

GACETA MÉDICA DE MÉXICO

ARTÍCULO DE REVISIÓN

## Terapia génica para enfermedades hereditarias oftalmológicas: avances y perspectivas

Óscar Francisco Chacón-Camacho<sup>1\*</sup>, Aline Astorga-Carballo<sup>1</sup> y Juan Carlos Zenteno<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación, Servicio de Genética, Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana, México, D.F., México; <sup>2</sup>Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica, UNAM, México, D.F., México

### Resumen

La terapia génica es una estrategia terapéutica novedosa y prometedora que podría proporcionar una forma más efectiva para tratar las enfermedades. El ojo es un órgano fácilmente accesible, altamente compartimentado y con privilegio inmunológico, los cuales proporcionan la ventaja para que sea un blanco terapéutico ideal. Recientemente se han descrito avances importantes en la disponibilidad de diversas vías intraoculares para la liberación de los vectores virales, así como la capacidad de éstos para transducir algunos tipos de células oculares específicas. La terapia génica ha avanzado en algunas distrofias retinianas; de esta forma, se ha reportado actualmente un éxito preliminar para el tratamiento de la amaurosis congénita de Leber (LCA). Esta revisión describirá una actualización en el área de la terapia génica para el tratamiento de las enfermedades hereditarias oftalmológicas.

**PALABRAS CLAVE:** Terapia génica. Vector viral. Terapia génica ocular. Distrofia retiniana. Amaurosis congénita de Leber.

### Abstract

Gene therapy is a promising new therapeutic strategy that could provide a novel and more effective way of targeting hereditary ophthalmological diseases. The eye is easily accessible, highly compartmentalized, and an immune-privileged organ that gives advantages as an ideal gene therapy target. Recently, important advances in the availability of various intraocular vector delivery routes and viral vectors that are able to efficiently transduce specific ocular cell types have been described. Gene therapy has advanced in some retinal inherited dystrophies; in this way, preliminary success is now being reported for the treatment of Leber congenital amaurosis (LCA). This review will provide an update in the field of gene therapy for the treatment of ocular inherited diseases. (Gac Med Mex. 2015;151:501-11)

**Corresponding author:** Óscar Francisco Chacón-Camacho, [oscar\\_chacon73@hotmail.com](mailto:oscar_chacon73@hotmail.com)

**KEY WORDS:** Gene therapy. Viral vector. Ocular gene therapy. Retinal dystrophy. Leber congenital amaurosis.

#### Correspondencia:

\*Óscar Francisco Chacón-Camacho  
Unidad de Investigación  
Servicio de Genética  
Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana  
Chimalpopoca, 14  
Col. Obrera, Del. Cuauhtémoc, C.P. 06800, México D.F., México  
Email: [oscar\\_chacon73@hotmail.com](mailto:oscar_chacon73@hotmail.com)

Fecha de recepción en versión modificada: 23-12-2014  
Fecha de aceptación: 12-01-2015

## In introducción

En las dos décadas anteriores se han desarrollado técnicas moleculares para ofrecer la posibilidad de una forma distinta de terapia de trasplante (terapia génica) en la cual un gen normal es «trasplantado» dentro de las células de una persona afectada, permitiendo así la supervivencia y una función normal del individuo. La terapia génica es la liberación de secuencias exógenas de DNA conocidas como transgenes que son introducidas en células huésped, provocando en respuesta la producción de proteínas, aprovechando las estructuras transcripcionales y traducionales del huésped<sup>1</sup>. La transducción celular es un proceso mediante el cual se infectan células introduciendo en ellas material genético utilizando distintos vectores como lo son los virus. Actualmente, alguno de los siguientes métodos se utiliza como terapia génica para tratar o prevenir enfermedades genéticas específicas:

- Reemplazar el gen mutado con una copia sana de éste.
- Silenciar un gen con función anormal para evitar su expresión.
- Adicionar o eliminar genes que están indirectamente relacionados con la fisiopatología de la enfermedad.
- Corregir genéticamente mediante la recombinación homóloga la secuencia del gen mutado<sup>2-3</sup>.

El ojo ofrece muchos beneficios como blanco para la terapia génica ya que es un órgano aislado con privilegio inmunológico y fácilmente accesible<sup>3-6</sup>. La aplicación de este tratamiento por distintas vías de liberación intraocular (lo que permite manipular los diferentes tipos celulares), el tamaño reducido y estructura aislada del ojo, el uso de diferentes vectores que alcanzan un efecto terapéutico con mínimos efectos adversos sistémicos, así como la identificación de muchos genes causantes de enfermedades oculares y la disposición de estudio de modelos animales<sup>5</sup>, hacen a este órgano único y fundamental para los estudios de la terapéutica genética.

En esta revisión se delinearán las vías de liberación del material genético dentro del ojo, las estrategias de la terapia génica moderna estableciendo principalmente las ventajas y desventajas de los diferentes vectores virales utilizados. Posteriormente, se describirán los avances y logros de la terapia génica en el tratamiento de diversas enfermedades oculares humanas como la LCA, la enfermedad de Stargardt (STGD), la coroideremia (CHM) y la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE).

## Vías de introducción de material genético dentro del ojo

La liberación de genes en el ojo se puede llevar a cabo mediante la inyección de vectores por diferentes vías. El criterio para la elección de cada una de ellas se basa en la célula o tejido ocular específico que se desea modificar, además de las características del vector utilizado<sup>3,6</sup> (Fig. 1).

La inyección del vector en el espacio subretiniano permite transducir la capa celular externa de la retina, el epitelio pigmentario de la retina (EPR) y de manera más específica, los conos. Este método es útil para el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina (LCA, STGD, acromatopsia, y retinosis pigmentaria [RP]) causadas por mutaciones en genes expresados en los fotorreceptores (FR) o EPR<sup>3,7-9</sup>.

