			CACNA1F:NM_005183	c.G811A	p.G271R	hem	PB	(Neveling et al. 2012)
fRPN-150	RPN-313	RP	RDH12:NM_152443	c.C689G	p.P230R	het	P	Novel
			RDH12:NM_152443	c.C795A	p.S265R	het	P	Novel
			USH2A:NM_206933	c.G5837A	p.R1946Q	het	SI	Novel
fRPN-152	RPN-315	RP	CACNA1F:NM_005183	c.A2237C	p.N746T	hem	PB	(L. Zhao et al. 2015)
			CRB1:NM_201253	c.C866T	p.T289M	het	PB	(Lotery et al. 2001)
			GNAT2:NM_005272	c.G370A	p.V124M	het	SI	(Nishiguchi et al. 2005)

ID familia	ID paciente	Dx	Gen:transcrito	Nucleótido	Proteína	Estado	Clasif.	Ref
			IMPG1:NM_001563	c.G1982A	p.R661H	het	SI	Novel
			RBP3:NM_002900	c.A1795G	p.I599V	het	PB	(den Hollander et al. 2009)
			RGS9:NM_003835	c.A1275C	p.E425D	het	SI	Novel
			TULP1:NM_003322	c.371_394del	p.D124_E131del	het	SI	Novel
fRPN-153	RPN-317	STGD	ABCA4:NM_000350	c.G3386T	p.R1129L	het	P	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
			ABCA4:NM_000350	c.C1804T	p.R602W	het	P	(Lewis et al. 1999)
			ABCA4:NM_000350	Deletion ex. 16		het	P	Novel
			CNGA3:NM_001298	c.C458T	p.T153M	het	PB	(Kohl et al. 1998)
			PITPNM3:NM_031220	c.A503G	p.H168R	het	SI	Novel
fRPN-154	RPN-318	RP	CACNA1F:NM_005183	c.A2237C	p.N746T	het	PB	(L. Zhao et al. 2015)
			CRB1:NM_201253	c.G3992A	p.R1331H	het	SI	(Lotery et al. 2001)
			EYS:NM_001142800	c.C281A	p.P94Q	het	PB	(Audo et al. 2010)
			GUCA1B:NM_002098	c.G253A	p.V85M	het	PB	(Nishiguchi et al. 2005)
			RP1L1:NM_178857	c.C2154A	p.N718K	het	PB	Novel
			TCHHL1:NM_001008536	c.C697A	p.Q233K	het	SI	Novel
			USH2A:NM_206933	c.A7130G	p.N2377S	het	PB	(Garcia-Garcia et al. 2011)
fRPN-155	RPN-319	RP	GNAT2:NM_005272	c.G370A	p.V124M	het	SI	(Nishiguchi et al. 2005)
			PROM1:NM_006017	c.1354dupT	p.T452Lfs*13	het	P	(Pras et al. 2009)
			USH2A:NM_206933	c.C5858G	p.A1953G	het	PB	(McGee et al. 2010)
fRPN-156	RPN-320	DCB	ABCA4:NM_000350	c.C5908T	p.L1970F	het	PP	(Allikmets, Singh, et al. 1997)
			CEP290:NM_025114	c.G226A	p.A76T	het	SI	Novel
			CNGB3:NM_019098	c.C2420G	p.A807G	het	SI	Novel
			CRB1:NM_201253	c.T1748A	p.I583N	het	SI	Novel
			GDF6:NM_001001557	c.C1304T	p.A435V	het	SI	Novel
			PDE6H:NM_006205	c.C35G	p.S12X	het	P	(Kohl et al. 2012)
fRPN-157	RPN-322	DMB	BEST1:NM_004183	c.C393A	p.Y131X	het	P	Novel
fRPN-158	RPN-323	RP	CACNA1F:NM_005183	c.A3656G	p.N1219S	het	SI	Novel
			CEP290:NM_025114	c.A1298G	p.D433G	het	PB	(Eisenberger et al. 2013)
			CRX:NM_000554	c.A425G	p.Y142C	het	SI	(Cicinelli et al. 2016)
			RHO:NM_000539	c.G419C	p.C140S	het	SI	(Macke et al. 1993)
			RPGR:NM_001034853	c.914dupA	p.N305fs	hem	P	(Carss et al. 2017)
fRPN-159	RPN-324	RP	CDHR1:NM_001171971	c.1485+2T>C		hom	P	(Nikopoulos et al. 2015)
			SAG:NM_000541	c.C74T	p.S25L	het	SI	Novel
			USH1C:NM_153676	c.G2611A	p.A871T	het	PB	(Ganapathy et al. 2014)
fRPN-160	RPN-325	DMB	CERKL:NM_001030311	c.C1601T	p.S534L	het	SI	Novel
			DTHD1:NM_001170700	c.C2245A	p.R749S	het	SI	Novel

ID familia	ID paciente	Dx	Gen:transcrito	Nucleótido	Proteína	Estado	Clasif.	Ref
			PDE6C:NM_006204	c.T413C	p.L138S	het	SI	Novel
			RD3:NM_183059	c.A259G	p.K87E	het	SI	(De Castro-Miró et al. 2014)
			RGR:NM_002921	c.G397A	p.V133I	het	SI	Novel
fRPN-161	RPN-326	DMB	ABCA4:NM_000350	c.C5642T	p.A1881V	het	PP	(Testa et al. 2012)
			BEST1:NM_004183	c.C698A	p.P233Q	het	PP	(Marchant et al. 2007)
			C2orf71:NM_001029883	c.C3058A	p.Q1020K	het	SI	Novel
			C2orf71:NM_001029883	c.A3059G	p.Q1020R	het	PB	Novel
			DTHD1:NM_001170700	c.2121_2129del	p.707_710del	het	SI	Novel
			MAK:NM_005906	c.A755G	p.N252S	het	SI	Novel
			ABCA4:NM_000350	c.C634T	p.R212C	hom	P	(Gerber et al. 1998)
fRPN-162	RPN-327	STGD	ADAMTS18:NM_199355	c.C2500T	p.P834S	het	PB	Novel
			CRB1:NM_201253	c.T614C	p.I205T	het	SI	(Bernal et al. 2003)
			SAG:NM_000541	c.C74T	p.S25L	het	PB	Novel
			TCHHL1:NM_001008536	c.G823T	p.D275Y	het	SI	Novel
fRPN-163	RPN-328	D en patrón del EPR	KIAA2026:NM_001017969	c.A3496C	p.N1166H	het	SI	Novel
			KIAA2026:NM_001017969	c.A5956G	p.I1986V	het	SI	Novel
			OFD1:NM_003611	c.A1634G	p.Q545R	het	PB	Novel
fRPN-164	RPN-329	ACL	EYS:NM_001142800	c.A1596C	p.K532N	het	PB	(Audo et al. 2010)
			NEUROD1:NM_002500	c.G1013C	p.S338T	het	SI	Novel
			SLC7A14:NM_020949	c.G1129A	p.V377I	het	PB	Novel
fRPN-165	RPN-330	DFVA	ABCA4:NM_000350	c.G5882A	p.G1961E	het	PP	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
			ADAM9:NM_003816	c.G226A	p.E76K	het	PB	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.C1448T	p.A483V	het	PB	Novel
fRPN-166	RPN-332	DFVA	C2orf71:NM_001029883	c.G1942A	p.A648T	het	PB	(Koyanagi et al. 2019)
			CNGA1:NM_001142564	c.C1277T	p.T426I	het	SI	Novel
			PRPH2:NM_000322	c.356_365del	p.C119fs	het	P	Novel
fRPN-167	RPN-333	ACRM	BBS2:NM_031885	c.1197delT	p.H399fs	het	PP	Novel
			CEP290:NM_025114	c.A3605G	p.K1202R	het	SI	Novel
			CNGB3:NM_019098	c.1148delC	p.T383fs	het	P	(Kohl et al. 2000)
			CNGB3:NM_019098	c.G133T	p.E45X	het	P	Novel
			IMPDH1:NM_000883	c.G1057A	p.V353I	het	SI	(Bowne et al. 2002)
fRPN-168	RPN-335	RP	PROM1:NM_006017	c.G1196A	p.R399H	het	PB	Novel
			CNGA3:NM_001298	c.C143T	p.P48L	het	PB	(Nishiguchi et al. 2005)
			CNGB1:NM_001297	c.A634T	p.T212S	het	PB	Novel
			KIAA2026:NM_001017969	c.A5554G	p.T1852A	het	PB	Novel

