



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**

TRABAJO FIN DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

***MECANISMOS DE MUERTE CELULAR
IMPLICADOS EN LA MUERTE DE LOS
FOTORRECEPTORES EN LA
RETINOSIS PIGMENTARIA***

Autora: RAQUEL GARCÍA GARCÍA

Tutora académica: M^a JOSÉ BAÑULS POLO

Tutora externa: REGINA RODRIGO NICOLÁS

Curso Académico: 2019/2020

Valencia, julio de 2020

Autora: RAQUEL GARCÍA GARCÍA

Tutora Académica: M^a JOSÉ BAÑULS POLO

Tutora Externa: REGINA RODRIGO NICOLÁS

Valencia, julio de 2020

Título: “MECANISMOS DE MUERTE CELULAR IMPLICADOS EN LA MUERTE DE LOS FOTORRECEPTORES EN LA RETINOSIS PIGMENTARIA”

“MECANISMES DE MORT CEL·LULAR IMPLICATS EN LA MORT DELS FOTORECEPTORS EN LA RETINOSI PIGMENTÀRIA”

RESUMEN

La retinosis pigmentaria (RP) comprende un conjunto de enfermedades de origen genético que provocan la muerte progresiva de las células fotorreceptoras de la retina. Primero tiene lugar la muerte celular de los fotorreceptores de tipo bastón. Esto conlleva la pérdida de la visión nocturna y reducción del campo visual de los pacientes. Conforme avanza la enfermedad también mueren los fotorreceptores de tipo cono, con la consiguiente reducción de la agudeza visual, resultando finalmente en una ceguera total.

Pese a que se engloba dentro del grupo de enfermedades raras por su prevalencia (1:4000), se trata de la distrofia hereditaria de retina más frecuente y constituye la principal causa genética de ceguera en el mundo desarrollado. Desgraciadamente, actualmente no existe una terapia efectiva que detenga la progresión de la enfermedad.

Los mecanismos de muerte celular implicados en la muerte de los fotorreceptores aún no han sido totalmente dilucidados. No obstante, se están haciendo grandes avances gracias a la investigación en modelos animales, especialmente en roedores y cerdos. Mientras que en un principio se proponía la apoptosis como vía de muerte celular principal en la RP, actualmente se están identificando marcadores de muerte celular no apoptótica en diversos modelos animales. La gran relevancia de establecer los mecanismos de muerte celular implicados en la enfermedad reside en la determinación de posibles dianas terapéuticas en sus rutas y, gracias a esto, el desarrollo de futuras estrategias de terapia dirigida efectivas.

Este trabajo de fin de grado tiene como objetivo la realización de una revisión bibliográfica de los avances en el esclarecimiento de los mecanismos de muerte celular que sufren los fotorreceptores en las distintas etapas de la RP.

Palabras clave: apoptosis | necroptosis | piroptosis | inflamasoma NLRP3 | mecanismos dependientes de caspasas | PARP | retinosis pigmentaria

Title: “CELL DEATH MECHANISMS INVOLVED IN PHOTORECEPTOR DEATH IN RETINITIS PIGMENTOSA”

ABSTRACT

Retinitis pigmentosa (RP) comprises a group of diseases with genetic origin that cause the progressive death of the photoreceptor cells of the retina. Firstly, cell death of rod-like photoreceptors takes place. This leads to loss of night vision and reduction of the visual field of the patients. As the disease progresses, cone-type photoreceptors also die, with the consequent reduction in visual acuity, eventually resulting in total blindness.

Despite being included in the group of rare diseases due to its prevalence (1:4000), it is the most frequent inherited retinal dystrophy and the main genetic cause of blindness in the developed world. Unfortunately, there is currently no effective therapy to stop the progression of the disease.

The mechanisms of cell death involved in the death of photoreceptors have not been fully elucidated yet. Nevertheless, great strides are being made thanks to research in animal models, especially in rodents and pigs. Whereas apoptosis was originally proposed as the primary cell death pathway in RP, markers of non-apoptotic cell death are currently being identified in various animal models. The great relevance of establishing the cell death mechanisms involved in the disease lies in the determination of possible therapeutic targets in their pathways in order to develop future effective targeted therapy strategies.

The aim of this project is to conduct a bibliographic review of the advances clarifying the mechanisms of cell death that photoreceptors undergo in the different stages of RP.

Key words: apoptosis | necroptosis | pyroptosis | NLRP3 inflammasome | caspase-dependent mechanisms | PARP | retinitis pigmentosa

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN: MECANISMOS DE MUERTE CELULAR..... | 1 |
| 1.1. APOPTOSIS | 1 |
| 1.1.1. Vía extrínseca..... | 2 |
| 1.1.2. Vía intrínseca..... | 2 |
| 1.1.3. Vía mediada por estrés del retículo endoplasmático | 3 |
| 1.2. NECROSIS | 5 |
| 1.2.1. Necroptosis..... | 5 |
| 1.2.2. Piroptosis..... | 6 |
| 2. RETINOSIS PIGMENTARIA..... | 8 |
| 2.1. GENÉTICA..... | 8 |
| 2.2. SIGNOS Y SÍNTOMAS | 10 |
| 2.3. TRATAMIENTOS..... | 11 |
| 3. ANIMALES MODELO DE RP | 13 |
| 4. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR EN RP | 15 |
| 4.1. APOPTOSIS | 15 |
| 4.2. MUERTE MEDIADA POR CALPAÍNAS | 16 |
| 4.3. NECROSIS: NECROPTOSIS Y PIROPTOSIS | 17 |
| 4.4. PARTHANATOS | 19 |
| 4.5. AUTOFAGIA | 20 |
| 4.6. IMPLICACIÓN EN LA RP | 20 |
| 5. FACTORES QUE MODULAN LA MUERTE CELULAR EN RP | 22 |
| 5.1. FACTORES TRÓFICOS Y NEUROTÓXICOS | 22 |
| 5.2. ESTRÉS OXIDATIVO | 25 |
| 5.3. INFLAMACIÓN..... | 26 |
| 6. CONCLUSIONES | 28 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 29 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|--|
| AAV2 | virus adeno-asociado serotipo 2 |
| AIF | factor inductor de apoptosis |
| Apaf-1 | <i>apoptosis protease-activating factor-1</i> |
| ATP | adenosina 5'-trifosfato |
| BSG-1 | basigin-1 |
| CAD | ADNasa activada por caspasa |
| CGR | células ganglionares de la retina |
| CNGA1 | <i>cyclic nucleotide gated channel subunit alpha 1</i> |
| CNGA1 | <i>cyclic nucleotide gated channel subunit alpha 1</i> |
| CNTF | factor neurotrófico ciliar |
| DAMPS | <i>damage-associated molecular patterns</i> |
| DEDs | dominio efector de muerte |
| DISC | complejo de señalización inductor de muerte |
| DR5 | receptor de muerte 5 |
| FADD | <i>Fas-associated death domain protein</i> |
| GLUT-1 | transportador de glucosa 1 |
| HDAC | histona deacetilasa |
| HMGB1 | <i>high-mobility group box 1 protein</i> |
| IAPs | proteínas inhibidoras de apoptosis |
| JNK | quinasas c-Jun N-terminal |
| LAMP2 | proteína de membrana 2 asociada al lisosoma |
| MLKL | <i>mixed-lineage kinase domain-like</i> |
| MOMP | permeabilización de la membrana mitocondrial externa |
| PAR | poli ADP ribosa |
| PARP-1 | poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 |
| PDE6 | fosfodiesterasa 6 |
| RdCVF | <i>rod-derived cone viability factor</i> |
| RE | retículo endoplasmático |
| RETGC1 | <i>retinal guanylate cyclase-1</i> |
| RHO | rodopsina |
| RIPK | <i>receptor-interacting protein kinase</i> |
| RNS | especies reactivas del nitrógeno |
| ROS | especies reactivas de oxígeno |
| RP | retinosis pigmentaria |
| SAG | arrestina |
| SOD3 | superóxido dismutasa extracelular |
| TLR | receptores tipo Toll |
| TNFα | factor de necrosis tumoral α |
| TRADD | <i>TNF receptor-associated death domain protein</i> |
| TRAF2-ASK1 | <i>TNF receptor-associated factor 2-apoptosis signal-regulating kinase 1</i> |
| UPR | respuesta a proteínas desplegadas |
| VDAC2 | <i>voltage dependent anion channel 2</i> |

1. INTRODUCCIÓN: MECANISMOS DE MUERTE CELULAR

La muerte celular es un proceso esencial para el mantenimiento de la homeostasis de los organismos eucariotas. No obstante, si no es regulada correctamente puede resultar perjudicial para el individuo, dando lugar a diversas patologías. Existen diferentes mecanismos de muerte celular, pudiendo ser esta programada y ejecutada limpiamente, como es el caso de la apoptosis, o, por el contrario, traumática, inflamatoria y repentina, como ocurre en muchos tipos de necrosis (Nirmala y Lopus, 2019).

Entender los mecanismos de muerte celular puede ser crucial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra enfermedades proliferativas, degenerativas, infecciosas y autoinmunes (Nirmala y Lopus, 2019). En esta revisión nos centraremos en los mecanismos que tienen lugar en las diferentes fases de la retinosis pigmentaria, con el objetivo de una posible aplicación clínica futura. Para ello, primeramente, debemos conocer las características que definen a cada una de estas vías de muerte celular.

1.1. APOPTOSIS

La apoptosis es una “muerte celular programada” que tiene un papel fundamental tanto en condiciones fisiológicas como en patológicas. Este proceso puede iniciarse debido a señales extracelulares (factores de muerte celular) o alteraciones intracelulares como ADN dañado o estrés oxidativo (Pecorino, 2012). Puede ejecutarse por tres rutas diferentes no excluyentes: la vía extrínseca, la vía intrínseca y la vía mediada por estrés del retículo endoplasmático (RE) ([Figura 1](#)). Todas ellas son consideradas muertes programadas dependientes de caspasas. Esto se debe a que en todas se encuentran implicadas las proteasas de cisteína llamadas caspasas, las cuales cortan las proteínas diana tras un residuo de ácido aspártico (Nirmala y Lopus, 2019). Las caspasas son sintetizadas en una forma inactiva (pro-caspasas) y necesitan ser cortadas en residuos de aspartato para su activación. De este modo, pueden participar en cascadas de activación donde una caspasa activa a otra en cadena (Pecorino, 2012).

Las manifestaciones morfológicas que caracterizan a este tipo de muerte celular incluyen la reducción del volumen celular, el desensamblaje del citoesqueleto y la envoltura nuclear y la condensación de la cromatina nuclear. El ADN es cortado por una endonucleasa en fragmentos de 200bp o múltiplos de este, dando lugar a un patrón de escalera tras su electroforesis. Asimismo, la membrana plasmática se desestabiliza, generando protrusiones y cuerpos apoptóticos (parte del citoplasma rodeado de membrana) que envuelven la ahora fragmentada célula. Estos cuerpos apoptóticos son rápidamente fagocitados por macrófagos u otras células fagocíticas que han sido atraídas por los nucleótidos liberados por la célula apoptótica actuando como señalizadores como el ATP o el UTP. Este proceso se denomina eferocitosis (Baeza-Martín, 2014; Galluzzi *et al.*, 2018; Nirmala y Lopus, 2019). De este modo, se procura que la muerte celular ocurra con la mínima liberación de componentes celulares e inflamación (Lemasters, 2017). Gracias a esta evasión de la inflamación y la rápida eliminación de las células tras su muerte, la apoptosis destaca por la ausencia de daño, ya sea sistémico o localizado, de otras células. Si el proceso no es llevado a cabo adecuadamente, la célula apoptótica puede sufrir una necrosis secundaria (Nirmala y Lopus, 2019).

1.1.1. Vía extrínseca

La vía extrínseca se inicia con la unión de ligandos (factores de muerte), como la citoquina factor de necrosis tumoral α (TNF α) y Fas, a receptores de muerte transmembrana. Mientras que el TNF α es un factor soluble, Fas está unido a la membrana plasmática de células vecinas (Pecorino, 2012). Entre el grupo de receptores de muerte celular se encuentra el receptor FAS y miembros de la superfamilia de receptores TNF α como TNFR1, TRAILR1 y TRAILR2 (Galluzzi *et al.*, 2018).

La unión del ligando provoca el cambio conformacional y oligomerización de los receptores, lo que permite la transducción de la señal al interior celular. Los dominios citoplasmáticos de estos receptores quedan expuestos, permitiendo el reclutamiento de proteínas adaptadoras como *Fas-associated death domain protein* (FADD) y *TNF receptor-associated death domain protein* (TRADD) que contienen los correspondientes dominios de muerte. Los dominios efectores de muerte (DEDs) de los adaptadores constituyen sitios de unión para procaspasas-8 iniciadoras. Tras su reclutamiento, estas procaspasas pasan a encontrarse muy próximas unas de las otras, por lo que son capaces de activarse mutuamente dado que preservan una baja actividad en su forma inactiva. El complejo formado por los ligandos de muerte celular, receptores, adaptadores y caspasas iniciadoras se conoce como complejo de señalización inductor de muerte (DISC). A continuación, este complejo inicia la cascada de activación de caspasas, activando de este modo las caspasas ejecutoras (caspasa-3, -6 y -7) ([Figura 1a](#)). Estas últimas ejecutarán la muerte celular mediante la escisión de proteínas específicas como lamininas nucleares que permiten la contracción nuclear, proteínas del citoesqueleto como actina, filamentos intermedios para la reestructuración celular y, quinasas para la señalización celular. Además, las caspasas ejecutoras activarán ADNasas, otras proteínas diana de las caspasas, que provocarán la ruptura de la cromatina. Las ADNasas activadas cortan el ADN entre nucleosomas generando un patrón de múltiplos de 180bp, que ha sido determinado como marcador de apoptosis (Nirmala y Lopus, 2019; Pecorino, 2012).

1.1.2. Vía intrínseca

También llamada vía mitocondrial. A diferencia de la vía anterior, esta no depende de una señalización externa. Por el contrario, requiere estímulos procedentes del interior celular, como daño en el ADN o estrés oxidativo (Pecorino, 2012).

Esta vía se encuentra regulada por la familia de proteínas Bcl-2, que a su vez se subdivide en dos subfamilias según tengan actividad pro-apoptótica o anti-apoptótica. Todas ellas poseen al menos uno de los dominios homólogos (BH1, BH2, BH3 y BH4) que median las interacciones entre proteínas (Galluzzi *et al.*, 2018). Dentro de las proteínas anti-apoptóticas se encuentran Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1, Bcl2A1 y Bcl-B, que ejercen su función por unión directa a las proteínas pro-apoptóticas (Baeza- Martín, 2014). Por otro lado, en el grupo de proteínas pro-apoptóticas tenemos proteínas multidominio o efectoras (Bax, Bak, Bok) y las proteínas “solo BH3” (Bik, HRK, Bim, Bad, Bid, PUMA, NOXA, BMF), que se caracterizan por presentar un único dominio BH, siendo este BH3. El balance entre la actividad pro y anti-apoptótica regula esta vía (Pecorino, 2012).