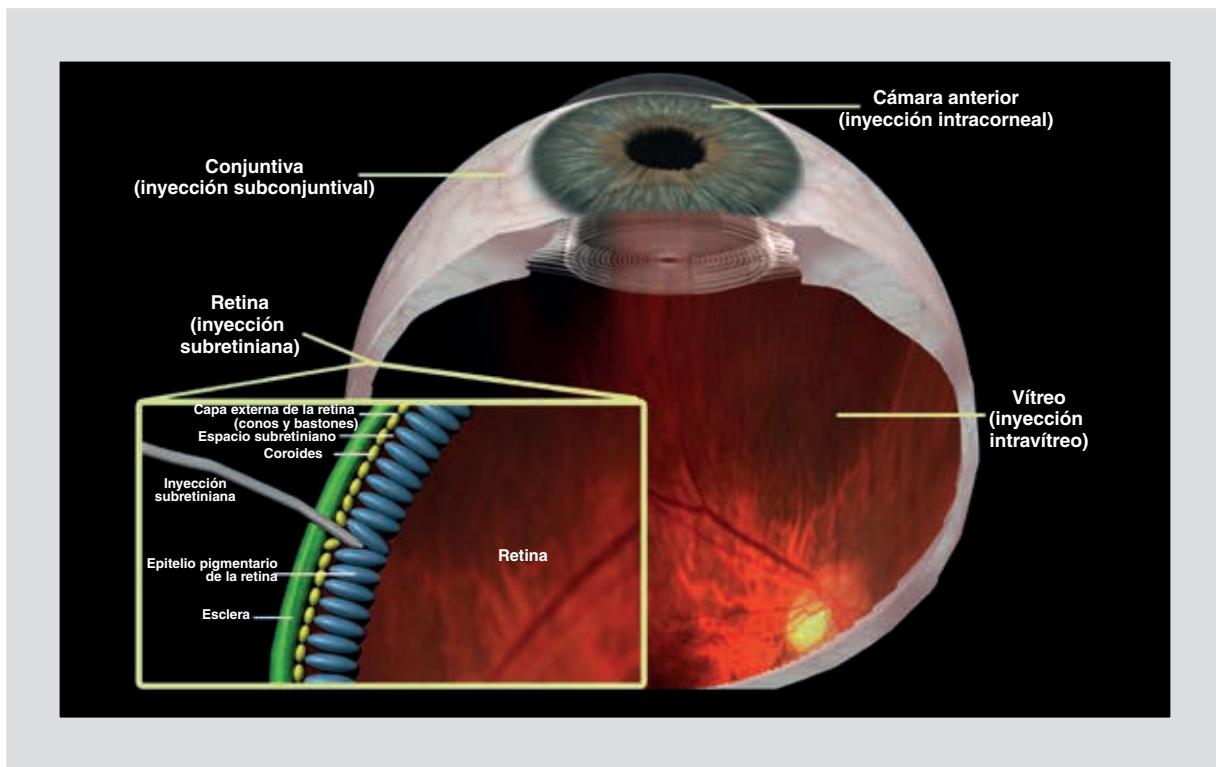
La introducción del vector en el espacio vítreo permite la transducción de las capas más internas de la retina, como las células de Müller. Esta ruta es útil para el tratamiento de la neovascularización retiniana (como es el caso de DMRE) o para evitar la muerte de las células ganglionares retinianas en el caso del glaucoma, brindando de esta forma neuroprotección<sup>10-11</sup>.

La inyección directa en la cámara anterior permite la transducción de tejidos del segmento anterior (córnea, iris, cuerpo ciliar, canal de Schlemm). Por ejemplo, los lentivirus (LV) se han utilizado para la liberación de COX-2 (regulador de prostaglandinas) en las venas episclerales para aumentar el flujo uveoescleral<sup>12</sup> y para disminuir la inflamación que se desarrolla posteriormente a un trasplante corneal<sup>13</sup>. Spiga, et al. describieron la disminución de la metaloproteinasa-1 de matriz (MMP-1) en la malla trabecular secundaria a la utilización de corticoesteroides, y asociada a un aumento de la presión intraocular en animales de experimentación. En este estudio la inyección intracameral de un adenovirus (AV) recombinante con cDNA humano de MMP-1 logró disminuir la presión intraocular inducida por los esteroides<sup>14</sup>.

La transducción de estructuras perioculares puede lograrse mediante la inyección del vector debajo de la membrana conjuntival. Dicha técnica es útil para la liberación de proteínas antiangiogénicas para enfermedades neovasculares de la coroides<sup>15</sup>.

## Estrategias de la terapia génica

Recientemente se han descrito diferentes estrategias basadas en la introducción de material genético en células blanco del cuerpo para reemplazar, añadir,



**Figura 1.** Vías de inyección intraocular y periocular para vectores virales.

eliminar, silenciar o corregir genes que están directa o indirectamente relacionados con la fisiopatología de algunas enfermedades hereditarias<sup>2</sup>.

### Reemplazo genético

Consiste en la liberación de un gen cuya función se encuentra ausente debido a mutaciones por pérdida de función en el gen afectado. Esta estrategia puede ser utilizada en enfermedades autosómicas recesivas y en enfermedades autosómicas dominantes con mutaciones que producen haploinsuficiencia o dominancia negativa (p. ej., la RP) o en las que ya se ha realizado supresión del gen mutado, permitiendo la corrección de éste al ser reemplazado<sup>16</sup>.

### Silenciamiento génico

Consiste en la liberación de un gen o ácido nucleico para inhibir la expresión de un gen o producto génico con función anormal. Esta estrategia es útil en enfermedades autosómicas dominantes que surgen por mutaciones con ganancia de función. Actualmente se ha utilizado para silenciar oncogenes activados, eliminar respuestas indeseables en enfermedades autoinmunes o inhibir la expresión de genes proangiogénicos<sup>17,18</sup>.