ID familia	ID paciente	Dx	Gen:transcrito	Nucleótido	Proteína	Estado	Clasif.	Ref
			PRPF31:NM_015629	ex. 10-11 del	p.?	het	P	Novel
			SNRNP200:NM_014014	c.G4165A	p.V1389I	het	B	Novel
			USH2A:NM_206933	c.G9262A	p.E3088K	het	PB	(Dreyer et al. 2008)
fRPN-169	RPN-336	RP	KIAA2026:NM_001017969	c.A5542C	p.T1848P	het	PB	Novel
			MAK:NM_005906	c.G1868A	p.R623Q	het	SI	Novel
			PDE6B:NM_000283	c.C343G	p.P115A	het	PB	Novel
			RP1:NM_006269	c.T2042A	p.I681K	het	PB	Novel
			RP1:NM_006269	c.2040dupA	p.A680fs	het	P	Novel
			USH2A:NM_206933	c.C4714T	p.L1572F	het	SI	(Aller et al. 2006)
			USH2A:NM_206933	c.2299delG	p.E767fs	het	P	(Dreyer et al. 2001)
			USH2A:NM_206933	c.C1055T	p.T352I	het	PP	(F. P. M. Cremers et al. 2007)
			ABCA4:NM_000350	c.C5908T	p.L1970F	het	PP	(Allikmets, Singh, et al. 1997)
fRPN-170	RPN-339	RP	CDHR1:NM_033100	c.T1058C	p.F353S	het	SI	Novel
			IMPG1:NM_001563	c.G173A	p.R58K	het	PB	Novel
			PDE6B:NM_000283	c.G496A	p.E166K	het	PB	(Neveling et al. 2013)
			RIMS1:NM_014989	c.T2803C	p.S935P	het	PB	Novel
			RPGRIP1:NM_020366	c.G1767T	p.Q589H	het	PB	(Fernández-Martínez et al. 2011)
fRPN-173	RPN-342	STGD	ABCA4:NM_000350	c.G3386T	p.R1129L	het	P	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
			ABCA4:NM_000350	c.C3347T	p.S1116F	het	PP	Novel
			GNAT2:NM_005272	c.C928T	p.L310F	het	SI	Novel
			RDH5:NM_002905	c.G572A	p.R191Q	het	SI	(Pras et al. 2012)
			C2orf71:NM_001029883	c.G2063A	p.C688Y	het	PB	(Audo et al. 2010)
fRPN-174	RPN-343	RP	EYS:NM_001142800	c.A8789G	p.D2930G	het	PB	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.G292A	p.D98N	het	SI	Novel
			RPGR:NM_001034853	c.2746delG	p.E916Kfs*171	hem	P	Novel
			USH2A:NM_206933	c.A7130G	p.N2377S	het	PB	(García-García et al. 2011)
fRPN-175	RPN-347	RP	ABCA4:NM_000350	c.A466G	p.I156V	hom	SI	(R. Riveiro-Alvarez et al. 2009)
			PRPF31:NM_015629	c.1462_1472del	p.K488Rfs*74	het	P	(Martin-Merida et al. 2018)
			UNC119:NM_005148	c.C47T	p.S16F	het	PB	Novel
			ZNF408:NM_024741	c.C126G	p.D42E	het	PB	Novel
			BEST1:NM_004183	c.C388A	p.R130S	het	P	(Meunier et al. 2011)
			BEST1:NM_004183	c.T602C	p.I201T	het	PP	(Lotery et al. 2000)
fRPN-178	RPN-363	DMB	CNGA3:NM_001298	c.C458T	p.T153M	het	PB	(Kohl et al. 1998)
			ELOVL4:NM_022726	c.G814C	p.E272Q	het	PB	Novel
			PDE6B:NM_000283	c.T655C	p.Y219H	het	PB	(Neveling et al. 2012)
			PDE6C:NM_006204	c.A2501G	p.E834G	het	PB	(Gao et al. 1999)

ID familia	ID paciente	Dx	Gen:transcrito	Nucleótido	Proteína	Estado	Clasif.	Ref
			PITPNM3:NM_031220	c.C1688T	p.T563M	het	SI	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.G236A	p.R79H	het	SI	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.G4906A	p.E1636K	het	PB	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.4732_4734dup	p.L1578dup	het	PB	Novel
fRPN-179	RPN-379	STGD	ABCA4:NM_000350	c.G3386T	p.R1129L	het	P	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
			ABCA4:NM_000350	c.5714+1G>A		het	P	Novel
			CDH3:NM_001793	c.G909T	p.M303I	het	SI	Novel
			RGS9:NM_001165933	c.A1435G	p.K479E	het	SI	Novel
			C21orf2:NM_004928	c.C246A	p.Y82X	het	P	Novel
			C21orf2:NM_004928	c.G218C	p.R73P	het	PP	(Wheway et al. 2015)
fRPN-183	RPN-402	DCB	CABP4:NM_145200	c.G547C	p.G183R	het	SI	Novel
			CACNA2D4:NM_172364	c.G2515T	p.A839S	het	PB	Novel
			CNGB3:NM_019098	c.C677A	p.T226N	het	SI	Novel
			CRB1:NM_201253	c.T614C	p.I205T	het	SI	(Bernal et al. 2003)
			MVK:NM_000431	c.T803C	p.I268T	het	PP	(Siemiatkowska et al. 2013)
			RDH5:NM_002905	c.G839A	p.R280H	het	PP	(Gonzalez-Fernandez et al. 1999)
			ARL2BP:NM_012106	c.G485A	p.R162Q	het	SI	Novel
			EYS:NM_001142800	c.G5510C	p.W1837S	het	PB	(Audo et al. 2010)
fRPN-184	RPN-404	RP	EYS:NM_001142800	c.A7222G	p.T2408A	het	SI	Novel
			IMPG1:NM_001563	c.G173A	p.R58K	het	PB	Novel
			KIAA2026:NM_001017969	c.C2893G	p.L965V	het	SI	Novel
			RP1:NM_006269	c.G6196A	p.D2066N	het	SI	(Berson et al. 2001)
			USH2A:NM_206933	c.T7685C	p.V2562A	het	PB	(Dreyer et al. 2008)
			ABCA4:NM_000350	c.G5882A	p.G1961E	het	PP	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
fRPN-185	RPN-406	DCB	CDHR1:NM_001171971	c.1485+2T>C		het	PP	(Nikopoulos et al. 2015)
						hom	P	
fRPN-186	RPN-407	RP	BBS2:NM_031885	c.C1454T	p.A485V	het	SI	Novel
			ELOVL4:NM_022726	c.G814C	p.E272Q	het	PB	Novel
			EYS:NM_001142800	c.A7796G	p.H2599R	het	PB	(Audo et al. 2010)
			PITPNM3:NM_031220	c.G1726A	p.A576T	het	SI	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.G5598T	p.E1866D	het	PB	Novel
			TLL5:NM_015072	c.G2891A	p.R964Q	het	PB	Novel
			ABCA4:NM_000350	c.G2972T	p.G991V	het	PP	(Fujinami, Zernant, et al. 2013)
fRPN-187	RPN-410	STGD	ABCA4:NM_000350	c.4253+4C>T		het	P	(Webster et al. 2001)
			C2orf71:NM_001029883	c.G2063A	p.C688Y	het	PB	(Audo et al. 2010)
			CACNA1F:NM_005183	c.C345G	p.F115L	het	SI	Novel
			EYS:NM_001142800	c.G977A	p.S326N	het	PB	(Audo et al. 2010)