En condiciones fisiológicas, Bak se sitúa en la capa bilipídica de la membrana mitocondrial externa mediante su interacción con el canal *voltage dependent anion channel 2* (VDAC2). Por el contrario, Bax se encuentra mayoritariamente en el citoplasma, donde presenta una conformación monomérica quiescente o dimerica inactiva. En respuesta a estímulos

apoptóticos, Bid y Bim, se activan mediante su unión a la proteína Bax. Tras su activación, Bax sufre un cambio conformacional y se transloca del citoplasma a la mitocondria, insertándose en la membrana externa mitocondrial. Tras su inserción en esta membrana, se produce la oligomerización de seis a ocho moléculas. También se ha sugerido una posible oligomerización con Bak. De este modo, las proteínas Bax y Bak provocan la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) mediante la formación de poros, facilitando la liberación de mediadores apoptóticos, como el citocromo c, desde el espacio intermembrana de la mitocondria al citoplasma. MOMP se considera el punto de no retorno de esta vía (Galluzzi *et al.*, 2018; Nirmala y Lopus, 2019; Pecorino, 2012). La ruta de Bak y Bax no es la única que permite la permeabilización de la membrana mitocondrial. Las moléculas “solo BH3” Bim y PUMA, junto con la presencia de Bak en el retículo endoplasmático, pueden inducir el mismo resultado (Baeza-Martín, 2014).

Una vez liberados gracias a la permeabilización de la membrana mitocondrial, el citocromo c se asocia con *apoptosis protease-activating factor-1* (Apaf-1) en el citoplasma, facilitando la reclusión de la procaspasa-9 mediante dominios CARD, presentes tanto en Apaf-1 como en las procaspasas. La unión del citocromo c, la procaspasa-9 y la proteína Apaf-1 forma un complejo llamado apoptosoma. En el apoptosoma, la procaspasa-9 es activada. La caspasa-9 iniciadora activa a su vez a otras caspasas efectoras, como la caspasa-3, -6 y -7 (Nirmala y Lopus, 2019; Pecorino, 2012) ([Figura 1a](#)).

Mientras la liberación de citocromo c tiene lugar, también se produce la liberación de una segunda molécula, Smac/DIABLO, que bloquea las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP), que sino desactivarían a la caspasa-9 (Nirmala y Lopus, 2019). La transcripción de IAPs es inducida por el factor de transcripción NFκB (Pecorino, 2012).

Además, la mitocondria libera otras proteínas apoptóticas como el factor inductor de apoptosis (AIF) y la endonucleasa G. AIF se transloca al núcleo, donde facilita la fragmentación del ADN y la condensación de la cromatina. Después de este proceso, llamado “etapa I” de la condensación de la cromatina o condensación en anillo, la endonucleasa G se transloca al núcleo, resultando en una acción mayor de la fragmentación del ADN. Por último, es la ADNasa activada por caspasa (CAD) la que se transloca al núcleo, dando paso a la “etapa II” de condensación o collar de condensación (Nirmala y Lopus, 2019).

1.1.3. Vía mediada por estrés del retículo endoplasmático

Cuando las rutas para reestablecer la proteostasis resultan insuficientes, se inicia la apoptosis. La acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático (RE) puede deberse a infecciones, hipoxia, limitación de nutrientes, determinados químicos o cambios no-homeostáticos en las funciones secretoras de este orgánulo (Nirmala y Lopus, 2019).

Esta ruta depende de la comunicación del RE y las mitocondrias regulada por el Ca^{2+} y el principal componente de vigilancia del estrés del RE, IRE1 (Baeza-Martín, 2014). Tras la detección del estrés, varios mecanismos están involucrados en la inducción de esta apoptosis: caspasa-12, *TNF receptor-associated factor 2-apoptosis signal-regulating kinase 1* (TRAF2-ASK1), quinasas c-Jun N-terminal (JNK) y la cascada de señalización p38-MAPK. A continuación, veremos cómo contribuye cada una de estas vías en la inducción de la muerte celular. La ruta JNK inhibe la proteína anti-apoptótica Bcl-2 mientras que activa la proteína pro-apoptótica Bim. Por otra parte, p38-MAPK activa la proteína CHOP, la cual incentiva la

expresión de proteínas pro-apoptóticas como TRIB3, GADD-34, TNF α y el receptor de muerte 5 (DR5). Esta ruta induce apoptosis dependiente de caspasa-8. Asimismo, al igual que el mecanismo mencionado anteriormente, CHOP actúa inhibiendo la transcripción de Bcl-2 y promoviendo la expresión de Bim (Nirmala y Lopus, 2019) ([Figura 1b](#)).

La vía de apoptosis mediada por estrés del RE resulta importante ya que participa en una gran variedad de enfermedades: Alzheimer, Parkinson, retinosis pigmentaria, glaucoma, degeneración macular, enfermedades inflamatorias, metabólicas y tumorigénesis (Nirmala y Lopus, 2019).

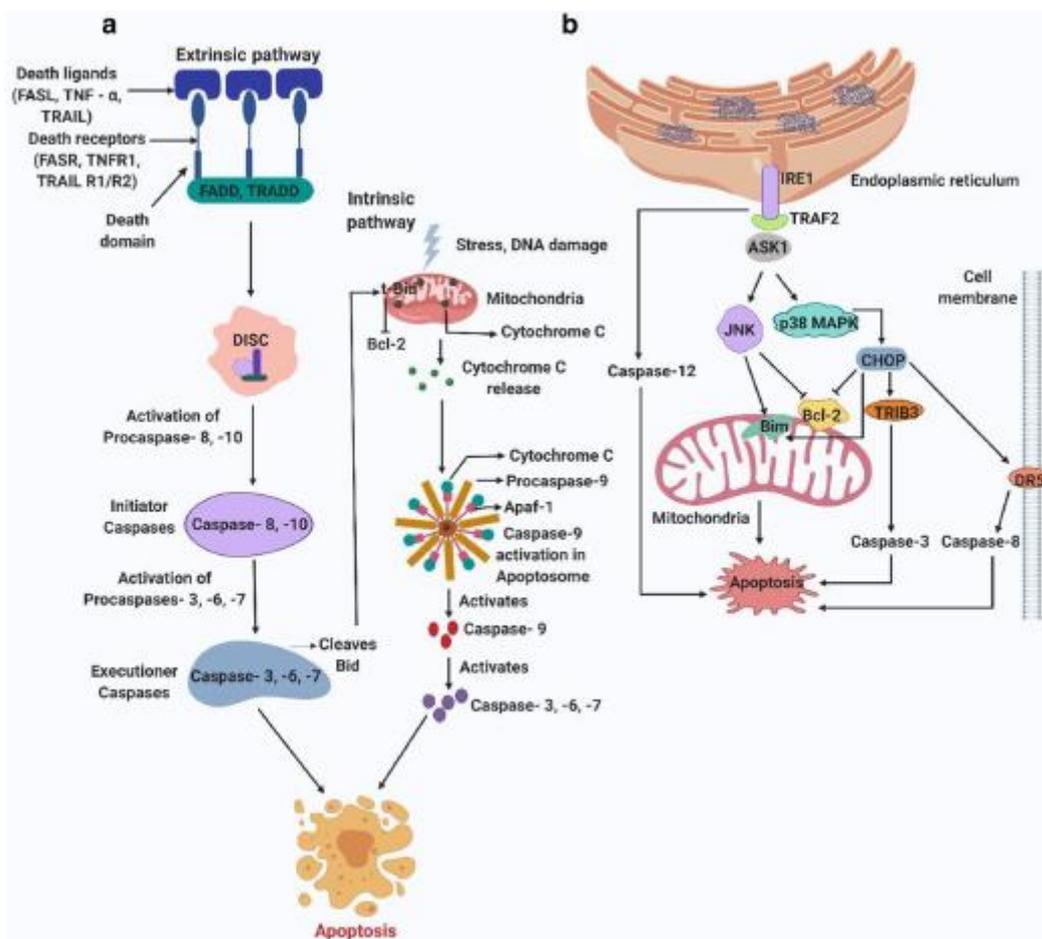


Figura 1. Rutas de señalización de la apoptosis. (a) Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis. La vía extrínseca está regulada por receptores de muerte celular (TNFR1, FASR y TRAILR1/2). La unión de sus ligandos (TNF α , FAS y TRAIL) promueve el reclutamiento de proteínas adaptadoras y procaspasas iniciadoras (procaspasas-8 y -10), formando el complejo de señalización inductor de muerte celular DISC. Las caspasas iniciadoras activan caspasas ejecutoras (caspasas-3, -6 y -7). Por otra parte, la vía intrínseca es iniciada por la detección de estrés celular, siendo su paso esencial la permeabilización de la membrana por proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2. Esto conlleva la liberación de factores pro-apoptóticos al citoplasma. El citocromo c liberado se asocia con Apaf-1 formando el apoptosoma, que activa la caspasa 9, y esta continúa activando las caspasas ejecutoras de apoptosis. (b) Vía inducida por estrés del retículo plasmático: iniciada por la acumulación de proteínas mal plegadas. IRE1 recluta las proteínas TRAF2 y ASK1. La muerte celular se lleva a cabo por cascadas de señalización de JNK (activa Bim e inhibe Bcl-2) y p38-MAPK (activa CHOP: incita la expresión de proteínas pro-apoptóticas como GADD34, TRIB3 y DR5, activa Bim, e inhibe Bcl-2) (Nirmala y Lopus, 2019).

1.2. NECROSIS

Al contrario que la apoptosis, la necrosis constituye una forma de “muerte celular no programada” o “no regulada”. Se caracteriza por la ruptura de la membrana celular y la inflamación. Es el resultado de una disrupción importante en el entorno, como una isquemia (pérdida del flujo sanguíneo) o daños severos inducidos por tóxicos (Lemasters, 2017).

Durante la necrosis, la integridad de la membrana plasmática se compromete y los contenidos celulares son liberados al medio extracelular (Nirmala y Lopus, 2019). Los cambios morfológicos que sufre la célula durante la necrosis incluyen la formación de protuberancias de membrana plasmática, la hinchazón de las mitocondrias, la dilatación de las cisternas del retículo endoplásmico y las membranas nucleares, la disociación de polisomas y la inflamación celular, que resulta en la ruptura de la membrana plasmática y la liberación del contenido intracelular (Baeza-Martín, 2014; Lemasters, 2017). La lisis celular provoca la respuesta inflamatoria, atrayendo a neutrófilos y monocitos a la zona del tejido afectada para eliminar la debris celular mediante fagocitosis (Lemasters, 2017).

Los factores que condicionan si la muerte celular es ejecutada vía apoptosis o vía necrosis no se conocen en su totalidad. No obstante, se ha establecido que los altos niveles de ROS, la inhibición de caspasas y los bajos niveles de ATP favorecen la necrosis (Nirmala y Lopus, 2019). El daño en el DNA causado por ROS puede activar en exceso a las poli (ADP-ribosa) polimerasas (PARP), especialmente a PARP-1, resultando en una depleción de ATP y, finalmente, necrosis. Asimismo, el aumento del nivel de Ca^{2+} intracelular y el estrés oxidativo provocan la permeabilización de la membrana mitocondrial, con un aumento del influjo moléculas en la mitocondria. Esto conduce a la entrada de agua en la mitocondria, la despolarización irreversible de la membrana mitocondrial, la pérdida de ATP y la hinchazón, que finalmente ocasiona la ruptura de la membrana mitocondrial externa y la liberación de proteínas intermembrana al citoplasma. A pesar de que con ello muchas moléculas pro-apoptóticas son liberadas, la rápida depleción de ATP conduce a la célula al proceso de necrosis (Baeza-Martín, 2014; Nirmala y Lopus, 2019).

Existen determinados mecanismos de muerte celular que presentan características similares a la necrosis pero que se encuentran reguladas por cascadas de señalización, inductores externos o internos y mediadores. Todos ellos mantienen en común la ruptura de la membrana celular. La necroptosis y la piroptosis son ejemplos de estos procesos de necrosis programada (Nirmala y Lopus, 2019).

1.2.1. Necroptosis

La necroptosis es una forma de necrosis programada. Se caracteriza por la inflamación de las células, la disfunción de las mitocondrias, la permeabilización de la membrana plasmática y la liberación del contenido citoplasmático provocando una respuesta inflamatoria (Baeza-Martín, 2014). Se induce por la detección de perturbaciones en el microambiente extra o intracelular por receptores específicos, entre los que se encuentran, al igual que en la apoptosis, FAS y TNFR1 (Galluzzi *et al.*, 2018). La unión del ligando $TNF\alpha$ a TNFR1 forma un complejo en la parte citosólica de receptor, constituido por proteínas como TRAFF2/5, RIPK1 Y TRADD. A continuación, puede desembocar en tres destinos diferentes. Por un lado, si la ubiquitinación de RIPK1, mediada por cIAPs) y TRAFF2/5, prevalece, la muerte celular se interrumpe. Por otro lado, si prevalece la inhibición de cIAP y la desubiquitinación de RIPK1, se produce la activación de la caspasa-8, resultando en apoptosis. No obstante, si la caspasa-8 es bloqueada,

RIPK1 y RIPK3 forman el complejo llamado necrosoma, que después fosforilará a la proteína *mixed-lineage kinase domain-like* (MLKL). Esto aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) dependiente de mitocondrias. Más tarde, MLKL se translocará a la membrana plasmática, uniéndose a los fosfolípidos cargados negativamente, comprometiendo la integridad de la membrana, lo que resulta en lisis y muerte celular (Lemasters, 2017; Nirmala y Lopus, 2019) (Figura 2).

A diferencia de la apoptosis, la necroptosis induce inflamación (necroinflamación), presentada frecuentemente en enfermedades neurodegenerativas, y produce una respuesta inmune para la eliminación de virus o tumores, al igual que otras formas de necrosis. Además, en la necroptosis el ADN se encuentra degradado aleatoriamente (Lemasters, 2017; Nirmala y Lopus, 2019).

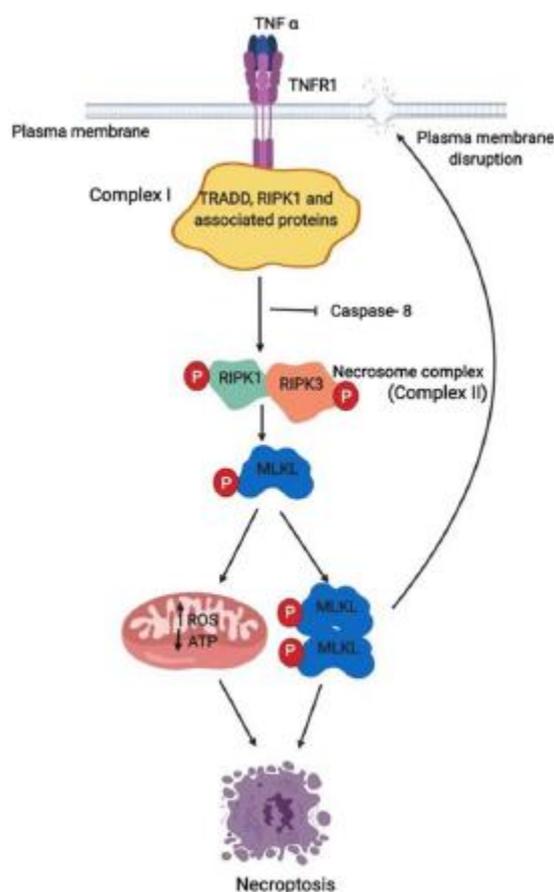


Figura 2. Proceso de muerte celular por necroptosis. La unión del ligando TNF α al receptor TNFR1 produce la formación del complejo de señalización I (TRADD, PIPK1 y otras proteínas asociadas). Su curso natural sería la inducción de apoptosis. Sin embargo, la falta de caspasa-8 activada, RIPK1 desestabiliza el complejo vía desubiquitinación. RIPK1 y RIPK3 son posteriormente fosforilados, dando lugar al necrosoma. Este último complejo fosforilará MLKL, provocando su oligomerización y, con ello, la desestabilización de la membrana plasmática al igual que un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y una disminución del ATP (Nirmala y Lopus, 2019).