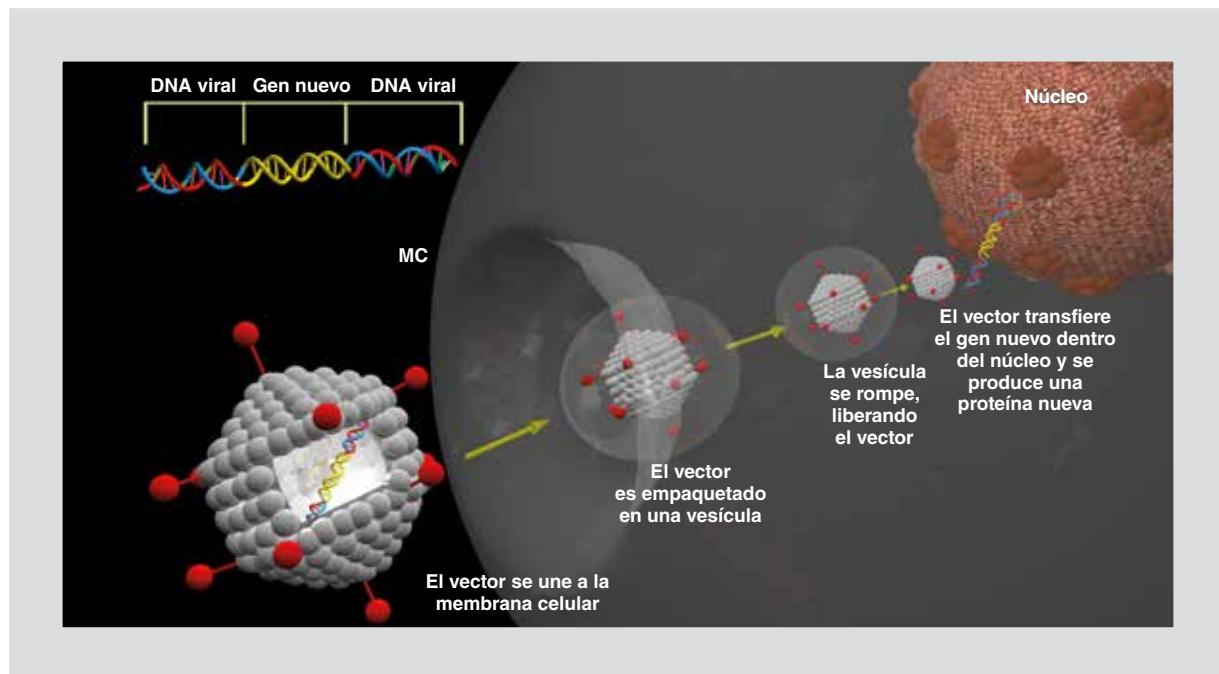
Dentro de estas estrategias se han utilizado las ribozimas<sup>19</sup>, oligodesoxinucleótidos antisentido<sup>20,21</sup> y RNA de interferencia<sup>16,22</sup>, entre otros.

### Adición génica

El objetivo de esta táctica es la liberación de un gen cuyo producto provea efectos benéficos independientes del defecto genético primario. Esta terapia se emplea para el tratamiento de enfermedades que resultan de un gen no funcional, como en el caso de las enfermedades autosómicas recesivas (p. ej., el glaucoma congénito, el gen *RPE65* [*retinal pigment epithelium 65*] en LCA), en la RP ligada al X (el gen *RPGR*) o las neovascularizaciones oculares como las DMRE<sup>1-3</sup>.

### Corrección génica

Es la liberación de ácidos nucleicos para «reparar» un gen mutado en su *locus* y restaurar su función. La corrección genética se realiza mediante la liberación de la secuencia correcta del gen con el propósito de inducir la recombinación homóloga y sustituir la secuencia que tiene la mutación patógena por una secuencia normal. Dentro de esta estrategia existe otra posibilidad de tratamiento que consiste en inducir un



**Figura 2.** Terapia génica utilizando un vector para adenovirus. El gen «nuevo» (el que tiene que reemplazar al gen mutado) se inserta dentro de un DNA viral (adenovirus, lentivirus). De esta forma el vector estará listo para ser injectado dentro de una célula blanco con el objetivo de producir una proteína nueva y funcional.

splicing alterado, provocando el salto del exón que contenga la mutación<sup>23</sup>. Esta estrategia se aplica para enfermedades autosómicas dominantes o recesivas. Útil en la transcripción *in vitro* para RP autosómica dominante causada por mutaciones en la rodopsina<sup>24,25</sup>.

## Vectores virales

La liberación génica puede realizarse mediante vectores virales y no virales. Los no virales comprenden liposomas, polímeros sintéticos, inyección directa de DNA, RNA de interferencia y electroporación, entre otros. Todos ellos tienen la desventaja de presentar una baja eficiencia y un efecto a corto plazo<sup>2,5</sup>. Por lo anterior, el método de elección son los vectores virales, los cuales han sido modificados para no ser patogénicos ni replicativos<sup>1-3</sup>, mientras preservan sitios para transportar productos transgénicos que son insertados dentro de ellos. Estos virus tienen la habilidad de infectar las células liberando en ellas el material genético, a lo que se le denomina «transducción celular»<sup>1</sup>, proceso cuyo fin es producir moléculas terapéuticas sustitutas que estén deficientes o ausentes, que sean estables y que tengan una actividad prolongada (Fig. 2). Los vectores virales más comúnmente utilizados son los virus asociados a adenovirus (AAV), los AV y los LV<sup>3,4</sup>.