ID familia	ID paciente	Dx	Gen:transcrito	Nucleótido	Proteína	Estado	Clasif.	Ref
			RBP3:NM_002900	c.G1037A	p.R346H	het	PB	(den Hollander et al. 2009)
			RP1L1:NM_178857	c.A3971G	p.E1324G	het	PB	Novel
			USH1C:NM_153676	c.G2611A	p.A871T	het	PB	(Ganapathy et al. 2014)
fRPN-189	RPN-419	RP	CDHR1:NM_033100	c.T1948C	p.C650R	het	PB	Novel
			IMPG2:NM_016247	c.G1432A	p.V478I	het	PB	Novel
			RIMS1:NM_014989	c.C928T	p.R310C	het	SI	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.C6545A	p.A2182D	het	PB	Novel
			USH2A:NM_206933	c.T7915C	p.S2639P	het	SI	(McGee et al. 2010)
fRPN-190	RPN-424	DCB	C21orf2:NM_004928	c.G172T	p.V58L	het	SI	Novel
			CACNA2D4:NM_172364	c.2153-12_2155del	p.?	het	SI	Novel
			CRB1:NM_201253	c.493_501del	p.I167_G169del	het	SI	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.A3971G	p.E1324G	het	PB	Novel
			SAG:NM_000541	c.C374T	p.T125M	het	PB	(Sippel et al. 1998)
fRPN-191	RPN-426	RP	ADAMTS18:NM_199355	c.C637T	p.R213W	het	PB	Novel
			C2orf71:NM_001029883	c.G1942A	p.A648T	het	PB	(Koyanagi et al. 2019)
			CRB1:NM_201253	c.G481A	p.A161T	het	PP	Novel
			CRB1:NM_201253	c.T2688A	p.C896X	het	P	(Hanein et al. 2004)
			NR2E3:NM_016346	c.C131T	p.S44L	het	PB	(Bernal et al. 2003)
			RBP3:NM_002900	c.C1753A	p.P585T	het	PB	Novel
fRPN-192	RPN-427	DCACB	ADAM9:NM_003816	c.G1327A	p.E443K	het	SI	Novel
			CEP290:NM_025114	c.G2980A	p.E994K	het	PB	(F. Wang et al. 2014)
			RGS9:NM_003835	c.C1546T	p.R516X	het	PP	Novel
			RPGRIP1:NM_020366	c.G3501A	p.R768Q	het	PB	Novel
			USH1C:NM_153676	c.T864G	p.I288M	het	SI	Novel
fRPN-194	RPN-432	RP	ABCA4:NM_000350	c.G455A	p.R152Q	het	SI	(Zobor et al. 2018)
			CACNA2D4:NM_172364	c.G2408C	p.R803P	het	SI	Novel
			CNGA3:NM_001298	c.C458T	p.T153M	het	PB	(Kohl et al. 1998)
			CNGA3:NM_001298	c.G1405A	p.A469T	het	PP	(Reuter et al. 2008)
			MAK:NM_005906	c.402_403insATG	p.(Met134dup)	het	SI	Novel
			PRPF8:NM_006445	c.C6902T	p.P2301L	het	P	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.G1138A	p.G380R	het	PB	(Tiwari et al. 2016)
			AIPL1:NM_014336	c.A401T	p.Y134F	het	PB	(Dharmaraj et al. 2004)
fRPN-195	RPN-434	ACL	CDH3:NM_001793	c.G1222A	p.V408I	het	PB	Novel
			CRB1:NM_201253	c.C4142T	p.P1381L	het	PP	(Henderson et al. 2011)
			CRB1:NM_201253	CRB1 del (chr1:197209166-197627439)		het	P	Novel
			KCNV2:NM_133497	KCNV2 del (chr9:2392405-2783187)		het	PP	Novel

ID familia	ID paciente	Dx	Gen:transcrito	Nucleótido	Proteína	Estado	Clasif.	Ref
			RP1L1:NM_178857	c.C2644T	p.R882W	het	PB	Novel
			ZNF408:NM_001184751	c.G22C	p.G8R	het	PB	Novel
fRPN-196	RPN-441	DM STGD- like	NR2E3:NM_016346	c.G932A	p.R311Q	het	PP	(Haider et al. 2000)
			RIMS1:NM_001168408	c.G89A	p.R30Q	het	PB	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.C2644T	p.R882W	het	PB	Novel
			RPGR:NM_001034853	c.C1399A	p.Q467K	het	PB	Novel
			SAG:NM_000541	c.G301A	p.A101T	het	PB	Novel
			USH2A:NM_206933	c.T7685C	p.V2562A	het	PB	(Dreyer et al. 2008)
			ABCA4:NM_000350	c.G1654A	p.V552I	het	SI	(M. Michaelides et al. 2007)
fRPN-197	RPN-442	RP	MERTK:NM_006343	MERTK del (chr2:111371701-113132395)		het	P	Novel
			MERTK:NM_006343	c.G1450A	p.G484S	het	PP	(Eisenberger et al. 2013)
			RP1L1:NM_178857	c.C6992T	p.T2331M	het	PB	Novel
			TULP1:NM_003322	c.G1486A	p.A496T	het	PB	(Gu et al. 1998)
fRPN-198	RPN-444	FA	ADAMTS18:NM_199355	c.C637T	p.R213W	het	PB	Novel
			C2orf71:NM_001029883	c.G1942A	p.A648T	het	PB	(Koyanagi et al. 2019)
			ELOVL4:NM_022726	c.G814C	p.E272Q	het	PB	Novel
			EYS:NM_001142800	c.A2309C	p.Q770P	het	SI	(Messchaert et al. 2018)
			RDH5:NM_002905	c.C625T	p.R209X	hom	P	(Schatz et al. 2010)
			RP1L1:NM_178857	c.G5598T	p.E1866D	het	PB	Novel
fRPN-199	RPN-445	STGD	ABCA4:NM_000350	c.G5882A	p.G1961E	het	PP	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
			ABCA4:NM_000350	c.G3386T	p.R1129L	het	P	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
			C2orf71:NM_001029883	c.G2063A	p.C688Y	het	PB	(Audo et al. 2010)
			PDE6A:NM_000440	c.A1476C	p.Q492H	het	PB	Novel
			PDE6C:NM_006204	c.A1885G	p.I629V	het	PB	Novel
			RP1:NM_006269	c.G5624C	p.G1875A	het	PB	Novel
			CEP290:NM_025114	c.A508T	p.K170X	hom	P	Novel
fRPN-200	RPN-450	ACL	EYS:NM_001142800	c.G977A	p.S326N	het	PB	(Audo et al. 2010)
			IMPG2:NM_016247	c.A2897G	p.K966R	het	PB	Novel
			PDE6B:NM_000283	c.G496A	p.E166K	het	PB	(Neveling et al. 2013)
			RPGRIP1:NM_020366	c.A3358G	p.I1120V	het	PB	(Vallespin et al. 2007)
			TOPORS:NM_005802	c.C3034G	p.P1012A	het	PB	Novel
			USH2A:NM_206933	c.C1663G	p.L555V	het	PB	(Leroy et al. 2001)
			PDE6B:NM_000283	c.G496A	p.E166K	het	PB	(Neveling et al. 2013)
fRPN-202	RPN-455	RP	SAG:NM_000541	c.C74T	p.S25L	het	PB	Novel
			USH2A:NM_206933	c.G2276T	p.C759F	het	PP	(Rivolta et al. 2000)
			USH2A:NM_206933	c.2299delG	p.E767fs	het	P	(Dreyer et al. 2001)