1.2.2. Piroptosis

Al igual que la necroptosis, constituye una forma de necrosis regulada. Principalmente se induce por alteraciones extra o intracelulares relacionadas con la inmunidad innata, como pudiera ser

2. RETINOSIS PIGMENTARIA

La retinosis pigmentaria (RP) engloba un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias caracterizadas por la degeneración progresiva de los fotorreceptores presentes en la retina. A pesar de ser una enfermedad rara debido a su prevalencia (actualmente se estima una prevalencia mundial de 1:4000, con más de 1,5 millones de personas afectadas en total), se posiciona como la distrofia hereditaria de retina más frecuente y principal causa genética de ceguera en los países desarrollados (O'Neal y Luther, 2020; Verbakel *et al.*, 2018).

En las primeras etapas, afecta a los bastones, resultando en una pérdida de la visión nocturna y visión periférica. Conforme avanza la enfermedad, los conos comienzan su degeneración gradual, lo que conlleva la pérdida de agudeza visual y disminución de la visión central, finalmente pudiendo resultar en la pérdida total de la visión (O'Neal y Luther, 2020).

La RP puede darse de manera individual (lo que se conoce como no sindrómica o simple), en conjunto con otras patologías neurosensoriales como audición reducida (siendo en este caso sindrómica) o asociada con defectos en diversos tejidos (sistémica) (Campochiaro y Mir, 2018).

La denominación retinosis pigmentaria (“*retinitis pigmentosa*” en inglés) fue acuñada por primera vez por el oftalmólogo holandés F.C. Donders en 1857. No obstante, había sido previamente descrita en 1853 por su compañero A.C. van Trigt gracias al uso de un oftalmoscopio, inventado tan solo unos años antes por H. von Helmholtz (1851). Algunas formas de degeneración de la retina similares habían sido reportadas incluso antes. Por ejemplo, R.F. Ovelgún observó una ceguera nocturna en 1744. Asimismo, M. Schon y F.A. von Ammon describieron pacientes con una visión pobre y lesiones de la retina pigmentadas a principios del siglo XIX (Verbakel *et al.*, 2018). Donders asignó el término “*retinitis*” ya que en un principio se atribuyó la inflamación como causa importante en la patogénesis de la RP. No fue hasta 1872, cuando Landolt sugirió la degeneración de los fotorreceptores como causante de la enfermedad. Más tarde, varios investigadores propusieron una etiología vascular. Sin embargo, las evidencias sostienen la teoría de Landolt, mientras que se ha concluido que la disminución vascular característica de la RP es un efecto de la misma y no una causa (Pruett, 1983). A pesar de que se reconoció los defectos genéticos como causa primaria, el término “*retinitis*” se conservó (Yoshida *et al.*, 2013b). No obstante, hoy en día las evidencias clínicas que demuestran la implicación de la respuesta inflamatoria en la degeneración de los fotorreceptores en individuos que padecen RP son elevadas.

2.1. GENÉTICA

La RP presenta una elevada heterogeneidad genética debido a la gran variabilidad de las mutaciones responsables en multitud de genes. No fue hasta la revolución genética molecular cuando se desveló la gran heterogeneidad que existía entre los pacientes diagnosticados bajo el nombre de RP (Shen *et al.*, 2005).

Hasta la fecha, se han descrito alrededor de 100 genes asociados con esta enfermedad (RetNet - Retinal Information Network). La mayoría de los genes identificados se expresan exclusivamente en los bastones. Es por esto que la consiguiente degeneración de este tipo de fotorreceptores resulta esperada, mientras que la causa de la muerte secundaria de los conos resulta más compleja de elucidar (Murakami *et al.*, 2012). Muchos de ellos son genes que codifican productos implicados en el proceso de fototransducción, el ciclo visual, la estructura

de los fotorreceptores (especialmente de los cilios) o en la transcripción de genes en las células fotorreceptoras (Campochiaro y Mir, 2018; Viringipurampeer *et al.*, 2019; Wright *et al.*, 2010). Por lo general, las mutaciones suelen dar lugar a productos dañinos para los propios bastones o tratarse de mutaciones homocigóticas que resultan en la falta de un producto esencial (Shen *et al.*, 2005). Algunos de los genes identificados como responsables de la RP son los que codifican las subunidades catalíticas de la fosfodiesterasa 6 (PDE6 α y PDE6 β), el canal *cyclic nucleotide gated channel subunit alpha 1* (CNGA1), la *retinal guanylate cyclase-1* (RETGC1), la arrestina (SAG) o la rodopsina (RHO) (Cottet y Schorderet, 2009). Las mutaciones en el gen de la RHO son la principal causa de RP autosómica dominante, responsables del 30-40% de casos. Más de 120 mutaciones han sido identificadas en este gen. La RHO es la proteína más abundante en la retina. Se sintetiza en el RE de los bastones y requiere modificaciones post-translacionales y un plegamiento adecuado (Cottet y Schorderet, 2009; Viringipurampeer *et al.*, 2016; 2019).

Debido a la complejidad genética, no se han podido establecer correlaciones evidentes entre el genotipo y el fenotipo. No solo presenta una gran variedad de mutaciones, sino que, además, diferentes mutaciones en el mismo gen pueden causar diferentes enfermedades y las mismas mutaciones pueden resultar en distintos fenotipos incluso en caso inter-familiares. Esto podría explicarse por la influencia de diferencias en genes modificantes que alteran procesos bioquímicos en mecanismos implicados en la muerte de los fotorreceptores. Del mismo modo, también se ha sugerido que las diferencias medioambientales también podrían contribuir (Campochiaro y Mir, 2018).

A pesar de que la amplia variabilidad genética supone una gran dificultad para la identificación de las mutaciones causantes de RP, es conveniente tratar de identificar la mutación responsable en cada paciente ya que aporta información pronóstica, además de ser útil para futuras terapias como la terapia génica (Campochiaro y Mir, 2018).

Los casos no sindrómicos o simples, pueden presentar una herencia autosómica dominante (20-25%), autosómica recesiva (15-20%), recesiva ligada al cromosoma X (10-15%), o puede resultar de mutaciones espontáneas (30%). El 5% puede tener un comienzo temprano y se engloba como parte de la Amaurosis congénita de Leber (LCA). No obstante, también existen casos raros en los que se da una herencia dominante ligada al cromosoma X, mitocondrial y digénica (en formas donde se dan mutaciones en dos genes diferentes) (Ferrari, 2011). Asimismo, podemos encontrar formas de RP sindrómica que implican numerosos órganos además del ojo y efectos pleiotrópicos o casos sistemáticos donde RP es secundaria a otra patología, como el síndrome de Usher y el síndrome de Bardet-Biedl. Aproximadamente el 20-30% de los pacientes con RP presentan una enfermedad no ocular asociada. En esos casos, se clasificaría como RP sindrómica (Ferrari, 2011). El pronóstico de los pacientes con RP depende principalmente de la edad de comienzo de la enfermedad y el patrón de herencia. Un comienzo temprano de esta ceguera nocturna pronostica una progresión más rápida de la enfermedad, y, con ello, de la pérdida de visión. La forma autosómica recesiva de la RP se caracteriza por una aparición temprana de los síntomas y una pérdida de visión significativa. Por otra parte, la forma autosómica dominante destaca por ser menos severa y más gradual, con un comienzo de los síntomas en la adultez. La forma recesiva ligada al cromosoma X destaca por ser la más severa (O'Neal y Luther, 2020).

2.2. SIGNOS Y SÍNTOMAS

A pesar de su elevada heterogeneidad genética y clínica, existe una secuencia de eventos propios de la RP similar en todos los casos. Sin embargo, la velocidad de la progresión varía significativamente entre individuos, incluso entre familiares (Shen *et al.*, 2005).

La atenuación de los vasos sanguíneos retinianos, la palidez del disco óptico y los depósitos visibles de pigmento en la retina son los signos oftalmológicos más comunes (Flores-Rodríguez *et al.*, 2013) (Figura 4). La degeneración de los fotorreceptores suele ir acompañada de la proliferación del epitelio pigmentario de la retina, dando lugar a la aparición de los depósitos de los pigmentos mencionados. La asignación del término pigmentosa se debe a esta característica (Shen *et al.*, 2005).

Los síntomas característicos incluyen nictalopía o ceguera nocturna, seguida de una disminución progresiva del campo visual periférico, resultando en la conocida visión túnel y, finalmente, ceguera total por pérdida de la visión central. En la mayoría de casos comienzan en la adolescencia, progresando hasta llegar a un déficit visual severo a los 40-50 años (Ferrari *et al.*, 2011). Para entender el fenotipo resultante, primero debemos comprender la función de los distintos tipos de fotorreceptores. Los bastones son los responsables de la visión en condiciones de iluminación tenue, es decir, la visión nocturna acromática. Por otra parte, los conos son los encargados de la visión central y la percepción del color. Al ser los bastones los primeros fotorreceptores afectados, el primer síntoma que se experimenta es la pérdida de la capacidad de visión nocturna y, posteriormente, la reducción del campo visual periférico. Muchos pacientes no son conscientes de su patología hasta esta etapa, ya que en estadios tempranos podían desempeñar su vida de manera normal. Como se ha mencionado anteriormente, conforme progresa la enfermedad, generalmente transcurridos unos años, comienza la muerte celular secundaria de los fotorreceptores de tipo cono. Esto deriva en una reducción gradual de la agudeza visual que puede llevar finalmente a la ceguera (Campochiaro y Mir, 2018).

El diagnóstico clínico se basa en la presentación de los síntomas característicos (ceguera nocturna y pérdida del campo visual periférico), lesiones de fondo de ojo, y su empeoramiento con el tiempo. Generalmente, las pruebas médicas utilizadas para su detección son la medida de campo visual, el electroretinograma, la adaptación a la oscuridad, la angiografía fluoresceínica y la tomografía de coherencia óptica (Flores-Rodríguez *et al.*, 2013). Sin embargo, la variabilidad fenotípica y la naturaleza progresiva de la enfermedad, complican el diagnóstico. Por ello, el diagnóstico molecular está ganando relevancia progresivamente (Salmaninejad *et al.*, 2019). Los análisis genéticos pueden ser útiles para la confirmación del diagnóstico y se llevan a cabo para las mutaciones más comunes de RP. Además, provee una caracterización de la enfermedad más específica e información de su pronóstico. Gracias al avance de las técnicas de secuenciación, se ha disminuido su coste y se ha aumentado su rendimiento. No obstante, el análisis genético supone un reto dada la amplia heterogeneidad de la RP, siendo especialmente costoso en los casos en los que se desconoce el patrón de herencia (Chang *et al.*, 2011).

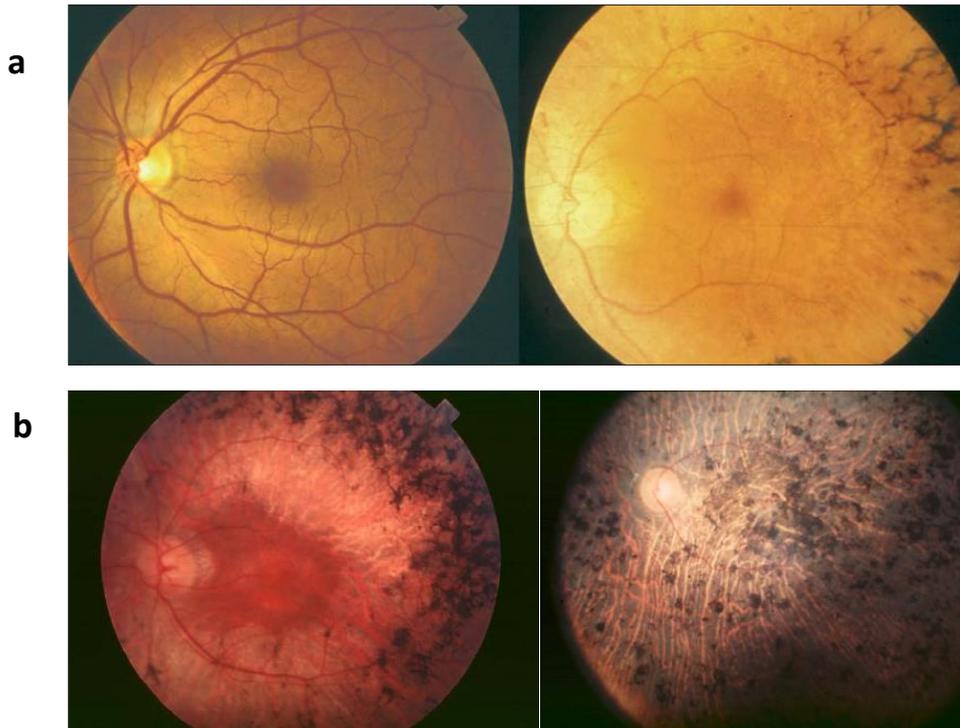


Figura 4. Fondo de ojo de un individuo sano y de pacientes con retinitis pigmentaria (RP). (a) Comparativa del fondo de ojo de un individuo sano (izquierda) y un paciente con RP (derecha). El ojo que padece RP presenta una palidez del disco óptico, depósitos de pigmento en la periferia de la retina en forma de espículas óseas y una atenuación de las arterias retinianas (Hartong *et al.*, 2006). (b) Comparativa del fondo de ojo entre pacientes con retinitis pigmentaria en etapa media (izquierda) y tardía (derecha) de la enfermedad. En la muestra de etapa media, los depósitos de pigmento se encuentran en la periferia de la retina, la mácula se preserva, excepto por una despigmentación en anillo en su periferia, y los vasos sanguíneos están atenuados. La muestra de etapa terminal presenta depósitos de pigmento en toda la retina, el disco óptico empalecido y vasos extremadamente delgados (Hamel, 2006).

2.3. TRATAMIENTOS

Hasta la fecha no se conoce una terapia efectiva que detenga la evolución de la RP o que reestablezca los fotorreceptores. Recientemente, los avances en el conocimiento de la genética de la RP han permitido el desarrollo de nuevas terapias. Generalmente, las terapias dependen del estadio en el que se encuentra la enfermedad, ya que determinará el número de fotorreceptores funcionales presentes, y en la causa genética de cada paciente. El tratamiento más extendido es la suplementación con vitamina A. Sin embargo, una revisión más actualizada no encontró beneficios significativos (Rayapudi *et al.*, 2013). Actualmente, se están realizando avances en la terapia genética, que se basa en la reparación o sustitución del gen mutado por una copia “sana” en los fotorreceptores. Por otro lado, la terapia celular investiga la posibilidad de repoblar la retina con fotorreceptores funcionales mediante el trasplante de células progenitoras de la retina. Otro enfoque se centra en la neuroprotección con tratamientos farmacológicos con antioxidantes, anti-inflamatorios o moléculas que inhiben las rutas de muerte celular implicadas en el desarrollo de la RP. Para etapas avanzadas de la RP, existen diversos implantes retinales electrónicos que podrían reestablecer una visión parcial, estimulando otras células de la retina, aunque por el momento presentan inconvenientes como la rehabilitación del individuo y la

durabilidad funcional del dispositivo. Otra alternativa en estudio es la optogenética, que proporciona capacidades fotosensibles a células de la retina que no las presentaban previamente o que las poseían de forma muy limitada, como las células bipolares o las células ganglionares de la retina (CGR) (NORD - National Organization for Rare Disorders; O'Neal y Luther, 2020).