## Virus tipo AAV

Los virus AAV son virus de cadena simple de DNA y los vectores ideales por su habilidad y eficiencia para transducir varios tipos celulares durante largos períodos y con baja inmunogenicidad<sup>3-4</sup>. Su limitación es su capacidad de empaquetamiento de 4.7 kb; sin embargo, se han desarrollado nuevos serotipos con los cuales se amplía el empaquetamiento hasta 8.4 kb, permitiendo tratar enfermedades de genes grandes como en la STGD. Los vectores AAV se están utilizando actualmente en ensayos clínicos en fase I/II para la terapia génica de diversas enfermedades como la fibrosis quística<sup>26</sup>, la deficiencia de antitripsina α-1<sup>27</sup>, las distrofias musculares<sup>28</sup>, la enfermedad de Batten<sup>29</sup>, la enfermedad de Parkinson<sup>30</sup> y han mostrado eficiencia en pacientes con hemofilia B<sup>31</sup> y LCA<sup>32</sup>. Los vectores derivados de AAV son actualmente los vectores más prometedores para la liberación génica en la retina. Recientemente, la administración subretiniana de AAV2 ha demostrado ser segura y efectiva en pacientes con una forma rara de ceguera hereditaria (LCA), sugiriendo que la terapia génica retiniana mediada por AAV puede ser exitosamente extendida a otras condiciones que dañan severamente la visión<sup>33</sup>. Asimismo, esto es apoyado por la gran versatilidad de AAV como plataforma de vectores. Debido a que hay un gran

número de variantes de AAV y muchas de ellas con características únicas transduccionales, estos vectores pueden ser dirigidos a diferentes tipos celulares en la retina, incluyendo la glía, el epitelio y muchos tipos de neuronas<sup>34</sup>. Actualmente, una serie de estos vectores han sido designados *in vitro* para tratar a una variedad de modelos animales con enfermedades retinianas<sup>35,36</sup>. De esta forma, a la fecha se han descrito 11 serotipos y más de 100 variantes, cada uno de los cuales difiere en la secuencia de aminoácidos, particularmente aquellos que se encuentran dentro de la región hipervariable de la proteína de la cápside, lo cual deriva también en las diferencias de las propiedades para la liberación génica de cada variante<sup>37</sup>. Por ejemplo, vectores AAV2 tienen una transducción sostenida en más del 50% de los FR, sugiriendo que este vector puede ser capaz de tener un efecto prolongado en el tratamiento de estas degeneraciones<sup>38-40</sup>. Otros vectores estudiados en modelos murinos, como AAV5, AAV8 y AAV9, han demostrado que pueden tener una tasa más alta en la eficiencia de la transducción y una expresión transgénica de inicio más rápido<sup>41-42</sup>.

### **Virus tipo LV**

Son virus con envoltura lipídica y doble cadena de RNA, derivados del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (HIV 1) o el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV). Resultan eficientes en la transducción de células no divisorias y expresión transgénica a largo plazo en el endotelio corneal, la red trabecular y los tejidos de la retina. Se ha observado una mayor eficiencia en la transducción de FR con EIAV que con los vectores de HIV 1, como fue demostrado en el estudio de STGD en modelos animales realizado por Kong, et al.<sup>9</sup>. Estos vectores tienen la capacidad de empaquetar hasta 8 kb de genoma, el cual es inmediatamente integrado a los cromosomas de la célula huésped.

### **Virus tipo AV**

Son virus con doble cadena de DNA utilizados para la liberación génica en tejidos perioculares, estructuras anteriores del ojo y en la retina. La gran ventaja de estos productos transgénicos de corta vida es que podrían utilizarse para destruir células malignas como en el caso del retinoblastoma, en el que los vectores de AV expresan cinasa de timidina del herpes virus, la cual convierte la prodroga de ganciclovir en una forma trifosfatada que inhibe la replicación de DNA y elimina las células transducidas<sup>43</sup>. Además, dicho vector no se

integra al genoma de las células blanco, disminuyendo el riesgo de oncogénesis insercional. Sus desventajas incluyen una capacidad limitada de transporte y de transducir algunos tipos de células de la retina y el vítreo, inicio lento de la expresión, además de no ser útiles para terapias que requieren transcripción génica a largo plazo debido a la respuesta inmunológica que desencadenan. Por lo tanto, se han desarrollado variantes vectoriales (p. ej., el *helper dependent Ad*, HD-Ad) que interrumpen los sitios antigenicos para la evasión inmune del huésped y de tal manera permiten la expresión transgénica intraocular hasta un año posterior a la aplicación del vector<sup>44</sup>.

## **Terapia génica ocular en humanos**

### **Degeneraciones retinianas hereditarias**

Las distrofias retinianas hereditarias forman un numeroso grupo de enfermedades genéticas y fenotípicamente heterogéneas que están caracterizadas por la pérdida progresiva de los FR (conos y/o bastones) y consecuentemente de la visión. Estas enfermedades afectan a ~1 de 2,000 individuos en la población general. A la fecha se han identificado 221 genes y 261 *loci* asociados con distrofias retinianas tanto aisladas como sindromáticas<sup>45</sup>. La mayoría de estas enfermedades son causadas por mutaciones con pérdida de la función y siguen patrones hereditarios autosómicos recesivos, autosómicos dominantes o ligados al cromosoma X<sup>46</sup>.

Varias características hacen a la retina un blanco atractivo para la terapia génica. Comparado con la mayoría de otros órganos-sistemas, el ojo es pequeño y compartimentado, permitiendo la liberación de cantidades pequeñas de vectores génicos cercanos o en el mismo sitio blanco, por ejemplo el espacio subretiniano o espacio vítreo. La anatomía de esta compartimentación y la presencia de la barrera hematorretiniana también limitan la diseminación del vector fuera del ojo, lo que reduce la severidad de las respuestas inmunes a la transferencia de estos vectores. Otra ventaja de la terapia retiniana es que la población celular blanco es muy estable y puede permitir la expresión transgénica sostenida<sup>46</sup>.