ID familia	ID paciente	Dx	Gen:transcrito	Nucleótido	Proteína	Estado	Clasif.	Ref
fRPN-203	RPN-451	RP	USH2A:NM_206933	c.C4714T	p.L1572F	het	SI	(Aller et al. 2006)
			ADAMTS18:NM_199355	c.C2500T	p.P834S	het	PB	Novel
			PRCD:NM_001077620	c.102_111dup	p.Ser38X	het	P	Novel
			PRCD:NM_001077620	c.74+5G>C	p.?	het	PP	Novel
			TOPORS:NM_005802	c.C74G	p.S25W	het	PB	(F. Wang et al. 2014)
fRPN-204	RPN-452	RP	CEP290:NM_025114	c.G2980A	p.E994K	het	PB	(F. Wang et al. 2014)
			CNGA1:NM_001142564	c.G4A	p.E2K	het	PB	Novel
			CNGB1:NM_001297	c.801delG	p.(Leu267Phefs*10)	het	P	Novel
			PRPF4:NM_004697	c.C1006T	p.R336C	het	SI	Novel
			USH2A:NM_206933	c.G2276T	p.C759F	het	PP	(Rivolta et al. 2000)
			USH2A:NM_206933	c.C1663G	p.L555V	het	PB	(Leroy et al. 2001)
			USH2A:NM_206933	c.1841-2A>G		het	P	(Bernal et al. 2003)
fRPN-205	RPN-462	RP	CNGA3:NM_001298	c.C440G	p.T147R	het	PB	Novel
			CNGA3:NM_001298	c.G1618A	p.V540I	het	SI	(A. A H J Thiadens et al. 2010)
			TTC8:NM_144596	c.A284G	p.K95R	het	PB	Novel
fRPN-206	RPN-463	STGD	ABCA4:NM_000350	c.G5882A	p.G1961E	het	PP	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
			ABCA4:NM_000350	c.5917delG	p.V1973X	het	P	(Rivera et al. 2000)
			EYS:NM_001142800	c.A7796G	p.H2599R	het	PB	(Audo et al. 2010)
			FAM161A:NM_001201543	c.C197T	p.T66I	het	PB	(Langmann et al. 2010)
			PRCD:NM_001077620	c.C49T	p.R17C	het	PB	(Zangerl et al. 2006)
			ZNF513:NM_144631	c.G395C	p.C132S	het	SI	Novel
fRPN-207	RPN-466	DMB	BEST1:NM_004183	c.C11T	p.T4I	het	PP	(Tian et al. 2014)
fRPN-208	RPN-472	RP	CDH3:NM_001793	c.A805C	p.M269L	het	PB	Novel
			RBP3:NM_002900	c.G1037A	p.R346H	het	PB	(den Hollander et al. 2009)
			RP1L1:NM_178857	c.G4444A	p.G1482R	het	PB	Novel
			USH2A:NM_206933	c.G14413A	p.V4805I	het	SI	Novel
			USH2A:NM_206933	c.C8631G	p.H2877Q	het	SI	Novel
fRPN-211	RPN-475	DCB	CACNA1F:NM_005183	c.A2237C	p.N746T	het	PB	(L. Zhao et al. 2015)
			CACNA2D4:NM_172364	c.T2987C	p.F996S	het	PB	Novel
			CERKL:NM_001030311	c.C847T	p.R283X	hom	P	(Tuson, Marfany, and González-Duarte 2004)
			TTC8:NM_144596	c.A284G	p.K95R	het	PB	Novel
fRPN-212	RPN-478	DCB	ABCA4:NM_000350	c.4773+1G>T		het	P	(Rosa Riveiro-Alvarez et al. 2013)
			ABCA4:NM_000350	c.C2568A	p.Y856X	het	P	(Fujinami, Zernant, et al. 2013)
			DTHD1:NM_001170700	c.G2246A	p.R749H	het	B	Novel

ID familia	ID paciente	Dx	Gen:transcrito	Nucleótido	Proteína	Estado	Clasif.	Ref
			RIMS1:NM_014989	c.G3240T	p.Q1080H	het	PB	Novel
			USH2A:NM_206933	c.G9478A	p.V3160M	het	SI	Novel
fRPN-214	RPN-482	RP	C1QTNF5:NM_015645	c.G580A	p.G194R	het	SI	Novel
			CNGB3:NM_019098	c.A2159G	p.Q720R	het	PB	Novel
			LCA5:NM_001122769	c.A1522G	p.T508A	het	PB	Novel
			RAB28:NM_004249	c.G610A	p.E204K	het	SI	Novel
			RGS9:NM_003835	c.C1146A	p.H382Q	het	SI	Novel
			USH2A:NM_206933	c.C5329T	p.R1777W	het	PP	(Nakanishi et al. 2011)
			USH2A:NM_206933	c.C2209T	p.R737X	het	P	(Kaiserman et al. 2007)
fRPN-216	RPN-493	RP	CRX:NM_000554	c.A425G	p.Y142C	het	SI	(Cicinelli et al. 2016)
			CRX:NM_000554	c.G365A	p.G122D	het	B	(Zernant et al. 2005)
fRPN-217	RPN-495	RP	CDHR1:NM_001171971	c.1485+2T>C		hom	P	(Nikopoulos et al. 2015)
			CRB1:NM_201253	c.C866T	p.T289M	het	PB	(Lotery et al. 2001)
			IQCB1:NM_001023570	c.A623G	p.Y208C	het	PB	Novel
			RDH12:NM_152443	c.G490C	p.V164L	het	PB	Novel
			USH2A:NM_206933	c.C11597T	p.A3866V	het	PB	(Le Quesne Stabej et al. 2012)
fRPN-219	RPN-508	STGD	ABCA4:NM_000350	c.G3386T	p.R1129L	het	P	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
			ABCA4:NM_000350	c.T5819C	p.L1940P	het	P	(Paloma et al. 2001)
			AIPL1:NM_014336	c.G364C	p.G122R	het	SI	(Jacobson et al. 2011)
			EYS:NM_001292009	c.A4985T	p.D1662V	het	PB	(Audo et al. 2010)
			SEMA4A:NM_001193301	c.732_734del	p.F247del	het	SI	Novel
			SNRNP200:NM_014014	c.G4165A	p.V1389I	het	B	Novel
			ABCA4:NM_000350	c.G5882A	p.G1961E	het	PP	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
fRPN-220	RPN-510	STGD	ABCA4:NM_000350	c.C3113T	p.A1038V	het	P	(Allikmets, Singh, et al. 1997)
			ABCA4:NM_000350	c.T1622C	p.L541P	het	PP	(Rozet et al. 1998)
			CEP290:NM_025114	c.G4237C	p.D1413H	het	PB	(Bernardis et al. 2016)
fRPN-223	RPN-520	RP	CNGA3:NM_001298	c.C458T	p.T153M	het	PB	(Kohl et al. 1998)
			PDE6C:NM_006204	c.G1755T	p.K585N	het	PB	(Langlo et al. 2016)
			PITPNM3:NM_031220	c.C1688T	p.T563M	het	SI	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.A4016T	p.E1339V	het	SI	Novel
			USH2A:NM_206933	c.T7685C	p.V2562A	het	PB	(Dreyer et al. 2000)
			CNGA3:NM_001298	c.G1669A	p.G557R	het	PP	(Kohl et al. 1998)
fRPN-224	RPN-525	RP	FAM161A:NM_001201543	c.T698C	p.V233A	het	PB	Novel
			TOPORS:NM_005802	c.G1991A	p.S664N	het	PB	Novel
			USH2A:NM_206933	c.G12575A	p.R4192H	het	PP	(McGee et al. 2010)
			USH2A:NM_206933	c.C1390T	p.R464C	het	PP	(Seyedahmadi et al. 2004)