3. ANIMALES MODELO DE RP

Actualmente, existe una gran variedad de modelos animales para la RP. Afortunadamente, estos modelos consiguen imitar la enfermedad humana tanto genética como fenotípicamente. Por ello, la gran mayoría de los conocimientos sobre los mecanismos de degeneración en la RP han sido dilucidados gracias al estudio de modelos animales (Narayan *et al.*, 2016).

Los modelos murinos y porcinos son notablemente los más utilizados en el estudio de RP. No obstante, debemos tener en cuenta sus limitaciones dado las evidentes diferencias que poseen con respecto a la retina humana. Los humanos presentan una relación 95:5 bastones:conos. Los roedores, al tratarse de animales nocturnos, tienen un ratio mayor, 95:2. La principal diferencia que encontramos reside en la distribución de los fotorreceptores. Respecto a la distribución, en humanos, los conos se encuentran en gran concentración en la mácula. Asimismo, los bastones se encuentran excluidos de esta zona. Por el contrario, en roedores encontramos una densidad de conos especialmente baja en la zona central, alrededor del nervio óptico. Esto resulta en una rápida degeneración de los fotorreceptores de tipo cono en los modelos de RP (Campochiaro y Mir, 2018). A pesar de no presentar mácula, constituyen un modelo animal apropiado ya que las fases iniciales de la RP tienen lugar fuera la mácula, donde la distribución de conos y bastones en roedores y humanos es más similar (Punzo *et al.*, 2009). Por otro lado, los cerdos presentan un ratio bastones:conos mucho más similar al humano (Campochiaro y Mir, 2018). Estos animales presentan un área central deprimida rica en conos, comparable a la mácula humana, con forma de banda horizontal, denominada *visual streak* (Sánchez *et al.*, 2011). Por tanto, los modelos porcinos constituyen un modelo más adecuado para RP (Campochiaro y Mir, 2018).

A continuación, detallaremos las características y mutaciones de los principales modelos animales utilizados en los estudios que serán expuestos posteriormente.

- **P23H:** modelo de rata transgénica con un defecto en el dominio N-terminal del gen que codifica para la RHO, afectando al plegamiento correcto de la proteína en el retículo endoplásmico. Esta mutación da lugar a una progresión relativamente lenta de la enfermedad y ha sido identificada en el 12% de los casos de RP autosómica dominante (Viringipurampeer *et al.*, 2019).
- **S334ter:** modelo de rata transgénica con un defecto en el dominio C-terminal del gen que codifica para la RHO, que deriva en un fallo en el transporte de la proteína. Como consecuencia, se produce un fenotipo más severo que en el modelo P23H (Viringipurampeer *et al.*, 2019).
- **rd:** modelo de ratón espontáneo que presenta mutaciones en el gen que codifica para la subunidad beta de la PDE6. Resulta en una rápida degeneración de los fotorreceptores. PDE6 hidroliza GMPc tras la exposición a luz. Como consecuencia de la mutación, se produce un aumento de los niveles de GMPc y Ca^{2+} intracelular que desencadena la muerte celular de los bastones (Cottet y Schorderet, 2009).
- **rd10:** modelo de ratón que presenta mutaciones en el mismo gen que el modelo rd. Resulta en deslocalización y una menor estabilidad de la proteína PDE6, preservando su actividad enzimática normal. La línea rd10 fue aislada por primera vez como mutación natural por The Jackson Laboratory. Presenta una degeneración relativamente lenta, lo que le hace especialmente adecuado para el estudio de tratamientos. Es un modelo de

RP autosómica recesiva (Murakami *et al.*, 2012; Rodríguez-Muela *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018).

- **rd1:** modelo de ratón que presenta mutaciones en el mismo gen que el modelo rd. Sufrir una degeneración más rápida que el modelo rd10, ya que en este caso PDE6 no se expresa en absoluto (Murakami *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2018).
- **rds:** (renombrado como rd2) modelo de ratón espontáneo que presenta mutaciones en el gen que codifica para la periferina/rds, glicoproteína de la membrana expresada exclusivamente en los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores y esencial para su morfogénesis y estabilización. Sufrir una degeneración relativamente lenta. Es un modelo de RP autosómica dominante (Cottet y Schorderet, 2009; Pierce, 2001).

4. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR EN RP

El estudio de modelos animales y pacientes es crucial para dilucidar los mecanismos implicados en la muerte de fotorreceptores en RP y poder aplicar estos conocimientos en el desarrollo de estrategias terapéuticas eficaces. Se ha determinado que la muerte celular de los fotorreceptores con RP sucede en un proceso de dos etapas. En primer lugar, ocurre la muerte de los bastones. Seguidamente, esto conlleva a la degeneración del segundo tipo de fotorreceptores, los conos. Desafortunadamente, los mecanismos concretos por los que tiene lugar todavía permanecen inciertos (Athanasίου *et al.*, 2018).

Hasta la fecha, numerosas publicaciones defendían la apoptosis como el mecanismo de muerte celular en la degeneración de retina. Sin embargo, la supresión incompleta de la muerte celular de los fotorreceptores usando inhibidores de apoptosis sugiere la implicación de otros mecanismos. Estudios más recientes han confirmado el papel de moléculas implicadas en procesos independientes de caspasas en la degeneración de bastones, como calpaínas y las enzimas PARP (Athanasίου *et al.*, 2018).

Los mecanismos causantes de la muerte secundaria de los conos se encuentran caracterizados en menor medida. Se han propuesto diversas hipótesis sobre mecanismos que contribuirían a la muerte celular de estos fotorreceptores, entre ellas la pérdida de factores trópicos esenciales para la supervivencia, la activación de células gliales, el estrés oxidativo y la deficiencia de nutrientes (Murakami *et al.*, 2012; Viringipurampeer *et al.*, 2019). A continuación, describiremos estudios en distintos modelos animales de RP y pacientes y las conclusiones que se han extraído de ellos respecto a los mecanismos de muerte celular que sufren los fotorreceptores.

4.1. APOPTOSIS

Los primeros investigadores en demostrar la implicación de la apoptosis en modelos rd, rds y de RHO mutante, fueron Chang *et al.* (1993), gracias a la detección de la fragmentación del ADN de fotorreceptores (Cottet y Schorderet, 2009). Como se ha mencionado previamente, este tipo de muerte celular se caracteriza por la condensación del núcleo, la fragmentación del ADN en fragmentos de tamaño característicos y la formación de cuerpos apoptóticos, que serán rápidamente fagocitados, desarrollándose con la mínima liberación de componentes celulares al medio extracelular sin desencadenar una respuesta inflamatoria (Lemasters, 2017).

En los inicios de la investigación de RP, se determinó que los mecanismos dependientes de caspasas constituían la principal vía de muerte celular de los fotorreceptores. La acción de estas proteasas ha sido descrita en diversos modelos animales, como modelos S334ter o rds. Sin embargo, los avances en la materia han sugerido que la apoptosis podría estar regulada por otras rutas alternativas independientes de caspasas. Actualmente, muchos estudios coinciden en la implicación de mecanismos apoptóticos tanto dependientes como independientes de caspasas en la RP. No obstante, la degeneración retinal constituye un complejo e interconectado proceso que incluye una gran variedad de mecanismos (Cottet y Schorderet, 2009).

4.2. MUERTE MEDIADA POR CALPAÍNAS

Como hemos mencionado, aunque en los inicios los estudios en animales modelos sugerían que la muerte de células de los bastones ocurre por mecanismos apoptóticos, nuevos estudios coinciden en la implicación de otros mecanismos independientes de caspasas, como las calpaínas, PARP e histona deacetilasas (HDAC) (Murakami *et al.*, 2015).

Kaur *et al.* (2011) mostraron la presencia de marcadores de muerte celular independiente de caspasas en modelos P23H y S334ter de rata. En ambos modelos se identificó actividad de calpaínas y PARP, asociadas con la regulación negativa de la calpastatina (inhibidor de calpaínas), un aumento del daño oxidativo del ADN y una acumulación de polímeros de poli ADP ribosa (PAR, producto resultante de la activación de PARP), concordando con resultados previos en ratones rd1 (Paquet-Durand *et al.*, 2006). Esto sugiere la presencia de componentes claves comunes en los mecanismos de muerte celular inducidos por diferentes mutaciones y en diferentes especies. Además, en el modelo S334ter, se identificaron marcadores de apoptosis convencional dependiente de caspasas: la activación de caspasas-3 y -9 y la liberación de citocromo c. Sin embargo, el modelo PH23 parecía estar dirigido solo por mecanismos no apoptóticos. Esto sugiere que los mecanismos independientes de caspasas tienen un carácter más universal, mientras que la apoptosis dependiente de caspasas se daría solamente en ciertas mutaciones (Kaur *et al.*, 2011). Posteriormente, usando el modelo canino de RHO mutante T4R, se confirmó el papel de las calpaínas en la degeneración de retina (Marsili *et al.*, 2015).

Desde hace décadas se ha estudiado el papel del aumento de Ca^{2+} en la degeneración de la retina. Se propuso que la entrada de estos iones en los bastones mediante canales regulados por GMPc como resultado directo de mutaciones en el gen que codifica para RHO, inducían la MOMP, resultando en apoptosis (Fox *et al.*, 1999). Cottet y Schorderet (2009) sugirieron que el incremento de Ca^{2+} , activaba calpaínas y conducía a apoptosis vía mitocondrial y activación de la caspasa-3 (Cottet y Schorderet, 2009).

Más recientemente, Wang *et al.* (2018) se centraron en el estudio de los mecanismos de degeneración en modelos rd10. En primer lugar, demostraron que la mutación en el gen que codifica para la PDE6 resulta en la deslocalización de la PDE6. En condiciones normales, tras la estimulación lumínica, esta proteína induce una cascada de reacciones que terminan en la hidrólisis de GMPc. La disminución de la presencia de PDE6 en los segmentos externos dada su deslocalización provoca un aumento de los niveles de GMPc. Esto supone un exceso de la entrada de iones de Ca^{2+} a través de los canales regulados por GMPc. Finalmente, coincidieron en que la degeneración en los modelos rd10 se debía, al menos en parte, por una entrada en exceso de iones en los segmentos externos de los bastones. No obstante, destacan el carácter complejo y multifactorial del proceso de degeneración de los fotorreceptores (Wang *et al.*, 2018).

Además de caspasas y calpaínas, otras proteasas, conocidas como catepsinas, parecen estar involucradas. La catepsina D ha sido identificada en modelos de ratón rd. La proteína de membrana 2 asociada al lisosoma (LAMP2) también se ha visto implicada en la enfermedad (Cottet y Schorderet, 2009).

Los resultados de Rodríguez-Muela *et al.* (2015) indican en las primeras etapas, previas al pico de muerte celular, una acumulación de Ca^{2+} , estrés del RE y la activación aumentada de calpaínas en los modelos rd10, coincidiendo con una inhibición de la autofagia. El grupo de proteínas diana de las calpaínas incluye proteínas autofágicas y lisosómicas, lo que correlacionaría las características anteriores del proceso de degeneración. Además, se demostró

una actividad aumentada de la catepsina B en el citoplasma. Esto apoya la hipótesis de que la permeabilización de la membrana lisosómica en las retinas rd10 permite la translocación de las catepsinas al citoplasma, induciendo la muerte celular dependiente o independiente de caspasas. De este modo demostraron que el aumento de Ca^{2+} intracelular, observado en las retinas rd10 previo a la degeneración e inducido experimentalmente en retinas *wild type*, incrementa la actividad de calpaínas, que conllevan a la permeabilización de la membrana lisosómica y, con ello, la muerte celular de los fotorreceptores (Rodríguez-Muela *et al.*, 2015).

Igualmente, Comitato *et al.* (2020) identificaron la activación de calpaínas por Ca^{2+} , esta vez en un modelo heterocigótico P23H, como la principal ruta causante de muerte celular de los fotorreceptores. Concluyeron que la muerte celular estaba mediada primordialmente por la activación de calpaínas mediante el incremento de Ca^{2+} intracelular observado en los fotorreceptores, que a su vez resulta en la activación de la caspasa-7, y no por estrés del RE. Es más, la activación de sensores de RE y la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) formarían parte de un efecto patofisiológico que desencadenaría respuestas de supervivencia y no constituirían la causa de muerte celular de los fotorreceptores. Los resultados indican la presencia de esta ruta mediada por calpaínas como mecanismo común incluso en etapas tardías de la degeneración de retina. Puesto que los pacientes suelen ser diagnosticados en etapas avanzadas de la enfermedad, estos datos sugieren el potencial de inhibidores de calpaínas como tratamiento (Comitato *et al.*, 2020).

4.3. NECROSIS: NECROPTOSIS Y PIROPTOSIS

Otro mecanismo de muerte celular cuya involucración en la degeneración de la retina ha sido demostrada es la necrosis. A diferencia de lo que se creía anteriormente, la necrosis también puede ser regulada. Las quinasas RIP1 y RIP3, que forman el complejo llamado necrosoma, constituyen mediadores esenciales en la necrosis programada. Murakami *et al.* (2012) demostraron la muerte celular necrótica de los conos en ratones rd10 mediada por RIP3 (Murakami *et al.*, 2012). Murakami *et al.* (2015) sostienen que, mientras que la muerte celular de los fotorreceptores de tipo bastón presenta características apoptóticas, la muerte celular de los conos corresponde con características necróticas en ratones rd10, liberando DAMPS que contribuyen a la inflamación. Asimismo, ya que las células inflamatorias secretan $\text{TNF}\alpha$ y FAS, que reclutan RIP1 y activan la vía de RIP quinasas, la excesiva activación de la respuesta inflamatoria podría exacerbar la muerte necrótica de los conos (Murakami *et al.*, 2015) ([Figura 5](#)).

Actualmente existen numerosas evidencias clínicas que proponen la respuesta inflamatoria, especialmente $\text{TNF}\alpha$, como posible contribuyente a la degeneración de los fotorreceptores en la RP, independientemente de la mutación que da en primer lugar a la enfermedad (Massengill *et al.*, 2018). El inflamasoma NLRP3 se encuentra en el foco de investigación dado que se ha demostrado que su activación está implicada en la progresión de diversas enfermedades degenerativas de retina, regulando la muerte celular (Wooff *et al.*, 2020).

Numerosos factores de inflamación, incluyendo $\text{IL-1}\beta$ y IL-6 , fueron examinados en retinas de ratones rd10 (Yoshida *et al.*, 2013a) y en pacientes de RP (Yoshida *et al.*, 2013b). Los estudios confirmaron las sospechas de que la reacción inflamatoria crónica intraocular contribuía al proceso de degeneración de los fotorreceptores (Yoshida *et al.*, 2013a; 2013b).