Los primeros estudios de terapia génica para enfermedades genéticas retinianas fueron realizados en modelos animales, y mostraron mejoras modestas, pero genuinas, en la función y sobrevida de algunos tipos celulares retinianos. Con el paso de los años el desarrollo de mejores vectores para la transferencia génica retiniana ha dirigido a una mejor eficiencia en

el tratamiento de una amplia variedad de modelos animales, llevando en el año 2008 al inicio de varios ensayos clínicos para la LCA causada por la deficiencia del gen *RPE65*. Los resultados de estos primeros ensayos sugieren que el tratamiento de las distrofias retinianas hereditarias con base en terapia génica puede ser seguro y efectivo<sup>46</sup>.

### **Primeros estudios de la terapia génica para las distrofias retinianas**

El primer estudio definitivo de la terapia génica para un defecto de FR fue realizado en el año 2001 en ratones Rds, los cuales presentan mutaciones nulas en el gen *Prph2* (periferina 2)<sup>47-48</sup>. La inyección subretiniana de AAV2 que portaba el gen murino de *Prph2* y un promotor bovino de rodopsina resultó en la expresión de la proteína periferina 2 en el segmento externo del FR. Esto provocó una restauración del electrorretinograma (ERG) a ~ 25% de los niveles de las células silvestres. No obstante, a pesar de la mejora significativa en la función de los FR en estos ratones, la duración de la función fue limitada debido a la degeneración progresiva de FR<sup>48</sup>. Este éxito parcial de rescate de estas células fue seguido por la primera intervención efectiva de una distrofia retiniana causada por defectos de *RPE65*. De esta forma, el modelo más célebre es el del perro Briard, el cual porta una delección natural de 4 pares de bases del gen *RPE65*<sup>49</sup>. Inyecciones subretinianas de AAV2 en estos animales a los 4 meses de edad potenciaron una mejoría de sus ERG, potenciales evocados visuales, respuesta pupilar, así como comportamientos dependientes de la visión y un retorno funcional de la vía transduccional revelado por análisis histológico en la expresión de los FR<sup>50,51</sup>.

### **Terapia génica en humanos con LCA por mutación en *RPE65***

La LCA es una distrofia retiniana congénita que origina una severa pérdida de la visión desde edades muy tempranas. Esta enfermedad afecta aproximadamente a 1/81,000 individuos y hasta un 20% de los niños que son atendidos en escuelas para ciegos<sup>52</sup>. La observación cuidadosa y la descripción clínica de pacientes con LCA han revelado un espectro de fenotipos y mucha variabilidad en la progresión de la enfermedad. Todos los pacientes tienen un déficit visual temprano y severo (antes del año de edad), una atenuación o incluso ausencia de las ondas electrorretinográficas y la ausencia de datos sistémicos. La pérdida

de la agudeza visual es profunda y progresiva desde el nacimiento. Otros signos oftalmológicos asociados incluyen el signo oculodigital («frotamiento» de ojos), queratocono/queratoglobo, catarata, estrabismo, migración de pigmento intraretiniano, atrofia macular y palidez del nervio óptico<sup>52</sup>. A la fecha al menos 22 genes retinianos se han encontrado asociados a esta distrofia, la mayoría de los cuales presentan un patrón hereditario autosómico recesivo, aunque también en raras ocasiones se ha descrito un patrón autosómico dominante<sup>53</sup>. La ceguera nocturna es un síntoma universal en los pacientes con LCA con mutaciones en *RPE65* (LCA2). Estos sujetos inicialmente tienen mala visión y nistagmus. Los registros electrorretinográficos obtenidos tempranamente durante la infancia han demostrado una función residual de los conos, y esto probablemente se correlaciona con la preservación de la arquitectura retiniana y de los FR durante las fases iniciales de la enfermedad. De forma interesante, en la LCA2 la función visual puede mejorar en los primeros años de vida para posteriormente deteriorarse durante la tercera a quinta décadas de la vida<sup>54,55</sup>.

El éxito de la terapia génica en modelos animales deficientes en *RPE65* por aproximadamente 13 años, la restauración de la función visual y una dosis única aplicada en los modelos caninos han dirigido a 3 ensayos clínicos, los cuales son los primeros que utilizan este tipo de tratamiento en las enfermedades hereditarias del ojo<sup>56-58</sup>. En un primer estudio, Maguire, et al. describieron la eficacia y seguridad de la terapia génica en tres pacientes con LCA2 (entre 19 y 26 años) en quienes sus ojos derechos (los más afectados) fueron seleccionados para cirugía para la liberación del DNA recombinante (virus AAV y cDNA de *RPE65*), mientras que sus ojos izquierdos se utilizaron como controles. La eficacia fue monitorizada con medidas objetivas y subjetivas de visión por comparación del promedio de al menos 4 medidas preoperatorias con el promedio de al menos 4 medidas tomadas 1 mes después de la inyección. Las medidas objetivas fueron el reflejo pupilar y el test de nistagmus, mientras que como medidas subjetivas se incluyeron exámenes de la agudeza visual, campos visuales de Goldmann y un examen de movilidad para evaluar la habilidad del paciente para caminar en un cuarto poco iluminado y con obstáculos<sup>56</sup>. Los resultados demostraron que los 3 ojos que recibieron la inyección tuvieron una conducción más efectiva de la respuesta pupilar (aproximadamente 3 veces más que la medida basal al empezar el estudio), así como una disminución de la frecuencia de nistagmus en posición primaria, secundarias y cubriendose