ID familia	ID paciente	Dx	Gen:transcrito	Nucleótido	Proteína	Estado	Clasif.	Ref
fRPN-225	RPN-536	RP	ABCA4:NM_000350	c.G6148C	p.V2050L	het	SI	(Allikmets et al. 1998)
			CNGA1:NM_001142564	c.C1892T	p.T631M	het	PP	Novel
			CNGB1:NM_001297	c.3150delG	p.(Phe1051Leufs*12)	het	P	(Nishiguchi et al. 2013)
			IMPG1:NM_001563	c.G316C	p.V106L	het	SI	Novel
			PROM1:NM_006017	c.G2020T	p.A674S	het	SI	Novel
			SNRNP200:NM_014014	c.G5933C	p.G1978A	het	B	Novel
			TTL5:NM_015072	c.G2966A	p.R989H	het	SI	Novel
fRPN-226	RPN-551	RP	EYS:NM_001142800	c.G5510C	p.W1837S	het	PB	(Audo et al. 2010)
			PDE6B:NM_000283	c.G794A	p.R265Q	het	SI	(Bernardis et al. 2016)
			ROM1:NM_000327	c.C664T	p.P222S	het	SI	Novel
			USH2A:NM_206933	c.G10073A	p.C3358Y	hom	PP	(McGee et al. 2010)
fRPN-232	RPN-602	RP	EYS:NM_001142800	c.C4120T	p.R1374X	het	P	(Barragán et al. 2010)
			EYS:NM_001142800	ex. 16-21 del	p.?	het	P	Novel
			RP9:NM_203288	c.664delT	p.X222D	het	B	(Keen et al. 2002)
			SNRNP200:NM_014014	c.A3572T	p.Q1191L	het	SI	Novel
			USH2A:NM_206933	c.T7685C	p.V2562A	het	PB	(Dreyer et al. 2008)
fRPN-233	RPN-603	RP	CNGA1:NM_001142564	c.G4A	p.E2K	het	PB	Novel
			CRX:NM_000554	c.C28G	p.H10D	het	PB	Novel
			PDE6C:NM_006204	c.G1755T	p.K585N	het	PB	(Langlo et al. 2016)
			PRPF31:NM_015629	c.1462_1472del	p.K488Rfs*74	het	P	(Martin-Merida et al. 2018)
			SLC7A14:NM_020949	c.G1129A	p.V377I	het	PB	Novel
fRPN-235	RPN-605	ACL	DRAM2:NM_178454	c.C347A	p.T116N	het	SI	Novel
			RP1:NM_006269	c.G2833T	p.V945L	het	PB	Novel
			RPE65:NM_000329	c.T1022C	p.L341S	hom	PP	(Morimura et al. 1998)
fRPN-238	RPN-608	DM STGD- like	SLC7A14:NM_020949	c.G1168C	p.V390L	het	SI	Novel
			C21orf2:NM_004928	c.T752G	p.V251G	het	SI	Novel
			DTHD1:NM_001170700	c.C2245A	p.R749S	het	SI	Novel
			PRPH2:NM_000322	c.C514T	p.R172W	het	PP	(Wells et al. 1993)
fRPN-239	RPN-609	STGD	RPGR:NM_001034853	c.G2897A	p.G966E	het	PB	Novel
			ABCA4:NM_000350	c.G3386T	p.R1129L	het	P	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
			ABCA4:NM_000350	c.T182C	p.M61T	het	PP	Novel
			ADAMTS18:NM_199355	c.A3551G	p.E1184G	het	PB	Novel
			RBP3:NM_002900	c.G2077A	p.V693M	het	SI	Novel
fRPN-566	RP-1943	RP	CNGA3:NM_001298	c.C458T	p.T153M	het	PB	(Kohl et al. 1998)
			FAM161A:NM_001201543	c.C1153G	p.Q385E	het	SI	(Langmann et al. 2010)
			KIAA2026:NM_001017969	c.A5542C	p.T1848P	het	PB	Novel

ID familia	ID paciente	Dx	Gen:transcrito	Nucleótido	Proteína	Estado	Clasif.	Ref
			PDE6B:NM_000283	c.G496A	p.E166K	het	PB	(Neveling et al. 2013)
			TULP1:NM_003322	c.G539A	p.R180H	het	SI	(González-del Pozo et al. 2011)
			USH2A:NM_206933	c.G2276T	p.C759F	het	PP	(Rivolta et al. 2000)
			CDH3:NM_001793	c.T1436C	p.L479P	het	SI	Novel
			PRPF8:NM_006445	c.434+3G>A	p.?	het	SI	Novel
fRPN-AP	RPN-461	RP	ROM1:NM_000327	ROM1 dup	p.?	het	PP	Novel
			RPE65:NM_000329	c.G394A	p.A132T	het	SI	(Morimura et al. 1998)
			SAG:NM_000541	c.C874G	p.R292G	het	SI	Novel
			SNRNP200:NM_014014	c.G4165A	p.V1389I	het	B	Novel
			C2orf71:NM_001029883	c.G1968T	p.R656S	het	PB	Novel
fRPN-BT	RP-543	RP	KIAA2026:NM_001017969	c.G5695A	p.V1899I	het	SI	Novel
			PROM1:NM_006017	c.1354dupT	p.T452Lfs*13	hom	P	(Pras et al. 2009)
			RP1L1:NM_178857	c.G4865A	p.R1622Q	het	PB	Novel
			CNGB3:NM_019098	c.A731G	p.Y244C	het	SI	Novel
			EYS:NM_001142800	ex. 32-33 del	p.?	het	P	(Audo et al. 2010)
fRPN-CO	RP-632	RP	IMPG1:NM_001563	c.G173A	p.R58K	het	PB	Novel
			RPGRIP1:NM_020366	c.930+3A>G		het	SI	Novel
			TCHHL1:NM_001008536	c.A2119G	p.K707E	het	SI	Novel
fRPN-DG	RP-191	RP	PDE6B:NM_000283	c.G760A	p.E254K	het	SI	Novel
			C8orf37:NM_177965	c.470+1G>A		hom	P	Novel
			KIAA2026:NM_001017969	c.G3005C	p.G1002A	het	SI	Novel
fRPN-GG	RP-506	RP	RBP3:NM_002900	c.G2317A	p.V773M	het	SI	Novel
			ROM1:NM_000327	c.C688G	p.L230V	het	PB	Novel
			USH2A:NM_206933	c.G9262A	p.E3088K	het	PB	(Dreyer et al. 2008)
			USH2A:NM_206933	c.C5858G	p.A1953G	het	PB	(McGee et al. 2010)
fRPN-IA	RP-639	RP	EYS:NM_001142800	c.A1596C	p.K532N	het	PB	(Audo et al. 2010)
			CDH3:NM_001793	c.A805C	p.M269L	het	PB	Novel
fRPN-MC	RP-49	RP	GUCY2D:NM_000180	c.A1991G	p.H664R	het	PP	Novel
			RBP3:NM_002900	c.C2168T	p.P723L	het	PB	(den Hollander et al. 2009)
			RP1L1:NM_178857	c.G389A	p.R130Q	het	PB	Novel
			CNNM4:NM_020184	c.C2039T	p.A680V	het	SI	Novel
fRPN-MP	RP-677	STGD	FAM161A:NM_001201543	c.T1133G	p.L378R	het	PB	(Langmann et al. 2010)
			IMPDH1:NM_000883	c.A1598G	p.Q533R	het	SI	Novel
			USH2A:NM_206933	c.A7130G	p.N2377S	het	PB	(Garcia-Garcia et al. 2011)
fRPN-NB	RPN-316	RP	CNGA3:NM_001298	c.A1976C	p.K659T	het	SI	Novel
			EYS:NM_001142800	c.A1145T	p.N382I	het	PB	(Messchaert et al. 2018)