Gregory-Evans *et al.* (2015), tras demostrar el componente inflamatorio en la degeneración de retina en modelos P23H, encontraron evidencias del papel crítico que tenía la activación del inflamasoma en el proceso de muerte celular de fotorreceptores. Identificaron en los modelos un aumento de la caspasa-1 activada y del inflamasoma NLRP3, además de citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y IL-18 maduras. Además, la microglía infiltrada activada también presentaba altos niveles de NLRP3. El estrés oxidativo podría ser el responsable de activar el inflamasoma y desencadenar los procesos de muerte celular por piroptosis (Gregory-Evans *et al.*, 2015).

Estudios realizados por Viringipurampeer *et al.* (2016) en el modelo de rata P23H sugirieron que los altos niveles de RIP1 y RIP3 reportados suponían la necroptosis como vía de muerte celular principal de los bastones. La necroptosis podría resultar en la liberación del contenido celular de los bastones afectados. Estos componentes actuarían como DAMPS, activando el inflamasoma en conos que hasta el momento permanecían sanos (Murakami *et al.*, 2015). Por tanto, plantearon que la segunda etapa de muerte celular en la RP, la degeneración de los conos, se lleva a cabo mediante mecanismos pro-inflamatorios dependientes de la activación del inflamasoma NLRP3 (Athanasίου *et al.*, 2018; Viringipurampeer *et al.*, 2016). Anteriormente, también se había detectado el incremento de marcadores pro-inflamatorios asociados a una respuesta de estrés del RE en modelos de RHO mutante T17M y E349X. En estos modelos, la disrupción del RE resulta en estrés oxidativo, liberación de Ca²⁺ citosólico e inflamación, entre otros procesos (Rana *et al.*, 2014).

Sin embargo, los estudios de Viringipurampeer *et al.* (2016) en ratas P23H, que como hemos visto plantean una muerte celular de bastones mediada por necroptosis y una muerte celular de conos por piroptosis a consecuencia de la activación del inflamasoma, se encuentran en desacuerdo con los resultados de otras investigaciones. En estudios realizados en modelos transgénicos S334ter de rata (Arango-González *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 1999), así como en los primeros estudios mencionados anteriormente en modelos rd10 (Murakami *et al.*, 2012), se identificó procesos apoptóticos dependientes de caspasas como causantes de la muerte celular de bastones y se determinó que la posterior muerte de los conos se llevaba a cabo mediante necroptosis dependiente de RIP3. Estas contradicciones pueden ser justificadas por el uso de distintos modelos animales. Por ejemplo, mientras que la mutación en rd10 da lugar a una pérdida de función, el modelo P23H presenta una ganancia de función que resulta en estrés del RE. Es probable que los diferentes genotipos deriven en distintas rutas de muerte celular, por lo que ninguno de los estudios se consideraría invalidado (Viringipurampeer *et al.*, 2016). Esto demuestra la necesidad de adaptar el tratamiento a cada genotipo (Viringipurampeer *et al.*, 2019).



Figura 5. Mecanismos propuestos de muerte celular de bastones y conos en retinosis pigmentaria. La muerte celular de los bastones, debida a los defectos genéticos que sufren, se relaciona con características apoptóticas. Implica vías independientes de caspasas, como las mediadas por PARP (poli (ADP-ribosa) polimerasa 1), calpaínas y HDAC (histona deacetilasa). Por otro lado, la muerte celular de los conos se debe a cambios en el microambiente, ocasionados por la previa muerte de los bastones, como oxidación, inflamación y la pérdida de factores trópicos esenciales. Esta muerte celular presenta características que se corresponde con procesos necróticos (Murakami *et al.*, 2015).

4.4. PARTHANATOS

PARP-1 participa en el sistema de reparación por escisión de bases del ADN, contribuyendo a su reparación mediante la síntesis de polímeros PAR. En condiciones fisiológicas, PARP-1 está implicado en la regulación de la homeostasis celular y el mantenimiento de la estabilidad genómica. Sin embargo, si el daño en el ADN es excesivo, la hiperactivación de PARP-1 deriva en una muerte celular programada independiente de caspasas, conocida como parthanatos. Este tipo de muerte celular se caracteriza por la sobre-activación de PARP-1, la acumulación de PAR, la translocación nuclear de AIF y la fragmentación del ADN. En primer lugar, la excesiva activación de PARP-1 genera una gran cantidad de su producto neurotóxico PAR, que se trasloca al citoplasma y a las mitocondrias. Esto da lugar a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, y a la translocación de AIF al núcleo, donde desencadena la fragmentación del ADN. A su vez, la síntesis masiva de PAR conlleva una disminución de NAD^+ y ATP, resultando en un colapso energético celular. El aumento del Ca^{2+} intracelular y la producción de ROS contribuyen a la desencadenación de parthanatos (Chiu *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2020; Paquet-Durand *et al.*, 2007; Soriano *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2009).

Paquet-Durand *et al.* (2007) demostraron la relevancia de la participación de la enzima PARP-1 y la acumulación de los polímeros PAR en la muerte celular de bastones en ratones rd1, probablemente en estadios tardíos de la enfermedad, cuando otros mecanismos del metabolismo ya se encuentran comprometidos. El grupo de investigación propuso que el estrés oxidativo provoca daños en el ADN, activando de forma excesiva de PARP-1, que contribuye a la muerte celular (Paquet-Durand *et al.*, 2007). Kaur *et al.* (2011) obtuvieron resultados similares en

modelos PH23 y S334ter, detectando el aumento de la activación de PARP-1. Del mismo modo que el anterior, este estudio atribuye un papel fundamental a la actividad de PARP-1 en la neurodegeneración de la retina, independientemente de la mutación responsable de la RP (Kaur *et al.*, 2011).

Varios estudios han detectado un incremento significativo en la supervivencia de los fotorreceptores tras el tratamiento con un inhibidor de PARP-1 en modelos rd1 y rd2, sugiriendo su posible traslación a la clínica para el tratamiento de RP (Sahaboglu *et al.*, 2016; 2017).

4.5. AUTOFAGIA

El estudio de Punzo *et al.* (2009), que comprendía cuatro modelos diferentes de ratón RP (Pde6b^{-/-}, Pde6g^{-/-}, Rho^{-/-} y P23H), sugería que la muerte secundaria de los conos tenía lugar mediante procesos de autofagia condicionados por una falta de nutrientes de manera prolongada. La disminución de la ruta de insulina/mTOR, que regula el metabolismo celular y la autofagia, detectada durante la etapa de muerte celular de los conos, corroboraba esta hipótesis. Estos resultados sugieren que la incorporación de glucosa y/o sus niveles intracelulares, podrían estar comprometidos en este tipo de fotorreceptores en la RP (Punzo *et al.*, 2009).

Murakami *et al.* (2012) detectaron vacuolas autofágicas en los conos inflamados de ratones rd10. Asimismo, estas vacuolas también se habían encontrado en los conos de ojos de pacientes de RP *post mortem* mediante estudios histológicos (Murakami *et al.*, 2012). Más tarde, la identificación del factor trófico *rod-derived cone viability factor* (RdCVF) secretado por bastones y su papel en la entrada de glucosa en conos, sustentaron esta hipótesis (Aït-Ali *et al.* 2015; Léveillard *et al.*, 2004).

También se ha sugerido que la autofagia podría ser activada como consecuencia de la disrupción de orgánulos durante la necrosis, no siendo esencial para la muerte celular de los conos, ya que contradictoriamente a lo pensado, estudios en ratones han afirmado que la pérdida de mTOR no afecta a la supervivencia de los conos (Murakami *et al.*, 2012).

4.6. IMPLICACIÓN EN LA RP

La degeneración de los fotorreceptores en la RP parece ser un complejo proceso en el que participan diferentes mecanismos de muerte celular interconectados entre sí, que dependen del estadio en el que se encuentre la enfermedad y de la mutación presente. Entre ellos se encuentran la apoptosis, dos formas de necrosis programada: necroptosis y piroptosis, la muerte mediada por calpaínas, parthanatos y la autofagia.

La apoptosis se caracteriza por la formación de cuerpos apoptóticos que envuelven el citoplasma y son eliminados rápidamente por células fagocíticas, evitando la liberación de componentes celulares al medio extracelular y sin activar la respuesta inflamatoria. Por el contrario, la necroptosis y la piroptosis se caracterizan por la ruptura de la membrana celular, la liberación del contenido intracelular y la inflamación.

La apoptosis está presente en las primeras etapas de la RP en ciertos modelos animales. La muerte celular de los bastones presenta características apoptóticas en varios modelos, pero no en todos, como es el caso del P23H. Por el contrario, los mecanismos independientes de caspasas

mediados por calpaínas parecen tener un carácter más universal, ya que se han observado en distintos modelos animales con condiciones genéticas muy variadas.

En modelos P23H, la muerte celular de los bastones ocurre vía necroptosis, mientras que la muerte secundaria de los conos tiene lugar mediante piroptosis, a causa de la activación del inflammasoma por moléculas intracelulares liberadas en la degeneración de los bastones. No obstante, en modelos S334ter y rd10, los bastones mueren por apoptosis dependiente de caspasas, mientras que los conos sufren necroptosis. Estas diferencias se deben a los distintos genotipos de los modelos. Podemos concluir que la necroptosis puede estar presente en etapas tempranas o tardías de la enfermedad, dependiendo de la mutación responsable.

En todos los casos, la piroptosis tendría lugar en etapas avanzadas de la RP. Se desencadena por la activación del inflammasoma tras los cambios en el microambiente ocasionados por la muerte de los bastones, como podría ser el estrés oxidativo o, como hemos mencionado previamente, la liberación de moléculas intracelulares al medio extracelular.

Asimismo, la muerte celular por parthanatos o autofagia también tendrían lugar en etapas avanzadas de la enfermedad, cuando la mayoría de bastones ya han degenerado. Estos procesos ocurren independientemente del genotipo. En el caso de parthanatos, se desencadena por el estrés oxidativo que se genera tras la pérdida de los bastones. Por otro lado, la autofagia se inicia por la falta de glucosa en los conos a consecuencia de la ausencia de un factor trófico necesario para su entrada, que es sintetizado por los bastones.

El conocimiento detallado de las rutas de muerte celular implicadas en la RP es esencial para el diseño de terapias de neuroprotección basadas en inhibidores de estos mecanismos. Por ello, es importante conocer las vías determinadas por el genotipo y las etapas de la enfermedad en las que tienen lugar.

5. FACTORES QUE MODULAN LA MUERTE CELULAR EN RP

Los defectos genéticos son los responsables de la RP. No obstante, se ha probado la implicación de otros factores que podrían acelerar el proceso neurodegenerativo, independientemente de la mutación presente. Entre ellos destaca la disminución de factores tróficos y la producción de factores neurotóxicos, el aumento de radicales libres y la disminución de la respuesta antioxidante endógena, y la activación de procesos inflamatorios.

5.1. FACTORES TRÓFICOS Y NEUROTÓXICOS

Los factores neurotróficos son proteínas involucradas en la supervivencia, la proliferación, la diferenciación y la función de las neuronas y otras células del sistema nervioso (Wen *et al.*, 2012). Una teoría sostiene que la supervivencia de los conos depende de factores tróficos sintetizados y secretados por los bastones y células del entorno. De este modo, la muerte progresiva de los bastones supondría el desabastecimiento de estos factores tróficos esenciales, resultando en la degeneración secundaria de los conos. La dependencia de los conos respecto a los bastones mediante interacciones paracrinas fue demostrada por primera vez en ratones rd por Mohand-Said *et al.* (1998) (Narayan *et al.*, 2016). Eso podría explicar por qué las mutaciones de genes específicos de los conos solo resultan en la muerte celular de este tipo de fotorreceptores y no afecta a los bastones, mientras que las mutaciones específicas de genes de los bastones dan lugar a la muerte celular de ambos tipos de fotorreceptores, como sucede en la RP (Punzo *et al.*, 2009).

Más tarde, el factor RdCVF fue identificado por Léveillard *et al.* (2004). Esta molécula es sintetizada por los bastones y presenta dos isoformas: RdCVF y RdCVFL. La primera constituye una forma truncada y promueve la supervivencia de los conos (Figura 6). Por otra parte, la segunda isoforma, que presenta la longitud completa, interviene en la señalización oxidativa y la protección en condiciones de hipoxia (Narayan *et al.*, 2016).

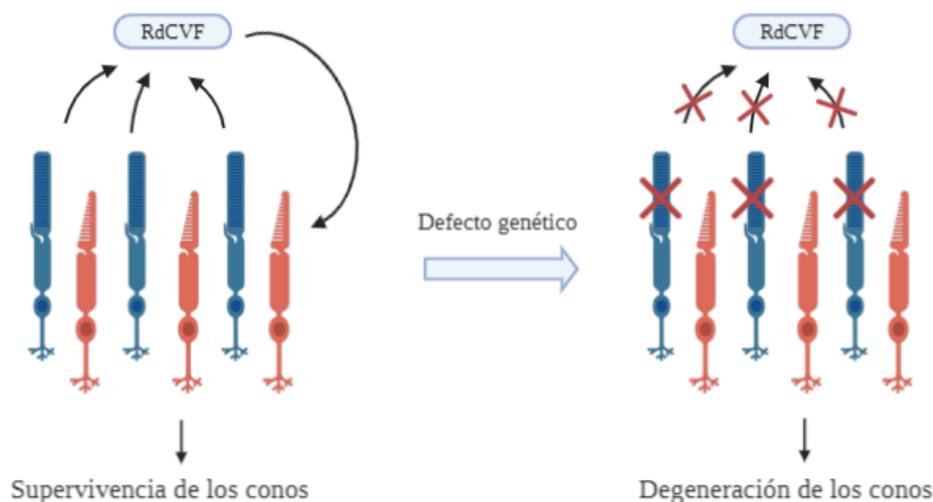


Figura 6. Mecanismo propuesto para explicar la dependencia de los conos mediante el factor trófico RdCVF secretado por los bastones. Tras la muerte celular de los bastones debido al defecto genético, el factor RdCVF esencial para la supervivencia de los conos deja de estar disponible, por lo que comienza su degeneración (Figura creada con BioRender).

El hallazgo del receptor de superficie de este factor por Ait-Ali *et al.* (2015) permitió relacionar estrechamente dos hipótesis que hasta el momento se consideraban independientes: los factores tróficos y la limitación de nutrientes. Este receptor transmembrana expresado en los conos, conocido como basigin-1 (BSG-1), interacciona con el transportador de glucosa 1 (GLUT-1), único transportador responsable de la entrada de glucosa en las células de la retina e independiente de insulina. De este modo, RdCVF conlleva el incremento de glucosa intracelular que, mediante el proceso de glicólisis, proporcionará energía a los conos (Narayan *et al.*, 2016). Inesperadamente, los estudios de este factor apoyaron los mecanismos de degeneración de los conos previamente propuestos por Punzo *et al.* (2009). De este modo, Ait-Ali *et al.* (2015) y Punzo *et al.* (2009) concuerdan en que la muerte secundaria de los conos en la RP se debe finalmente a la escasez de nutrientes mediante mecanismos que impiden la entrada de glucosa en los conos (Figura 7).