un ojo<sup>56</sup>. La agudeza visual medida como el logMAR (log del mínimo ángulo de resolución), que puede tener un intervalo entre 0.00-2.00, mostró mejorías para el logMAR de 0.28, 0.45 y 0.34 para los pacientes 1, 2 y 3, respectivamente. Asimismo, se observó que en la cartilla de Snellen los pacientes 1 y 2 que únicamente reconocían el movimiento de manos (0 letras en la cartilla) mejoraron su agudeza visual a 20/1,050 (aproximadamente 2 líneas) y 20/710 (22.5 letras o > 4.5 líneas), en tanto que el paciente 3, que tenía una agudeza visual base de 20/640, mejoró a 20/290 (> 3.5 líneas)<sup>56</sup>. El examen de habilidad para caminar con obstáculos antes del tratamiento fue muy complicado y los pacientes colisionaron con la mayoría de los 14 obstáculos y se desviaron de su camino en múltiples ocasiones. Después de la inyección el paciente 2 fue capaz de seguir las líneas del camino<sup>56</sup>. Este estudio no tuvo efectos adversos serios. Al mismo tiempo, Bainbridge, et al. estudiaron a tres pacientes jóvenes (17-23 años) con inicio temprano y distrofia retiniana severa causada por mutaciones en RPE65<sup>57</sup>. En cada afectado, el ojo con la peor agudeza visual fue seleccionado como ojo de estudio, mientras que el ojo contralateral fue usado como control. Este estudio demostró mejorías en la visión medida por microperimetria a la adaptación en la oscuridad, así como en el test de habilidad para caminar en un espacio poco iluminado en un solo paciente a 6 meses posteriores a la cirugía. El estudio también fue seguro y se demostró eficacia en un paciente<sup>57</sup>. En un último estudio realizado en 3 pacientes, Hauswirth, et al. demostraron (en un seguimiento temprano de 90 días después de la inyección) únicamente un incremento significativo ( $p < 0.001$ ) de la sensibilidad visual en condiciones de poca iluminación ambiental (sensibilidad a la adaptación a la oscuridad)<sup>58</sup>. Simonelli, et al. en la cohorte de 3 sujetos descritos por Maguire, describieron la seguridad y eficacia a 1.5 años de iniciada la terapia génica<sup>59</sup>. En este reporte la respuesta inmunológica continuó siendo benigna y no hubo eventos adversos. Las medidas del diámetro pupilar fueron cuantificadas a través de la velocidad (VPLR) y amplitud (APC) del reflejo pupilar y hubo evidencia de que entre los días 150 y 415 hubo una notable mejoría en la VPLR, la cual persistió hasta el día 545 (último día de corte del estudio). Se identificaron valores p significativos comparando las velocidades en los días 415, 365 y 305 en los tres sujetos. El examen de movilidad ocular con videos demostró en un seguimiento desde el día 60 en los sujetos 1 y 3 que hubo una disminución del nistagmus monocular y binocular en la posición primaria. De manera interesante,

los pacientes 1 y 3 que habían presentado exotropia también experimentaron un decremento de ella al medirse la distancia interpupilar<sup>59</sup>. La agudeza visual continuó mejorando comparado a previos reportes. Así, el logMAR score mejoró 0.21 (de 3 a 5 líneas de letras en el ojo a 50 cm de la cartilla), 0.19 (de 4.5 a 6.2 líneas de letras en el ojo a 50 cm de la cartilla) y 0.24 (de 8 a 10.4 líneas de letras en el ojo a 50 cm de la cartilla) en los pacientes 1, 2 y 3, respectivamente. En la habilidad para caminar en un cuarto oscuro con obstáculos, todos los sujetos mostraron una escasa pero continua mejoría en este año y medio de valoración comparados con el día 30 de evaluación<sup>59</sup>. Recientemente, Testa, et al. después de 3 años de seguimiento en 5 pacientes (3 de los cuales fueron descritos por Maguire y Simonelli<sup>56,59</sup>) demostraron una mejoría estadísticamente significativa de la agudeza visual corregida entre la medida base y 3 años después del tratamiento en el ojo tratado ( $p < 0.001$ ) y el ojo no tratado ( $p = 0.041$ ). En forma particular, la máxima agudeza visual corregida fue observada a los 6 meses después del tratamiento en 3 pacientes y a los 18 meses en un paciente. Posteriormente a esas fechas todos los pacientes permanecieron estables a través de los 3 años de tratamiento. Un paciente que tuvo un agujero macular como efecto adverso después de 14 días del tratamiento inicial mostró empeoramiento de esta secuela, pero también una mejoría de su agudeza visual y estabilidad de ésta en los 3 años de terapia<sup>60</sup>. También se observó un aumento del área de campo visual, siendo el más grande observado en el día 60 para 4 pacientes y en el día 180 para un paciente. En todos los pacientes este aumento permaneció estable durante los 3 años de tratamiento<sup>60</sup>. Se observó una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de diferencia de constricción entre el ojo tratado comparado con el no tratado en 3 pacientes en un corte realizado al año de tratamiento. De la misma forma, no hubo diferencia significativa en el porcentaje de contracción pupilar a corto y largo plazo en tiempo para ningún paciente, lo que demostró que el reflejo pupilar a la luz fue estable en los 3 años de tratamiento<sup>60</sup>. En todos los pacientes se observó también una reducción en la frecuencia de nistagmus entre el ojo tratado y el no tratado comparando la medida basal y el periodo reportado en este estudio<sup>60</sup>. La habilidad de los sujetos para caminar en un cuarto oscuro con obstáculos (cuantificada por el número de obstáculos evitados y el tiempo cronometrado en cruzar el cuarto) permaneció estable durante los 3 años. El promedio de engrosamiento macular,

depresión foveolar y laminación retiniana permaneció estable mediante análisis por tomografía de coherencia óptica (OCT) durante los 3 años de seguimiento<sup>60</sup>. La microperimetria realizada en un paciente demostró una mejoría evidente en la estabilidad de fijación en ambos ojos (tratado y no tratado) a través de los 3 años después de la terapia<sup>60</sup>. En conclusión, en ensayo clínico la terapia génica en pacientes con LCA2 ha demostrado una estabilidad en la mejoría de la función visual y retiniana lograda pocos meses después del tratamiento.