ID familia	ID paciente	Dx	Gen:transcrito	Nucleótido	Proteína	Estado	Clasif.	Ref
			SAG:NM_000541	c.C374T	p.T125M	het	PB	(Sippel et al. 1998)
			SLC7A14:NM_020949	c.C1639T	p.R547W	het	SI	Novel
			SNRNP200:NM_014014	c.C2041T	p.R681C	het	P	(Benaglio et al. 2011)
			USH1C:NM_153676	c.G2611A	p.A871T	het	PB	(Ganapathy et al. 2014)
			CA4:NM_000717	c.A761C	p.Q254P	het	SI	Novel
	RPN-481	RP	CABP4:NM_145200	c.G547C	p.G183R	het	SI	Novel
			MERTK:NM_006343	c.G500A	p.R167H	het	SI	(Mandal et al. 2005)
			RP2:NM_006915	c.C352T	p.R118C	het	PP	(Bader et al. 2003)
fRPN-PV	RPN-464	RP	CACNA2D4:NM_172364	c.C2030G	p.P677R	het	SI	Novel
			CDH3:NM_001793	c.A805C	p.M269L	het	PB	Novel
			CEP290:NM_025114	c.G1670A	p.R557H	het	SI	Novel
			ABCA4:NM_000350	c.G6148C	p.V2050L	het	SI	(Allikmets et al. 1998)
fRPN-SF	RP-44	RP	KIAA2026:NM_001017969	c.C3470T	p.P1157L	het	SI	Novel
			PDE6B:NM_000283	c.G385A	p.E129K	het	SI	(L. Wang et al. 2018)
			PDE6B:NM_000283	c.A2408G	p.N803S	het	PP	Novel
			SNRNP200:NM_014014	c.C4235G	p.T1412S	het	SI	Novel
fRPN-SR	RPN-443	RP	EYS:NM_001142800	ex. 12 del	p.?	het	P	Novel
			EYS:NM_001142800	c.5928-2A>G	p.?	het	P	(González-del Pozo et al. 2011)
			RHO:NM_000539	c.G850T	p.G284C	het	SI	Novel
			RP1L1:NM_178857	c.A1769C	p.Q590P	het	PB	Novel

Variantes con una MAF<0,01 (excepto las variantes sinónimas) identificadas en cada paciente estudiado mediante NGS, y calificadas como benigna, probablemente benigna, significado clínico incierto, probablemente patogénica y patogénica, de acuerdo con la ACMG. Las variantes patogénicas y probablemente patogénicas están resaltadas en negrita. Abreviaturas: ACL: amaurosis congenital de Leber; ACRM: acromatopsia; DC: distrofia de conos; DCB: distrofia de conos y bastones; DFVA: distrofia foveomacular viteliforme del adulto; DMB: distrofia macular de Best; DM STGD-like: distrofia macular STGD-like; DRIT: degeneración retiniana de inicio tardío; Dx: diagnóstico; FA: fundus albipunctatus; RP: retinosis pigmentaria; STGD: enfermedad de Stargardt.

Tabla VIII.8 Mutaciones causantes de enfermedad identificadas en las 75 familias diagnosticadas genéticamente.

ID fam	ID pac/Sexo/E ¹	Fenotip	Gen	Alelo 1	Referencia	Alelo 2	Referencia
Casos autosómico dominantes							
fRPN-147	^a RPN-309/F/16 RPN-310/F/32	RP	<i>PRPF3</i>	c.1477C>T; p.(Pro493Ser)	(Chakarova et al. 2002)	wt	
fRPN-175	^a RPN-347/F/45	RP	<i>PRPF31</i>	c.1462_1472del; p.(Lys488Argfs*75)	(Martin-Merida et al. 2018)	wt	
fRPN-233	RPN-603/F/25	RP	<i>PRPF31</i>	c.1462_1472del; p.(Lys488Argfs*75)	(Martin-Merida et al. 2018)	wt	
fRPN-168	^a RPN-335/M/20 RPN-584/M/17 RPN-585/F/12	RP	<i>PRPF31</i>	del ex. 10-11	Novel	wt	
fRPN-108	^a RPN-253/M/40 RPN-254/F/40	RP	<i>RHO</i>	c.316G>A; p.(Gly106Arg)	(Inglehearn et al. 1992)	wt	
fRPN-140	RPN-271/M/ND ^a RPN-297/F/32	RP	<i>ROM1</i>	dup gen completo	Novel	wt	
fRPN-AP	RP-434/F/46 ^a RPN-461/F/33	RP	<i>ROM1</i>	dup gen completo	Novel	wt	
fRPN-99	RPN-233/M/25 RPN-235/F/ND RPN-236/M/ND ^a RPN-246/F/ND	RP	<i>RP1</i>	c.2029C>T; p.(Arg677*)	(Pierce et al. 1999)	wt	
fRPN-NB	RP-196/F/NA RP-198/F/18 RP-199/F/15 RP-200/M/16 RP-201/M/ND RPN-196/M/ND ^{a,b} RPN-316/M/15 ^b RPN-572/M/ND RPN-573/F/6	RP	<i>SNRNP200</i>	c.2041C>T; p.(Arg681Cys)	(Benaglio et al. 2011)	wt	
fRPN-100	^a RPN-234/M/56 RPN-509/F/63 RPN-552/F/55 RPN-640/F/39	^c DRIT	<i>C1QTNF5</i>	c.563C>T; p.(Pro188Leu)	Novel	wt	
fRPN-125	^a RPN-282/F/33	^c DC	<i>GUCY2D</i>	c.2513G>A; p.(Arg838His)	(Weigell-Weber et al. 2000)	wt	
fRPN-166	RPN-331/F/56 ^a RPN-332/F/30	DFVA	<i>PRPH2</i>	c.356_365del; p.(Cys119Phefs*17)	Novel	wt	
fRPN-144	^a RPN-304/F/49	DM	<i>PRPH2</i>	c.499G>A; p.(Gly167Ser)	(Testa et al. 2005)	wt	