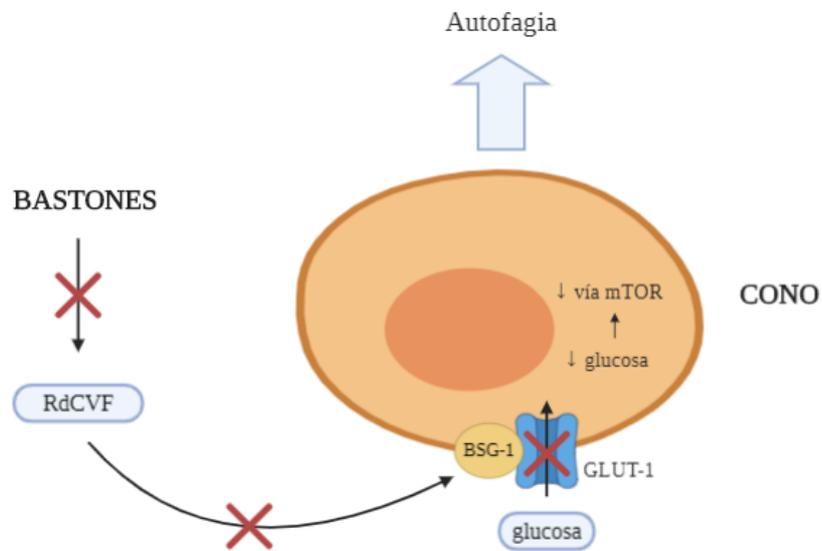


Figura 7. Mecanismo del factor RdCVF secretado por bastones y su relación con la autofagia de los conos. La identificación de basigin-1 (BSG-1) expresado en los conos como receptor de RdCVF permitió relacionar la hipótesis de la dependencia entre conos y bastones y la propuesta de la autofagia debida a una exposición prolongada de déficit de nutrientes. Tras la unión de RdCVF a BSG-1, BSG-1 interacciona con el transportador de glucosa 1 (GLUT-1), permitiendo la entrada de glucosa a los conos. La degeneración de los bastones resulta en la ausencia de RdCVF, por lo que la entrada de glucosa en los conos no se produce, resultando finalmente en la muerte celular de estos fotorreceptores por autofagia (Figura creada con BioRender).

Otro ejemplo de un factor trófico con un alto potencial neuroprotector es el factor neurotrófico ciliar (CNTF). Este factor promueve la supervivencia de ambos tipos de fotorreceptores, tanto bastones como conos, y de las CGR, por lo que es un importante candidato para el diseño de terapias. Forma parte de la familia de citoquinas neuropoyéticas IL-6. La inactivación de CNTF en animales y humanos no da lugar a disfunciones específicas. Sin embargo, se ha observado que el CNTF exógeno afecta a la supervivencia y la diferenciación de células del sistema nervioso (Wen *et al.*, 2012).

Los efectos neuroprotectores de CNTF han sido confirmados en casi todos los animales modelos, incluso de diferentes especies, por lo que se considera un agente con un amplio espectro. No obstante, los mecanismos exactos por los que este factor trófico protege a los fotorreceptores no se conocen. Se ha establecido que el CNTF actúa de forma directa en las

CGR. Respecto a los fotorreceptores, estudios en roedores sugieren que el efecto protector del CNTF exógeno no es directo y debe estar mediado por otro tipo de células, posiblemente por las células de Müller. Para poder definir en detalle los mecanismos moleculares responsables de la neuroprotección inducida por CNTF son necesarias más investigaciones (Wen *et al.*, 2012).

Tao *et al.* (2002) demostraron la efectividad de la terapia basada en células secretoras de CNTF encapsuladas en un dispositivo intraocular en un modelo canino *rdc1* (presenta una mutación en el gen que codifica para la subunidad beta de la PDE6). Además, comprobaron que la distribución sostenida en el tiempo de bajas dosis de CNTF resultaba más efectiva que una inyección con una alta dosis. El diseño de sistemas de distribución es crucial para el desarrollo de estas terapias para la RP (Tao *et al.*, 2002). Li *et al.* (2010) demostraron que el tratamiento con CNTF estimulaba la regeneración de los segmentos externos de los conos en modelos de rata S334ter. Esto supondría la capacidad de, no solo detener el proceso de degeneración, sino revertirlo (Li *et al.*, 2010).

Lipinski *et al.* (2015) demostraron por primera vez la capacidad de un factor neurotrófico de proporcionar protección de por vida en modelos murinos de RP en etapas avanzadas de la enfermedad, modificados genéticamente para expresar hCNTF de forma sostenida. Probablemente, en este caso el factor es secretado por las células ganglionares y las células de Müller, ya que son conocidas por ser eficientemente transducidas por el tipo de vector usado: virus adeno-asociado serotipo 2 (AAV2). Basándose en los análisis del transcriptoma, propusieron que la preservación de los conos tras el tratamiento con hCNTF se debe a la sobre-expresión de inhibidores intracelulares y extracelulares de proteasas que evitan la degradación de la matriz extracelular. De este modo plantearon la sobre-expresión de inhibidores de proteasas endógenos como estrategia alternativa de protección contra la muerte celular de los fotorreceptores en la RP (Lipinski *et al.*, 2015).

Wang *et al.* (2020) demostraron que el CNTF exógeno puede alterar la transcripción génica de los fotorreceptores y otros tipos celulares de la retina en modelos *rds*, además de activar el sistema inmune y otras cascadas de señalización (Wang *et al.*, 2020). Sin embargo, por ahora los ensayos clínicos con CNTF no han mostrado beneficios significativos en humanos para el tratamiento de RP (Birch *et al.*, 2013), pero sí para otras degeneraciones de la retina como la telangiectasia macular de tipo 2 (Chew *et al.*, 2019).

Otra hipótesis propuesta para la muerte secundaria de los conos reside en los efectos de factores neurotóxicos producidos por los bastones que sufren primariamente la degeneración. Estas moléculas, entre las que se incluiría glutamato y productos tóxicos derivados de procesos apoptóticos o necróticos, serían liberadas al medio extracelular o transmitidas directamente desde los bastones disfuncionales a los conos mediante las uniones gap. Este mecanismo propone que la progresión lenta de la muerte de los conos se debe a la disminución de los factores tóxicos proporcional a la eliminación de los bastones que los producen (Narayan *et al.*, 2016).

La hipótesis de la difusión de señales inductoras de muerte celular de los batones a los conos adyacentes mediante las uniones de tipo gap fue propuesta por Ripps (2002). Kranz *et al.* (2013) estudiaron la potencial contribución de esas uniones en la RP usando modelos de ratón *rd1* y *RHO knockout*, y cruzándolos con ratones que no expresaban la conexina 36, proteína esencial para la formación de las uniones gap en el lado de los conos. Al no presenciar cambios significativos en la degeneración de los conos, concluyeron que la teoría que implicaba a las uniones gap en la degeneración secundaria de los conos en la RP debía ser excluida. No

obstante, la participación de intermediarios tóxicos liberados al espacio extracelular por los bastones que sufren la muerte celular primaria todavía no ha sido descartada (Kranz *et al.*, 2013).

5.2. ESTRÉS OXIDATIVO

Otra propuesta que pretende explicar el lento proceso de degeneración secundaria de los conos es el estrés oxidativo. La hipótesis de la acumulación de daños oxidativos es, al menos, parcialmente responsable de la patogénesis de la RP, ha sido avalada por múltiples estudios, independientemente de si constituye la causa principal de muerte celular (Narayan *et al.*, 2016).

Se han observado marcadores de estrés oxidativo tanto en modelos animales como en pacientes de RP, como, por ejemplo, niveles reducidos de la proteína antioxidante glutatión y niveles elevados de su forma oxidada, disulfuro de glutatión, un aumento de malondialdehído y NO (Campochiaro *et al.*, 2015). Los estudios de Sanz *et al.* (2007) en modelos rd1 indicaron que el estrés oxidativo provoca daños en el ADN de los bastones. La mutación presente en estos modelos animales resulta en un aumento de los niveles de GMPc y de la entrada de Ca^{2+} a los bastones. Esto da lugar a una alta actividad de las bombas en un intento de reestablecer el equilibrio homeostático, lo que supone un gran consumo energético. El incremento de la actividad de enzimas glicolíticas provoca un aumento de la producción de ROS. Las ROS generadas podría dañar tanto la membrana mitocondrial (liberando moléculas pro-apoptóticas), como membranas de otros orgánulos como lisosomas (liberando catepsinas y otras hidrolasas), además de involucrar calpaínas. Finalmente, concluyeron que el estrés oxidativo y las ROS participaban en la degeneración de los fotorreceptores en el modelo rd1 dando lugar, por vías dependientes e independientes de caspasas, a la muerte celular por apoptosis (Sanz *et al.*, 2007).

Por otra parte, Shen *et al.* (2005) demostraron evidencias de daño oxidativo en los conos tras la degeneración de los bastones en un modelo transgénico porcino de RP que expresaba una RHO mutada. Los fotorreceptores son especialmente susceptibles al estrés oxidativo por su alta actividad metabólica y su exposición a radiaciones ultravioleta. Los bastones constituyen el principal consumidor de oxígeno al ser más abundantes que los conos (constituyen el 95% de los fotorreceptores totales en humanos). Los vasos coroideos proporcionan el oxígeno necesario a los fotorreceptores en la retina exterior, mientras que los vasos retinianos lo distribuyen a retina interna. Los vasos coroideos no están regulados por los niveles de oxígeno del tejido. Como consecuencia, conforme mueren los bastones, los conos restantes se ven sometidos a unos niveles de oxígeno cada vez mayores, dando lugar a condiciones de hiperoxia. En respuesta, se produce la vasoconstricción de los vasos retinianos y su diámetro disminuye debido a su autorregulación, como se ha observado en pacientes (Eysteinson *et al.*, 2014), resultando en hipoxia en la retina interna. En estas condiciones se genera una gran cantidad de ROS en la retina externa que sobrepasa a los sistemas de defensa antioxidante. Al no poder ser neutralizados, estas moléculas causan la disfunción de múltiples componentes celulares, incluyendo el ADN, proteínas y lípidos, pudiendo causar finalmente la muerte celular (Martínez-Fernández de la Cámara *et al.*, 2013; Olivares-González *et al.*, 2018; Punzo *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2005). Esto es lo que se conoce como hipótesis oxidativa de la RP (Figura 8).

Esta hipótesis explicaría el fenotipo característico de la evolución de RP. Las áreas periféricas de la retina poseen un mayor ratio de bastones:conos, por lo que sería la primera área en sufrir alteraciones significativas en los niveles de oxígeno con la pérdida de los bastones, ya que el oxígeno por cono aumentaría considerablemente. Por otra parte, la mayor concentración de

conos se encuentra en la fovea, zona central y última en perder su funcionalidad, dado que el desequilibrio producido por la eliminación de bastones sería menos severo. Esta distribución concuerda con la constricción del campo visual que tiene lugar, siendo la zona central la última en perderse (Shen *et al.*, 2005).

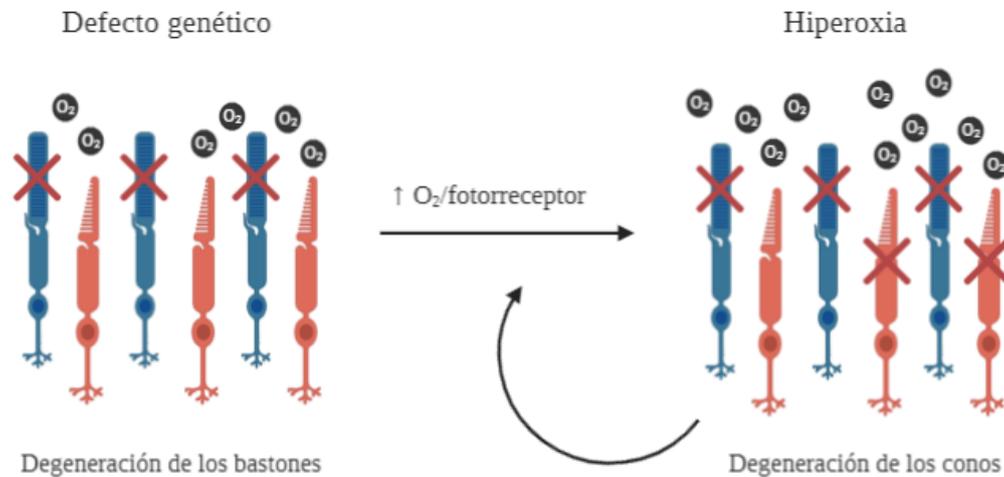


Figura 8. Mecanismo propuesto para explicar el papel del estrés oxidativo en la degeneración de los conos en la retinosis pigmentaria. Tras la muerte de los bastones, el oxígeno se acumula dando lugar a condiciones de hiperoxia, comprometiendo a los conos sanos (Figura creada con BioRender).

Más recientemente, los resultados de Olivares-González *et al.* (2018) indicaron que las retinas de ratones rd10 presentan condiciones de hiperoxia incluso en etapas tempranas de la degeneración de los bastones. Esto plantea la cuestión de si la alteración de los niveles de oxígeno produce la degeneración de los fotorreceptores o si es una consecuencia de la misma (Olivares-González *et al.*, 2018).

Martínez-Fernández de la Cámara *et al.* (2013) demostraron que los pacientes de RP presentan una actividad del sistema endógeno de defensa antioxidante reducida en el ojo, por lo que tienen una menor capacidad para neutralizar los intermediarios de oxígeno tóxicos. Esto podría explicarse por los efectos de las especies reactivas de nitrógeno (RNS) generadas, que se encuentran en altas concentraciones en la sangre de los pacientes, y alteran la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa extracelular (SOD3) mediante su nitración (Martínez-Fernández de la Cámara *et al.*, 2013).

Varios estudios han confirmado que el tratamiento con antioxidantes (Komeima *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2005) y la inducción de enzimas antioxidantes endógenas (Usui *et al.*, 2009; 2011) retrasan la muerte celular de los conos en animales murinos de RP y en ensayos clínicos con pacientes (Tsai *et al.*, 2020). Actualmente, se utiliza vitamina A y ácidos grasos omega-3 como tratamiento para pacientes de RP (Martínez-Fernández de la Cámara *et al.*, 2013), aunque algunos estudios cuestionan su eficacia (Rayapudi *et al.*, 2013).

5.3. INFLAMACIÓN

Hoy en día está bien establecido que los procesos inflamatorios que ocurren en los distintos modelos animales de RP y en pacientes exacerbaban la progresión de la RP. La activación de la microglía es un elemento clave en esta respuesta inflamatoria. La microglía son los macrófagos

residentes del sistema nervioso central (SNC) y la retina que se encuentran en forma quiescente. Tras daño en el tejido, estas células responden rápidamente proliferando, cambiando su morfología, migrando a la zona afectada y fagocitando la debris celular. La microglía activada presenta una dualidad en sus propiedades, pudiendo ser estas neuroprotectivas al igual que neurodestruictivas. Su actividad es principalmente beneficiosa y necesaria para el mantenimiento del SNC. Sin embargo, produce una gran variedad de citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo TNF α y NOS-2, lo que podría exacerbar la muerte celular de los fotorreceptores adyacentes y la degeneración de la retina. TNF α puede inducir apoptosis mientras que NOS-2 deriva en estrés oxidativo que activa caspasas y compromete a las mitocondrias (Gupta *et al.*, 2003; Narayan *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2005).

Se ha propuesto que los bastones que están degenerando debido al defecto genético, secretan quimioquinas que activan y reclutan la microglía a las capas más exteriores de la retina. Estos eventos han sido avalados por los estudios en pacientes de RP de Gupta *et al.* (2003). En modelos de ratón rd, Zeng *et al.* (2005) obtuvieron resultados similares, demostrando una temprana activación de las células gliales que coincide con el inicio de la degeneración de los bastones, elucidando el papel de la microglía en la apoptosis de los fotorreceptores (Zeng *et al.*, 2005) (Figura 9).