### **Terapia génica para la STGD: Stargen**

La STGD es la degeneración retiniana juvenil más común y tiene una frecuencia de 1 en 10,000 individuos. Esta enfermedad está caracterizada por un daño rápido de la visión central, atrofia bilateral del EPR foveal y la aparición frecuente de *flecks* amarillentos en la mácula y región perimacular de la retina. Diferentes mutaciones en el gen ABCA4 son responsables de una amplia variedad de distrofias retinianas, incluyendo la RP, la distrofia de cono-bastón, la DMRE y la STGD<sup>61</sup>.

En ratones carentes de copias funcionales de ABCA4 se ha demostrado una demora en la adaptación a la oscuridad, un incremento de *all-transretinal* posterior a la exposición a la luz, PE (fosfatidil-etanolamina) en el segmento externo de los FR y un depósito excesivo de lipofuscina en el EPR<sup>62</sup>. Recientemente, Binley, et al. han demostrado seguridad en la transducción de los FR con LV (EIAV) que contienen el gen ABCA4 en conejos y macacos<sup>63</sup>. La liberación de un gen normalmente funcional a los FR que portan una mutación en el gen ABCA4, vía terapia génica, debe ser considerada como una posible «cura» para las enfermedades asociadas a ABCA4, debido a que todas estas enfermedades son recesivas, causadas por una variable insuficiencia que excede el 50% de la funcionalidad del gen (así el agregar un gen funcional podría restaurar la funcionalidad totalmente), y a que la degeneración de las células retinianas en todas las enfermedades por ABCA4 es tardía; por lo tanto, esto permite una ventana de tiempo razonable para una posible intervención terapéutica<sup>9</sup>.

Basados en estudios animales, se han iniciado ensayos clínicos utilizando Stargen, un tratamiento basado en LV que portan el gen ABCA4. Actualmente se están realizando dos ensayos clínicos que aceptaron a 28 pacientes y están evaluando los niveles de seguridad de 3 distintas dosis (fase I/IIa). El único reporte

hasta la fecha menciona que 8 pacientes han sido tratados en el primer nivel de dosis sin ningún efecto adverso serio y que se va a proceder al siguiente nivel de dosis<sup>64</sup>.

### **Terapia génica en pacientes con CHM**

La CHM es una distrofia retiniana ligada a X que tiene una prevalencia de 1 en 50,000-100,000 individuos y que se caracteriza por una degeneración progresiva de la coriocapilaris, el EPR y los FR. Esta enfermedad es causada por mutaciones en el gen REP-1 que codifica una proteína implicada en el tráfico vesicular<sup>65</sup>. En la primera o segunda décadas de la vida los afectados (masculinos) comienzan a presentar nictalopía seguida por restricciones del campo visual periférico y visión en túnel. En la mayoría de los casos, la visión central está preservada hasta la edad de 40-50 años. Paralelo a los cambios progresivos de la agudeza visual, aparecen cambios pigmentarios finos con atrofia coroidal focal y moteado pigmentario que frecuentemente es descrito como en «sal y pimienta». La degeneración progrésa más centralmente para incluir áreas de atrofia en la periferia de la coroides y el EPR. Hasta las últimas etapas de la enfermedad se reporta atrofia en la mácula<sup>66</sup>. Seis pacientes masculinos (35-63 años) fueron aceptados en un ensayo clínico para valoración de fase I y fueron tratados con la liberación subretiniana del vector AAV con el gen CHM<sup>67</sup>. A pesar de tener un desprendimiento de retina secundario a la intervención quirúrgica, lo cual normalmente reduce la agudeza visual, dos pacientes con CHM más avanzada y quienes tuvieron una agudeza visual corregida basal más baja ganaron 21 letras y 11 letras, respectivamente (más de 2 y 4 líneas de visión), mientras que los otros cuatro pacientes con agudeza visual basal normal, a los 6 meses tuvieron una pérdida mínima visual de 1 a 3 letras. La máxima sensibilidad medida con la microperimetria con adaptación a la oscuridad incrementó en los ojos tratados desde 23-0 db basal a 25-3 db después del tratamiento. En este estudio, de forma interesante, los dos pacientes con más severa CHM mejoraron su agudeza visual comparando una exploración oftalmológica basal y otra 6 meses después de la terapia; mientras tanto en los otros 4 pacientes se preservó su función visual a pesar de la intervención quirúrgica, lo que permitirá con valoraciones subsecuentes la preservación de la agudeza central y evitar o prevenir la degeneración macular, que es característica de las etapas finales de la enfermedad.

## Otros ensayos clínicos y estudios preclínicos con terapia génica ocular

### Terapia génica en pacientes con RP con mutaciones en el gen *MERTK* (receptor humano de tirosina-cinasa MER)

Un ejemplo de terapia génica para RP en modelos animales que asemejan las enfermedades en humanos es la dirigida a mutaciones en el gen *MERTK*. El producto de este gen es requerido para la fagocitosis de los segmentos externos del FR por el EPR, y cuando está ausente dirige a una degeneración autosómica recesiva profunda de la retina<sup>68</sup>. Se han realizado estudios de reemplazamiento génico utilizando AV, AAV y LV, donde el empleo de este último en los primeros estudios fue el más exitoso ya que fue capaz de preservar la función retiniana al menos 7 meses postinyección en ratas<sup>69</sup>. La coadministración de lenti-Mertk y AAV expresando el factor neurotrófico derivado de las células gliales fue más efectiva que el lenti-Mertk solo<sup>70</sup>. Más recientemente, los vectores AAV8 y AAV2 mostraron función retiniana constante y seguridad en ratas después del tratamiento<sup>71,72</sup>. Debido a esto, un ensayo clínico en fase I utilizando un vector AAV2 con un promotor específico del EPR y que contiene MERTK se ha iniciado en Arabia Saudita, y a la fecha 3 pacientes se han tratado con una inyección subretiniana sin efectos adversos registrados hasta el momento<sup>68</sup>.