ID fam	ID pac/Sexo/E ¹	Fenotip	Gen	Alelo 1	Referencia	Alelo 2	Referencia
fRPN-238	RPN-415/F/77 RPN-416/F/48 RPN-608/M/21	STGD-like DM STGD-like	<i>PRPH2</i>	c.514C>T; p.(Arg172Trp)	(Wells et al. 1993)	wt	
Casos autosómico recesivos							
fRPN-GG	^a RPN-506/M/10	RP	<i>C8orf37</i>	c.470+1G>A; p.?	Novel	c.470+1G>A; p.?	Novel
fRPN-217	^a RPN-495/M/NA RPN-496/M/NA RPN-498/M/NA	RP	<i>CDHR1</i>	c.1485+2T>C	(Nikopoulos et al. 2015)	c.1485+2T>C	(Nikopoulos et al. 2015)
fRPN-43	^a RPN-113/M/20 RPN-114/M/20	RP CRD	<i>CERKL</i>	c.847C>T; p.(Arg283*)	(Tuson, Marfany, and González-Duarte 2004)	c.847C>T; p.(Arg283*)	(Tuson, Marfany, and González-Duarte 2004)
fRPN-110	^b RPN-256/H/18 ^{a,b} RPN-258/H/31	RP	<i>CNGB1</i>	c.1822G>T; p.(Glu608*)	Novel	c.1822G>T; p.(Glu608*) c.2957A>T; p.(Asn986Ile)	Novel (Simpson et al. 2011)
fRPN-194	^{a,b} RPN-432/H/9 RPN-433/M/5	RP	<i>CNGB3</i>	c.458C>T; p.(Thr153Met)	(Kohl et al. 1998)	c.1405G>A; p.(Ala469Thr)	(Reuter et al. 2008)
fRPN-191	^a RPN-426/M/2	RP	<i>CRB1</i>	c.481G>A; p.(Ala161Thr)	Novel	c.2688T>A; p.(Cys896*)	(Hanein et al. 2004)
fRPN-232	^a RPN-602/H/20	RP	<i>EYS</i>	c.4120C>T; p.(Arg1374*)	(Barragán et al. 2010)	del ex. 16-21	Novel
fRPN-SRT	^a RPN-443/H/18	RP	<i>EYS</i>	c.5928-2A>G; p.?	(González-del Pozo et al. 2011)	del ex. 12	Novel
fRPN-84	^b RPN-213/H/37 ^{a,b} RPN-214/H/34	RP	<i>EYS</i>	c.6714del; p.(Ile2239Serfs*17)	(R. W. J. Collin et al. 2008)	c.8834G>A; p.(Gly2945Glu)	(Barragán et al. 2010)
fRPN-197	^a RPN-442/M/12	RP	<i>MERTK</i>	c.1450G>A; p.(Gly484Ser)	(Eisenberger et al. 2013)	del gen completo (chr2:111371701-113132395)	Novel
fRPN-203	^a RPN-451/H/12	RP	<i>PRCD</i>	c.102_111dup; p.(Ser38*)	Novel	c.74+5G>C; p.?	Novel
fRPN-71	RPN-187/M/3 ^{a,b} RPN-188/M/5	RP	<i>RDH12</i>	c.295C>A; p.(Leu99Ile)	(Perrault et al. 2004)	c.806_810del; p.(Ala269Glyfs*2)	(Janecke et al. 2004)
fRPN-150	^a RPN-313/H/2	RP	<i>RDH12</i>	c.795C>A; p.(Ser265Arg)	Novel	c.689C>G; p.(Pro230Arg)	Novel
fRPN-226	^a RPN-551/H/40	RP	<i>USH2A</i>	c.10073G>A; p.(Cys3358Tyr)	(McGee et al. 2010)	c.10073G>A; p.(Cys3358Tyr)	(McGee et al. 2010)
fRPN-169	^{a,b} RPN-336/M/23	RP	<i>USH2A</i>	c.1055C>T; p.(Thr352Ile)	(F. P. M. Cremers et al. 2007)	c.2299delG; p.(Glu767Serfs*21)	(Dreyer et al. 2001)
fRPN-68	RP-455/H/29 ^{a,b} RPN-173/M/34	RP	<i>USH2A</i>	c.130G>A; p.(Gly44Arg)	(Garcia-Garcia et al. 2011)	c.2276G>T; p.(Cys759Phe)	(Rivolta et al. 2000)
fRPN-224	^{a,b} RPN-525/M/24	RP	<i>USH2A</i>	c.1390C>T; p.(Arg464Cys)	(Seyedahmadi et al. 2004)	c.12575G>A; p.(Arg4192His)	(McGee et al. 2010)
fRPN-131	^a RPN-288/M/38	RP	<i>USH2A</i>	c.1390C>T; p.(Arg464Cys)	(Seyedahmadi et al. 2004)	c.12575G>A; p.(Arg4192His)	(McGee et al. 2010)
fRPN-204	^a RPN-452/H/47	RP	<i>USH2A</i>	c.1841-2A>G; p.?	(Bernal et al. 2003)	c.2276G>T; p.(Cys759Phe)	(Rivolta et al. 2000)

ID fam	ID pac/Sexo/E ¹	Fenotip	Gen	Alelo 1	Referencia	Alelo 2	Referencia
fRPN-214	^a RPN-482/H/24	RP	<i>USH2A</i>	c.2209C>T; p.(Arg737*)	(Kaiserman et al. 2007)	c.5329C>T; p.(Arg1777Trp)	(Nakanishi et al. 2011)
fRPN-202	RPN-448/M/35 ^a RPN-455/M/28	RP	<i>USH2A</i>	c.2276G>T; p.(Cys759Phe)	(Rivolta et al. 2000)	c.2299delG; p.(Glu767Serfs*21)	(Dreyer et al. 2001)
fRPN-38	^{a,b} RPN-104/M/C RPN-532/H/C	ACL	<i>AIP1</i>	c.97_104dup; p.(Phe35Leufs*2)	(Testa et al. 2011)	c.97_104dup; p.(Phe35Leufs*2)	(Testa et al. 2011)
fRPN-200	^a RPN-450/M/C	ACL	<i>CEP290</i>	c.508A>T; p.(Lys170*)	Novel	c.508A>T; p.(Lys170*) del gen completo (chr1: 197209166-197627439)	Novel
fRPN-195	^{a,b} RPN-434/H/C	ACL	<i>CRB1</i>	c.4142C>T; p.(Pro1381Leu)	(Henderson et al. 2011)	c.1022T>C; p.(Leu341Ser)	Novel
fRPN-235	^a RPN-605/M/C	ACL	<i>RPE65</i>	c.1022T>C; p.(Leu341Ser)	(Morimura et al. 1998)	c.1022T>C; p.(Leu341Ser)	(Morimura et al. 1998)
fRPN-198	^a RPN-444/M/7	FA	<i>RDH5</i>	c.625C>T; p.(Arg209*)	(Schatz et al. 2010)	c.625C>T; p.(Arg209*)	(Schatz et al. 2010)
fRPN-212	^a RPN-478/H/3	DCB	<i>ABCA4</i>	c.2568C>A; p.(Tyr856*)	(Fujinami, Zernant, et al. 2013)	c.4773+1G>T; p.?	(Rosa Riveiro-Alvarez et al. 2013)
fRPN-183	^{a,b} RPN-402/M/5 RPN-403/H/5	DCB	<i>C21orf2</i>	c.218G>C; p.(Arg73Pro)	(Wheway et al. 2015)	c.246C>A; p.(Tyr82*)	Novel
fRPN-58	RPN-147/M/15 ^{a,b} RPN-148/M/25	DCB	<i>C21orf2</i>	c.96+1G>A; p.?	(L. Huang et al. 2016)	c.96+1G>A; p.?	(L. Huang et al. 2016)
fRPN-159	^a RPN-324/M/24	DCB	<i>CDHR1</i>	c.1485+2T>C; p.?	(Nikopoulos et al. 2015)	c.1485+2T>C; p.?	(Nikopoulos et al. 2015)
fRPN-185	^{a,b} RPN-406/H/36	DCB	<i>CDHR1</i>	c.1485+2T>C; p.?	(Nikopoulos et al. 2015)	c.1485+2T>C; p.?	(Nikopoulos et al. 2015)
fRPN-211	^a RPN-475/M/23	DCB	<i>CERKL</i>	c.847C>T; p.(Arg283*)	(Tuson, Marfany, and González-Duarte 2004)	c.847C>T; p.(Arg283*)	(Tuson, Marfany, and González-Duarte 2004)
fRPN-BT	^a RP-543/M/9 RP-545/H/8 RP-547/H/13	DCB RP DCB	<i>PROM1</i>	c.1354dup; p.(Tyr452Leufs*13)	(Pras et al. 2009)	c.1354dup; p.(Tyr452Leufs*13)	(Pras et al. 2009)
fRPN-66	^a RPN-170/H/5 RPN-171/H/3	ACRM	<i>CNGB3</i>	c.1148del; p.(Thr383Ilefs*13)	(Kohl et al. 2000)	c.1432C>T; p.(Arg478*)	(Kohl et al. 2005)
fRPN-167	^{a,b} RPN-333/M/6 RPN-334/M/5	^c ACRM	<i>CNGB3</i>	c.1148delC; p.(Thr383Ilefs*13)	(Kohl et al. 2000)	c.133G>T; p.(Glu45*)	Novel
fRPN-239	RPN-609/H/45	STGD	<i>ABCA4</i>	c.182T>C; p.(Met61Thr)	Novel	c.3386G>T; p.(Arg1129Leu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
fRPN-132	^a RPN-289/H/12	STGD	<i>ABCA4</i>	c.184C>G; p.(Pro62Ala)	Novel	c.2041C>T; p.(Arg681*)	(Maugeri et al. 1999)
fRPN-162	^a RPN-327/M/16	STGD	<i>ABCA4</i>	c.634C>T; p.(Arg212Cys)	(Gerber et al. 1998)	c.634C>T; p.(Arg212Cys)	(Gerber et al. 1998)
fRPN-51	^a RPN-129/M/13 RPN-128/M/40 RPN-544/H/36	STGD	<i>ABCA4</i>	c.982G>T; p.(Glu328*) c.1804C>T; p.(Arg602Trp) c.982G>T; p.(Glu328*)	(Fishman et al. 2003) (Lewis et al. 1999) (Fishman et al. 2003)	c.1804C>T; p.(Arg602Trp) c.5882G>A; p.(Gly1961Glu)	(Lewis et al. 1999) (Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
fRPN-220	^a RPN-510/M/15	STGD	<i>ABCA4</i>	c.1622T>C; p.(Leu541Pro) c.3113C>T; p.(Ala1038Val)	(Fishman et al. 1999)	c.5882G>A; p.(Gly1961Glu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
fRPN-153	^a RPN-317/M/13	STGD	<i>ABCA4</i>	c.1804C>T; p.(Arg602Trp)	(Lewis et al. 1999)	c.3386G>T; p.(Arg1129Leu) del ex. 16	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
fRPN-134	^{a,b} RPN-	STGD	<i>ABCA4</i>	c.2588G>C; p.(Gly863Ala)	(Allikmets, Shroyer, et al.	c.3311T>C; p.(Leu1104Pro)	(Nassisi et al. 2018)