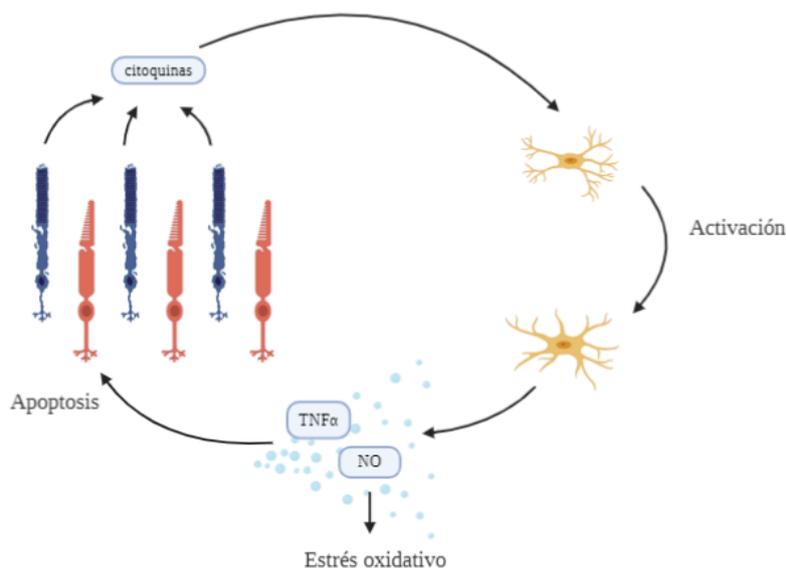


Figura 9. Mecanismo propuesto para explicar la función de la microglía en la degeneración de los conos en la Retinosis pigmentaria. La microglía, tras ser activada y migrar hacia la zona afectada atraída por las citoquinas liberadas por bastones disfuncionales, secreta sustancias citotóxicas, como TNF α y NO, que exacerban la muerte celular de los fotorreceptores adyacentes sanos (Figura creada con BioRender).

6. CONCLUSIONES

Actualmente, no existe una terapia efectiva para tratar la RP. El principal obstáculo en el desarrollo de terapias se encuentra en el conocimiento incompleto de las rutas de señalización implicadas en la enfermedad. Pese a la multitud de estudios en modelos animales, los mecanismos de muerte celular de los fotorreceptores en la RP continúan sin esclarecerse por completo, dado la amplia complejidad que supone (Athanasίου *et al.*, 2018).

Los estudios indican que, si se evitase la muerte celular de los bastones, los conos sobrevivirían. Sin embargo, este enfoque de tratamiento resulta complicado dado que los pacientes suelen ser diagnosticados en etapas avanzadas de la enfermedad, cuando ya se ha producido la degeneración completa de los bastones. La disfunción de los conos es el aspecto de la RP más debilitante para los pacientes ya que lleva a la pérdida de la visión central. Por tanto, un objetivo clave en el diseño de futuras estrategias para evitar la ceguera es la prevención de la muerte celular secundaria de los conos.

Asimismo, dada la complejidad de los mecanismos moleculares de muerte celular, su interconexión y su no exclusividad, debemos tener presente los beneficios que supondría emplear terapia combinada (Viringipurampeer *et al.*, 2019). Las estrategias terapéuticas neuroprotectoras se centran en inhibir componentes claves en los mecanismos de muerte celular de los fotorreceptores. En los estudios anteriores sobre la degeneración de los fotorreceptores, hemos visto que se han reportado mecanismos apoptóticos, necroptóticos, piroptóticos, muerte mediada por calpaínas, parthanatos y autofagia, con la participación de factores tróficos y neurotóxicos, el estrés oxidativo, la activación de la microglía y la respuesta inflamatoria. Evidentemente, bloquear una única enzima supondría una eficacia muy limitada, ya que la célula podría continuar con otros mecanismos de muerte celular. Por el contrario, si la terapia se dirige a las múltiples rutas de muerte celular implicadas en la enfermedad, la eficacia aumentaría considerablemente (Viringipurampeer *et al.*, 2016).

Hay que tener en cuenta que se ha demostrado la variabilidad de los mecanismos de muerte celular implicados en RP, dependiendo tanto del estadio en el que se encuentre la enfermedad como del genotipo causante. Por ello, se entiende la necesidad de ajustar las estrategias de terapia dirigida para cada genotipo. Sin embargo, los estudios han mostrado una mayor prevalencia de rutas independientes de caspasas, como las calpaínas y PARP, siendo estas comunes para distintos animales modelos. De este modo suponen una potencial estrategia en el diseño de terapias racionales independientes de la mutación causante de RP (Arango-González *et al.*, 2014).

Actualmente, dado los conocimientos que disponemos de estas rutas, expuestos anteriormente, numerosas moléculas se han identificado como potenciales dianas para tratamientos de neuroprotección. Entre las posibles terapias se han propuesto inhibidores de calpaínas, PARP, RIP1, catepsinas, y NLRP3, además de tratamientos con antioxidantes. Sin embargo, todavía son necesarios más estudios con el objetivo de obtener una identificación detallada de los mecanismos moleculares implicados en la muerte celular de los fotorreceptores durante la RP para el diseño de tratamientos efectivos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AÏT-ALI, N.; FRIDLICH, R.; MILLET-PUHEL, G.; CLÉRIN, E.; DELALANDE, F.; JAILLARD, C.; BLOND, F.; PERROCHEAU, L.; REICHMAN, S.; BYRNE, L.C.; OLIVIER-BANDINI, A.; BELLALOU, J.; MOYSE, E.; BOUILLAUD, F.; NICOL, X.; DALKARA, D.; VAN DORSSELAER, A.; SAHEL, J.A.; LÉVEILLARD, T. (2015). Rod-derived cone viability factor promotes cone survival by stimulating aerobic glycolysis. *Cell*, 161(4), 817-832. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.023>
- ARANGO-GONZÁLEZ, B.; TRIFUNOVIĆ, D.; SAHABOGLU, A.; KRANZ, K.; MICHALAKIS, S.; FARINELLI, P.; KOCH, S.; KOCH, F.; COTTET, S.; JANSSEN-BIENHOLD, U.; DEDEK, K.; BIEL, M.; ZRENNER, E.; EULER, T.; EKSTRÖM, P.; UEFFING, M.; FRANÇOIS PAQUET-DURAND, F. (2014). Identification of a common non-apoptotic cell death mechanism in hereditary retinal degeneration. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112142>
- ATHANASIOU, D.; AGUILA, M.; BELLINGHAM, J.; LI, W.; MCCULLEY, C.; REEVES, P.J.; CHEETHAM, M.E. (2018). The molecular and cellular basis of rhodopsin retinitis pigmentosa reveals potential strategies for therapy. *Progress in Retinal and Eye Research*, 62, 1-23. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.10.002>
- BAEZA-MARTÍN, R. (2014) *Diecinueve formas de morir las células* (Tesis de maestría) Universidad de Valladolid, Valladolid, España.
- BIRCH, D.G.; WELEBER, R.G.; DUNCAN, J.L.; JAFFE, G.J.; TAO, W.; CILIARY NEUROTROPHIC FACTOR RETINITIS PIGMENTOSA STUDY GROUPS. (2013). Randomized trial of ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for retinitis pigmentosa. *American Journal of Ophthalmology*, 156(2), 283-292.e1. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2013.03.021>
- CAMINS, A.; VERDAGUER, E.; FOLCH, J.; PALLÀS, M. (2006). Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS Drug Reviews*, 12(2), 135-148. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2006.00135.x>
- CAMPOCHIARO, P.A.; STRAUSS, R.W.; LU, L.; HAFIZ, G.; WOLFSON, Y.; SHAH, S.M.; SOPHIE, R.; MIR, T. A.; SCHOLL, H.P. (2015). Is there excess oxidative stress and damage in eyes of patients with retinitis pigmentosa? *Antioxidants Y Redox Signaling*, 23(7), 643-648. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6327>
- CAMPOCHIARO, P.A.; MIR, T.A. (2018). The mechanism of cone cell death in Retinitis Pigmentosa. *Progress in Retinal and Eye Research*, 62, 24-37. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.08.004>
- CHAITANYA, G.V.; ALEXANDER, J.S.; BABU, P.P. (2010). PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 8, 31. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-31>
- CHANG, G.Q.; HAO, Y.; WONG, F. (1993). Apoptosis: Final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron*, 11(4), 595-605. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90072-y](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90072-y)

- CHANG, S.; VACCARELLA, L.; OLATUNJI, S.; CEBULLA, C.; CHRISTOFORIDIS, J. (2011). Diagnostic challenges in retinitis pigmentosa: Genotypic multiplicity and phenotypic variability. *Current Genomics*, 12(4), 267-275. <https://doi.org/10.2174/138920211795860116>
- CHEW, E.Y.; CLEMONS, T.E.; JAFFE, G.J.; JOHNSON, C.A.; FARSIU, S.; LAD, E.M.; GUYMER, R.; ROSENFELD, P.; HUBSCHMAN, J.P.; CONSTABLE, I.; WILEY, H.; SINGERMAN, L.J.; GILLIES, M.; COMER, G.; BLODI, B.; ELIOTT, D., YAN, J.; BIRD, A.; FRIEDLANDER, M. (2019). Effect of ciliary neurotrophic factor on retinal neurodegeneration in patients with macular telangiectasia type 2: A randomized clinical trial. *Ophthalmology*, 126(4), 540-549. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2018.09.041>
- CHIU, L.Y.; HO, F.M.; SHIAH, S.G.; CHANG, Y.; LIN, W.W. (2011). Oxidative stress initiates DNA damager MNNG-induced poly(ADP-ribose)polymerase-1-dependent parthanatos cell death. *Biochemical Pharmacology*, 81(3), 459-470. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.10.016>
- COMITATO, A.; SCHIROLI, D.; MONTANARI, M.; MARIGO, V. (2020). Calpain activation is the major cause of cell death in photoreceptors expressing a rhodopsin misfolding mutation. *Molecular Neurobiology*, 57(2), 589-599. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01723-5>
- COTTET, S.; SCHORDERET, D.F. (2009) Mechanisms of apoptosis in retinitis pigmentosa. *Current Molecular Medicine*, 9(3):375-383. <https://doi.org/10.2174/156652409787847155>
- EYSTEINSSON, T.; HARDARSON, S. H.; BRAGASON, D.; STEFÁNSSON, E. (2014). Retinal vessel oxygen saturation and vessel diameter in retinitis pigmentosa. *Acta Ophthalmologica*, 92(5), 449-453. <https://doi.org/10.1111/aos.12359>
- FERRARI, S.; DI IORIO, E.; BARBARO, V.; PONZIN, D.; SORRENTINO, F.S.; PARMEGGIANI, F. (2011). Retinitis pigmentosa: Genes and disease mechanisms. *Current Genomics*, 12(4), 238-249. <https://doi.org/10.2174/138920211795860107>
- FLORES-RODRÍGUEZ, P.; SERRANO, E.L.; MANZANARO, P.G.; RODRÍGUEZ, G.C. (2013). Retinitis pigmentosa: Revisión bibliográfica. *Gaceta de optometría y óptica oftálmica*, 481, 34-40.
- FOX, D.A.; POBLENZ, A.T.; Y HE, L. (1999). Calcium overload triggers rod photoreceptor apoptotic cell death in chemical-induced and inherited retinal degenerations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 893(1), 282-285. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07837.x>
- GALLUZZI, L.; VITALE, I.; AARONSON, S.A.; ABRAMS, J.M.; ADAM, D.; AGOSTINIS, P.; ALNEMRI, E.S.; ALTUCCI, L.; AMELIO, I.; ANDREWS, D.W.; ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M.; ANTONOV, A.V.; ARAMA, E.; BAEHRECKE, E.H.; BARLEV, N.A.; BAZAN, N.G.; BERNASSOLA, F.; BERTRAND, M.J.M.; BIANCHI, K.; KROEMER, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Y Differentiation*, 25(3), 486-541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>

- GREGORY-EVANS, C.Y.; VIRINGIPURAMPEER, I.A.; METCALFE, A.L.; BASHAR, E.; MOHAMMADI, Z.; MORITZ, O.L.; GREGORY-EVANS, K. (2015). RIP3-induced NLRP3 inflammasome activation is the major driver for P23H rhodopsin photoreceptor degeneration. *Investigative Ophthalmology Y Visual Science*, 56(7), 3501-3501.
- GUPTA, N.; BROWN, K.E.; MILAM, A. H. (2003). Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, 76(4), 463-471. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(02\)00332-9](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(02)00332-9)
- HAMEL, C. (2006). Retinitis pigmentosa. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 1, 40. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-1-40>
- HARTONG, D.T.; BERSON, E.L; DRYJA, T.P. (2006). Retinitis pigmentosa. *Lancet*, 368(9549),1795-1809. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69740-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69740-7)
- JIANG, H.; XIONG, S.; XIA, X. (2014). Retinitis pigmentosa-associated rhodopsin mutant T17M induces endoplasmic reticulum (ER) stress and sensitizes cells to ER stress-induced cell death. *Molecular Medicine Reports*, 9(5), 1737-1742. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.1987>
- KAUR, J.; MENCL, S.; SAHABOGLU, A.; FARINELLI, P.; VAN VEEN, T.; ZRENNER, E.; EKSTRÖM, P.; PAQUET-DURAND, F.; ARANGO-GONZALEZ, B. (2011). Calpain and PARP activation during photoreceptor cell death in P23H and S334ter rhodopsin mutant rats. *PLoS ONE*, 6(7), e22181. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022181>
- KOMEIMA, K.; ROGERS, B.S.; CAMPOCHIARO, P.A. (2007). Antioxidants slow photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Journal of Cellular Physiology*, 213(3), 809-815. <https://doi.org/10.1002/jcp.21152>
- KRANZ, K.; PAQUET-DURAND, F.; WEILER, R.; JANSSEN-BIENHOLD, U.; DEDEK, K. (2013). Testing for a gap junction-mediated bystander effect in retinitis pigmentosa: Secondary cone death is not altered by deletion of connexin36 from cones. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057163>
- LEMASTERS, J. J. (2017) Molecular Mechanisms of Cell Death. En Coleman, W. y Tsongalis, G. (Eds.): *Molecular pathology*, 2ª Ed. (pp. 1-18). Cambridge: Academic Press.
- LÉVEILLARD, T.; MOHAND-SAÏD, S.; LORENTZ, O.; HICKS, D.; FINTZ, A.C., CLÉRIN, E.; SIMONUTTI, M.; FORSTER, V.; CAVUSOGLU, N.; CHALMEL, F.; DOLLÉ, P.; POCH, O.; LAMBROU, G.; SAHEL, J.A. (2004). Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. *Nature Genetics*, 36(7), 755-759. <https://doi.org/10.1038/ng1386>
- LI, Y.; TAO, W.; LUO, L.; HUANG, D.; KAUPER, K.; STABILA, P.; LAVAIL, M.M.; LATIES, A.M.; WEN, R. (2010). Cntf induces regeneration of cone outer segments in a rat model of retinal degeneration. *PLoS ONE*, 5(3), e9495. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009495>
- LIPINSKI, D.M.; BARNARD, A.R.; SINGH, M.S.; MARTIN, C.; LEE, E.J.; DAVIES, W.I.L.; MACLAREN, R.E. (2015). CNTF gene therapy confers lifelong neuroprotection in a mouse model of human retinitis pigmentosa. *Molecular Therapy: The Journal of the*

- American Society of Gene Therapy*, 23(8), 1308-1319.
<https://doi.org/10.1038/mt.2015.68>
- LIU, C.; LI, Y.; PENG, M.; LATIES, A.M.; WEN, R. (1999). Activation of caspase-3 in the retina of transgenic rats with the rhodopsin mutation s334ter during photoreceptor degeneration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(12), 4778-4785.
- MARSILI, S.; GENINI, S.; SUDHARSAN, R.; GINGRICH, J.; AGUIRRE, G.D.; BELTRAN, W.A. (2015). Exclusion of the unfolded protein response in light-induced retinal degeneration in the canine T4R RHO model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *PLoS ONE*, 10(2), e0115723. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115723>
- MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ DE LA CÁMARA, C.; SALOM, D.; SEQUEDO, M.D.; HERVÁS, D.; MARÍN-LAMBÍES, C.; ALLER, E.; JAIJO, T.; DÍAZ-LLOPIS, M.; MILLÁN, J.M.; RODRIGO, R. (2013). Altered antioxidant-oxidant status in the aqueous humor and peripheral blood of patients with retinitis pigmentosa. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074223>
- MASSENGILL, M.T.; AHMED, C.M.; LEWIN, A.S.; ILDEFONSO, C.J. (2018). Neuroinflammation in retinitis pigmentosa, diabetic retinopathy, and age-related macular degeneration: A minireview. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75402-4_23
- MOHAND-SAID, S.; DEUDON-COMBE, A.; HICKS, D.; SIMONUTTI, M.; FORSTER, V.; FINTZ, A.C.; LÉVEILLARD, T.; DREYFUS, H.; SAHEL, J.A. (1998). Normal retina releases a diffusible factor stimulating cone survival in the retinal degeneration mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14), 8357-8362. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8357>
- MURAKAMI, Y.; IKEDA, Y.; NAKATAKE, S.; MILLER, J.W.; VAVVAS, D.G.; SONODA, K.H.; ISHIBASHI, T. (2015). Necrotic cone photoreceptor cell death in retinitis pigmentosa. *Cell Death Y Disease*, 6, e2038. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.385>
- MURAKAMI, Y.; MATSUMOTO, H.; ROH, M.; SUZUKI, J.; HISATOMI, T.; IKEDA, Y.; MILLER, J.W.; VAVVAS, D.G. (2012). Receptor interacting protein kinase mediates necrotic cone but not rod cell death in a mouse model of inherited degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(36), 14598-14603. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206937109>
- NARAYAN, D.S.; WOOD, J.P.M.; CHIDLOW, G.; CASSON, R.J. (2016). A review of the mechanisms of cone degeneration in retinitis pigmentosa. *Acta Ophthalmologica*, 94(8), 748-754. <https://doi.org/10.1111/aos.13141>
- NIRMALA, J.G.; LOPUS, M. (2019). Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biology and Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s10565-019-09496-2>
- NORD - NATIONAL ORGANIZATION FOR RARE DISORDERS. Retinitis pigmentosa. Recuperado 25 de junio de 2020, de <https://rarediseases.org/rare-diseases/retinitis-pigmentosa/>
- O'NEAL, T.B.; LUTHER, E.E. (2020). Retinitis pigmentosa. En: *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519518/>

- OLIVARES-GONZÁLEZ, L.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ DE LA CÁMARA, C.; HERVÁS, D.; MILLÁN, J.M.; RODRIGO, R. (2018). HIF-1 α stabilization reduces retinal degeneration in a mouse model of retinitis pigmentosa. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 32(5), 2438-2451. <https://doi.org/10.1096/fj.201700985R>
- PAN, Y.R.; SONG, J.Y.; FAN, B.; WANG, Y.; CHE, L.; ZHANG, S.M.; CHANG, Y.X.; HE, C.; LI, G.Y. (2020). Mtor may interact with parp-1 to regulate visible light-induced parthanatos in photoreceptors. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 18. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0498-0>
- PAQUET-DURAND, F.; AZADI, S.; HAUCK, S.M.; UEFFING, M.; VAN VEEN, T.; EKSTRÖM, P. (2006). Calpain is activated in degenerating photoreceptors in the rd1 mouse. *Journal of Neurochemistry*, 96(3), 802-814. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03628.x>
- PAQUET-DURAND, F.; SILVA, J.; TALUKDAR, T.; JOHNSON, L.E.; AZADI, S.; VAN VEEN, T.; UEFFING, M.; HAUCK, S.M.; EKSTRÖM, P.A. (2007). Excessive activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to inherited photoreceptor degeneration in the retinal degeneration 1 mouse. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(38), 10311–10319. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1514-07.2007>
- PECORINO, L. (2012). Apoptosis. En: *Molecular Biology of cancer*, 3^a Ed. (pp. 149-172). Oxford: Oxford University Press.
- PIERCE, E.A. (2001). Pathways to photoreceptor cell death in inherited retinal degenerations. *BioEssays*, 23(7), 605-618. <https://doi.org/10.1002/bies.1086>
- PRUETT, R.C. (1983). Retinitis pigmentosa: Clinical observations and correlations. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 81, 693-735.
- PUNZO, C.; KORNACKER, K.; CEPKO, C.L. (2009). Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Nature Neuroscience*, 12(1), 44-52. <https://doi.org/10.1038/nn.2234>
- PUNZO, C.; XIONG, W.; CEPKO, C.L. (2012). Loss of daylight vision in retinal degeneration: Are oxidative stress and metabolic dysregulation to blame? *The Journal of Biological Chemistry*, 287(3), 1642-1648. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.304428>
- RANA, T.; SHINDE, V.M.; STARR, C.R.; KRUGLOV, A.A.; BOITET, E.R.; KOTLA, P.; ZOLOTUKHIN, S.; GROSS, A.K.; GORBATYUK, M.S. (2014). An activated unfolded protein response promotes retinal degeneration and triggers an inflammatory response in the mouse retina. *Cell Death Y Disease*, 5(12), e1578-e1578. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.539>
- RAYAPUDI, S.; SCHWARTZ, S.G.; WANG, X.; CHAVIS, P. (2013). Vitamin A and fish oils for retinitis pigmentosa. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008428.pub2>
- RETNET - RETINAL INFORMATION NETWORK. Recuperado 19 de junio de 2020, de <https://sph.uth.edu/retnet/>

- RIPPS, H. (2002). Cell death in retinitis pigmentosa: Gap junctions and the 'bystander' effect. *Experimental Eye Research*, 74(3), 327-336. <https://doi.org/10.1006/exer.2002.1155>
- RODRÍGUEZ-MUELA, N.; HERNÁNDEZ-PINTO, A.M.; SERRANO-PUEBLA, A.; GARCÍA-LEDO, L.; LATORRE, S.H.; DE LA ROSA, E.J.; BOYA, P. (2015). Lysosomal membrane permeabilization and autophagy blockade contribute to photoreceptor cell death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Cell Death Y Differentiation*, 22(3), 476-487. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.203>
- RODRÍGUEZ-MUELA, N.; HERNÁNDEZ-PINTO, A.M.; SERRANO-PUEBLA, A.; GARCÍA-LEDO, L.; LATORRE, S.H.; DE LA ROSA, E.J.; BOYA, P. (2015). Lysosomal membrane permeabilization and autophagy blockade contribute to photoreceptor cell death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Cell Death Y Differentiation*, 22(3), 476-487. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.203>
- SAHABOGLU, A.; BARTH, M.; SECER, E.; AMO, E.M.D.; URTTI, A.; ARSENIJEVIC, Y.; ZRENNER, E.; PAQUET-DURAND, F. (2016). Olaparib significantly delays photoreceptor loss in a model for hereditary retinal degeneration. *Scientific Reports*, 6, 39537. <https://doi.org/10.1038/srep39537>
- SAHABOGLU, A.; SHARIF, A.; FENG, L.; SECER, E.; ZRENNER, E.; PAQUET-DURAND, F. (2017). Temporal progression of PARP activity in the Prph2 mutant rd2 mouse: Neuroprotective effects of the PARP inhibitor PJ34. *PLoS ONE*, 12(7), e0181374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181374>
- SALMANINEJAD, A.; MOTAEE, J.; FARJAMI, M.; ALIMARDANI, M.; ESMAEILIE, A.; PASDAR, A. (2019). Next-generation sequencing and its application in diagnosis of retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Genetics*, 40(5), 393-402. <https://doi.org/10.1080/13816810.2019.1675178>
- SÁNCHEZ, I.; MARTIN, R.; USSA, F.; FERNÁNDEZ-BUENO, I. (2011). The parameters of the porcine eyeball. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 249(4), 475-482. <https://doi.org/10.1007/s00417-011-1617-9>
- SANZ, M.M.; JOHNSON, L.E.; AHUJA, S.; EKSTRÖM, P.A.R.; ROMERO, J.; VAN VEEN, T. (2007). Significant photoreceptor rescue by treatment with a combination of antioxidants in an animal model for retinal degeneration. *Neuroscience*, 145(3), 1120-1129. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.12.034>
- SHEN, J.; YANG, X.; DONG, A.; PETTERS, R.M.; PENG, Y.W.; FULTON-WONG, F.; CAMPOCHIARO, P.A. (2005) Oxidative damage is a potential cause of cone cell death in retinitis pigmentosa. *Journal of Cellular Physiology*, 203(3):457-464. <https://doi.org/10.1002/jcp.20346>
- SORIANO, J.; MORA-ESPÍ, I.; ALEA-REYES, M.E.; PÉREZ-GARCÍA, L.; BARRIOS, L.; IBÁÑEZ, E.; NOGUÉS, C. (2017). Cell death mechanisms in tumoral and non-tumoral human cell lines triggered by photodynamic treatments: Apoptosis, necrosis and parthanatos. *Scientific Reports*, 7(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/srep41340>
- TAO, W.; WEN, R.; GODDARD, M.B.; SHERMAN, S.D.; O'ROURKE, P.J.; STABILA, P.F.; BELL, W.J.; DEAN, B.J.; KAUPER, K.A.; BUDZ, V.A.; TSIARAS, W.G.; ACLAND, G.M.; PEARCE-KELLING, S.; LATIES, A.M.; AGUIRRE, G. D. (2002).

- Encapsulated cell-based delivery of cntf reduces photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology Y Visual Science*, 43(10), 3292-3298.
- TSAI, G.; CAMPOCHIARO, P.A.; KONG, X. (2020). Macular function response to N-acetylcysteine Treatment in patients with Retinitis Pigmentosa. *Investigative Ophthalmology Y Visual Science*, 61(7), 1909-1909.
- USUI, S.; KOMEIMA, K.; LEE, S.Y.; JO, Y.J.; UENO, S.; ROGERS, B.S.; WU, Z.; SHEN, J.; LU, L.; OVESON, B.C.; RABINOVITCH, P.S.; CAMPOCHIARO, P.A. (2009). Increased expression of catalase and superoxide dismutase 2 reduces cone cell death in retinitis pigmentosa. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(5), 778-786. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.47>
- USUI, S.; OVESON, B.C.; IWASE, T.; LU, L.; LEE, S.Y.; JO, Y.J.; WU, Z.; CHOI, E.Y.; SAMULSKI, R.J.; CAMPOCHIARO, P.A. (2011). Overexpression of SOD in retina: Need for increase in H₂O₂-detoxifying enzyme in same cellular compartment. *Free Radical Biology Y Medicine*, 51(7), 1347-1354. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.010>
- VERBAKEL, S.K.; VAN HUET, R.A.C.; BOON, C.J.F.; DEN HOLLANDER, A.I.; COLLIN, R.W.J.; KLAVER, C.C.W.; HOYNG, C.B.; ROEPMAN, R.; KLEVERING, B.J. (2018). Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Progress in Retinal and Eye Research*, 66, 157-186. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.03.005>
- VILLALPANDO-RODRIGUEZ, G.E.; TORRIGLIA, A. (2013). Calpain 1 induce lysosomal permeabilization by cleavage of lysosomal associated membrane protein 2. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1833(10), 2244-2253. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.05.019>
- VIRINGIPURAMPEER, I.A.; GREGORY-EVANS, C.Y.; METCALFE, A.L.; BASHAR, E.; MORITZ, O.L.; GREGORY-EVANS, K. (2019). Cell death pathways in mutant rhodopsin rat models identifies genotype-specific targets controlling retinal degeneration. *Molecular Neurobiology*, 56(3), 1637-1652. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1192-8>
- VIRINGIPURAMPEER, I.A.; METCALFE, A.L.; BASHAR, A.E.; SIVAK, O.; YANAI, A.; MOHAMMADI, Z.; MORITZ, O.L.; GREGORY-EVANS, C.Y.; GREGORY-EVANS, K. (2016). NLRP3 inflammasome activation drives bystander cone photoreceptor cell death in a P23H rhodopsin model of retinal degeneration. *Human Molecular Genetics*, 25(8), 1501-1516. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw029>
- WANG, T.; REINGRUBER, J.; WOODRUFF, M.L.; MAJUMDER, A.; CAMARENA, A.; ARTEMYEV, N.O.; FAIN, G.L.; CHEN, J. (2018) The PDE6 mutation in the rd10 retinal degeneration mouse model causes protein mislocalization and instability and promotes cell death through increased ion influx. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(40):15332-15346. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004459>
- WANG, Y.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. (2009). Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial aif: A key event in parthanatos. *Experimental neurology*, 218(2), 193-202. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.03.020>

- WANG, Y.; RHEE, K.D.; PELLEGRINI, M.; YANG, X.J. (2020). Impacts of ciliary neurotrophic factor on the retinal transcriptome in a mouse model of photoreceptor degeneration. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63519-1>
- WEN, R.; TAO, W.; LI, Y.; SIEVING, P.A. (2012). CNTF and retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 31(2), 136-151. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.11.005>
- WOOFF, Y.; FERNANDO, N.; WONG, J.H.C.; DIETRICH, C.; AGGIO-BRUCE, R.; CHUTAN, J.A.; ROBERTSON, A.A.B.; DOYLE, S.L.; MAN, S.M.; NATOLI, R. (2020). Caspase-1-dependent inflammasomes mediate photoreceptor cell death in photo-oxidative damage-induced retinal degeneration. *Scientific Reports*, 10(1), 1-20. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58849-z>
- YOSHIDA, N.; IKEDA, Y.; NOTOMI, S.; ISHIKAWA, K.; MURAKAMI, Y.; HISATOMI, T.; ENAIDA, H.; ISHIBASHI, T. (2013a). Laboratory evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*, 120(1), e5-12. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.07.008>
- YOSHIDA, N.; IKEDA, Y.; NOTOMI, S.; NOTOMI, S.; ISHIKAWA, K.; MURAKAMI, Y.; HISATOMI, T.; ENAIDA, H.; ISHIBASHI, T. (2013b) Clinical evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*. 120(1):100-105. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.07.006>
- ZENG, H.Y.; ZHU, X.A.; ZHANG, C.; YANG, L.P.; WU, L.; TSO, M.O.M. (2005). Identification of sequential events and factors associated with microglial activation, migration, and cytotoxicity in retinal degeneration in rd mice. *Investigative Ophthalmology Y Visual Science*. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0118>