ID fam	ID pac/Sexo/E ¹	Fenotip	Gen	Alelo 1	Referencia	Alelo 2	Referencia
	291/M/39				1997)		
fRPN-187	^a RPN-410/M/40	STGD	<i>ABCA4</i>	c.2972G>T; p.(Gly991Val)	(Fujinami, Zernant, et al. 2013)	c.4253+4C>T; p.?	(Webster et al. 2001)
fRPN-173	^a RPN-342/H/30	STGD	<i>ABCA4</i>	c.3347C>T; p.(Ser1116Phe)	Novel	c.3386G>T; p.(Arg1129Leu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
fRPN-137	^a RPN-294/M/24	STGD	<i>ABCA4</i>	c.3386G>T; p.(Arg1129Leu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)	c.3386G>T; p.(Arg1129Leu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
fRPN-50	^a RPN-125/M/19 RPN-126/M/27	STGD	<i>ABCA4</i>	c.3386G>T; p.(Arg1129Leu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)	c.3988G>T; p.(Glu1330*)	(Rosa Riveiro-Alvarez et al. 2013)
fRPN-126	^a RPN-283/H/20	STGD	<i>ABCA4</i>	c.3386G>T; p.(Arg1129Leu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)	c.4253+5G>A; p.?	(Rivera et al. 2000)
fRPN-179	^a RPN-379/M/10	STGD	<i>ABCA4</i>	c.3386G>T; p.(Arg1129Leu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)	c.5714+1G>A; p.?	Novel
fRPN-219	RPN-507/M/14 ^a RPN-508/H/15	STGD	<i>ABCA4</i>	c.3386G>T; p.(Arg1129Leu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)	c.5819T>C; p.(Leu1940Pro)	(Paloma et al. 2001)
fRPN-199	^a RPN-445/M/48	STGD	<i>ABCA4</i>	c.3386G>T; p.(Arg1129Leu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)	c.5882G>A; p.(Gly1961Glu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)
fRPN-133	^a RPN-290/H/28	STGD	<i>ABCA4</i>	c.4457C>T; p.(Pro1486Leu)	(Lewis et al. 1999)	c.4457C>T; p.(Pro1486Leu)	(Lewis et al. 1999)
fRPN-206	^a RPN-463/M/27	STGD	<i>ABCA4</i>	c.5882G>A; p.(Gly1961Glu)	(Allikmets, Shroyer, et al. 1997)	c.5917delG; p.(Val1973*)	(Rivera et al. 2000)
fRPN-178	^a RPN-363/H/24	Best	<i>BEST1</i>	c.388C>A; p.(Arg130Ser)	(Meunier et al. 2011)	c.602T>C; p.(Ile201Thr)	(Lotery et al. 2000)
fRPN-39	^a RPN-106/H/9	^c Best	<i>BEST1</i>	c.602T>C; p.(Ile201Thr)	(Lotery et al. 2000)	c.637-2_637del; p.(Glu213del)	Novel
Casos ligados al X							
fRPN-NB	^a RPN-481/H/C RPN-569/H/ND RPN-576/H/2	RP	<i>RP2</i>	c.352C>T; p.(Arg118Cys)	(Bader et al. 2003)	-	-
fRPN-8	RPN-26/H/15 RPN-560/M/45 ^a RPN-60/M/40	RP	<i>RPGR</i>	c.1506+1; p.?	Novel	wt	-
fRPN-139	^a RPN-296/H/3 RPN-361/H/4 RPN-374/M/26 RPN-375/H/4	RP	<i>RPGR</i>	c.2296_2299del; p.(Gly766Asnfs*48)	Novel	wt	-
fRPN-45	^{a,b} RPN-116/H/10 ^b RPN-117/M/40	RP	<i>RPGR</i>	c.2357_2375del; p.(Lys786Thrfs*23)	(D. Y. Wang et al. 2005)	wt	-
fRPN-97	^b RPN-231/H/8 ^{a,b} RPN-230/M/40 RPN-440/M/NA	RP	<i>RPGR</i>	c.2442_2445del; p.(Gly817Lysfs*2)	(Vervoort et al. 2000)	wt	wt
fRPN-142	RPN-300/M/ND ^{a,b} RPN-301/H/10 RPN-302/H/6	RP	<i>RPGR</i>	c.247+2T>A	Novel	-	-

ID fam	ID pac/Sexo/E ¹	Fenotip	Gen	Alelo 1	Referencia	Alelo 2	Referencia
fRPN-174	^a RPN-343/H/24 RPN-488/M/67	RP	<i>RPGR</i>	c.2746del; p.(Glu916Lysfs*173)	Novel	- wt	
fRPN-158	^a RPN-323/H/6	RP	<i>RPGR</i>	c.914dup; p.(Asn305Lysfs*41)	(Carss et al. 2017)	-	

E¹: edad al diagnóstico; ^a Probandos; ^b pacientes con mutaciones adicionales (Ver Anexos, Tabla VIII.7); ^c pacientes reclasificados después del estudio genético.

Abreviaturas: ACL: amaurosis congenital de Leber; ACRM: acromatopsia; C: congénito; DC: distrofia de conos; DCB: distrofia de conos y bastones; DFVA: distrofia foveomacular viteliforme del adulto; DMB: distrofia macular de Best; DM STGD-like: distrofia macular STGD-like; DRIT: degeneración retiniana de inicio tardío; FA: fundus albipunctatus; ND: no disponible; RP: retinosis pigmentaria; STGD: enfermedad de Stargardt.

ANEXO 6. Artículos publicados

Ana Rodríguez-Muñoz, Elena Aller, Teresa Jaijo, Emilio González-García, Ana Cabrera-Peset, Roberto Gallego-Pinazo, Patricia Udaondo, David Salom, García-García G, Millán JM. Expanding the clinical and molecular heterogeneity of nonsyndromic inherited retinal dystrophies. *The Journal of Molecular Diagnostics*. In press.

Gema García García, Iker Sánchez Navarro, Elena Aller, Teresa Jaijo, Carla Fuster García, **Ana Rodríguez Muñoz**, Elena Vallejo, Juan Tellería, Selma Vázquez, Sergi Beltrán, Sophia Derdak, Olga Zurita, Cristina Villaverde Montero, Almudena Ávila Fernández, Marta Cortón, Fiona Blanco Kelly, Hakon Hakonarson, José María Millán, Carmen Ayuso. Exome sequencing identifies PEX6 mutations in three cases diagnosed with Retinitis Pigmentosa and hearing impairment. *Molecular Vision*. In press.

Rodríguez-Muñoz Ana, García-García García, Menor Francisco, Millán José María, Tomás-Vila Miguel, Jaijo Teresa. The importance of biochemical and genetic findings in the diagnosis of atypical Norrie disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 56(2), 229–235. 2018.