### Terapia génica en pacientes con síndrome de Usher (USH)

El USH es un grupo heterogéneo de enfermedades autosómicas recesivas que se caracterizan por sordera y ceguera. Se han descrito 3 formas que se distinguen por la severidad y progresión de la sordera con o sin disfunción vestibular y la RP<sup>73</sup>. USH1 es la forma más frecuente y mutaciones en al menos 5 genes están asociadas con esta enfermedad, siendo el gen MYO7A responsable del 60% de las mutaciones en este subtipo<sup>73</sup>. Estudios en modelos ratones (*shaker 1 mouse model*) han demostrado que la inyección subretiniana de EIAV-MYO7A es capaz de expresarse en el EPR y los FR<sup>74,75</sup>; de la misma forma, en macacos se ha demostrado que esta inyección subretiniana es segura y bien tolerada<sup>75</sup>. Por las razones anteriores se ha iniciado un ensayo clínico fase I en Reino Unido empleando el vector lentiviral (EIAV) para evaluar la seguridad de la liberación subretiniana de MYO7A en pacientes con USH1B<sup>68</sup>.

### Terapia génica en pacientes con DMRE

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es el mayor factor proangiogénico promotor de la neovascularización de la vasculatura coroidea en la DMRE, la cual es la principal causa de ceguera en personas mayores de 65 años<sup>76</sup>. Recientemente, un vector AAV2 con una proteína químérica soluble nueva (AAV-sFLT01) controló la neovascularización después de una simple inyección en un modelo murino cuando fue liberada intravítreamente, una ruta menos traumática que la administración subretiniana<sup>77-79</sup>. Posteriormente Lukason, et al. incluyeron el análisis en primates no-humanos en un modelo de neovascularización coroidal, observándose una expresión por 5 meses en el humor acuoso<sup>80</sup>. Basados en estos datos y la seguridad demostrada en monos, Genzyme/Sanofi ha iniciado un ensayo clínico en fase I utilizando AAV2-sFLT01 intravítreo para DMRE. La inyección vítreo de AAV-endostatina, AAV-angiostatina o vector lentiviral de angiostatina también han demostrado disminuir significativamente la neovascularización coroidea. En parte, esos datos han dirigido a la fase I de un ensayo clínico empleando un vector EIAV lentiviral que expresa endostatina (un producto del metabolismo del colágeno XVIII) y angiostatina (un producto del metabolismo del fibrinógeno), ambos inhibidores de la angiogénesis.

### Terapia génica en pacientes con enfermedades hereditarias oftalmológicas

A la fecha hay muchos modelos preclínicos en estudio, incluyendo *GUCY2D* (LCA), *GNAT2*, *CNGB3* (acromatopsia), *MFRP* (nanoftalmos-RP autosómica recesiva), entre otros. En México, Zenteno, et al. describieron un nuevo síndrome autosómico recesivo caracterizado por nanoftalmos-RP-foveosquisis-drusas de nervio óptico en dos familias mexicanas<sup>81,82</sup> y una española<sup>83</sup>. Dicho síndrome se inicia en la segunda o tercera décadas de la vida y los autores buscaron mutaciones en el gen *MFRP* debido a que éste se ha relacionado en reportes previos a nanoftalmos y porque en un modelo de animal murino deficiente de *MFRP* (*rd6 MFRP*) se presentó en el cuadro clínico degeneración retiniana recesiva. Se identificaron en todas las familias estudiadas mutaciones homocigotas, incluyendo un heterocigoto compuesto. Estos hallazgos son apoyados por Won, et al., quienes demostraron que este gen es necesario para el mantenimiento de los FR<sup>84</sup>. En un estudio realizado en un modelo ratón con inicio temprano de las características patológicas, la liberación

subretiniana posnatalmente en el día 14 de un vector AAV8 contenido el cDNA *MFRP* pudo prevenir la degeneración de FR y restaurar la función en el ratón rd6 (a los 2 meses postinyección evaluado por ERG e histología retiniana), indicando que el modelo puede ser útil para la terapia génica en algún ensayo clínico<sup>85</sup>. Recientemente, utilizando un vector AAV2 modificado al reporte anterior<sup>85</sup>, también fue demostrado que la terapia génica demoró efectivamente la degeneración de los FR, pero no de una forma tan eficiente como en el estudio anterior<sup>86</sup>.

## Conclusión

Se ha realizado un progreso notable en el entendimiento de la patogénesis de las enfermedades hereditarias oculares y en el mejoramiento de la seguridad y especificidad de los métodos de transferencia de genes oculares utilizando ciertos vectores. Se han reportado éxitos preliminares en la fase I de ensayos clínicos realizados para enfermedades como la LCA, la STGD y la DMRE; no obstante, se necesitan más estudios experimentales en ojos de modelos animales para otras enfermedades y así traducirlos en ensayos clínicos para dar esperanzas a muchos pacientes, con el propósito de ofrecerles potenciales terapias oculares en un futuro cercano.

## Reconocimiento

Agradecemos al Lic. Juan E. Jiménez Aguilar del Departamento de Diseño Gráfico del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana por la realización de las imágenes de esta revisión.

## Bibliografía

- Chung DC, Lee V, Maguire AM. Recent advances in ocular gene therapy. *Curr Opin Ophthalmol*. 2009;20:377-81.
- Demetriadis AM. Gene therapy for glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol*. 2011;22:73-7.
- Colella P, Cotugno G, Auricchio A. Ocular gene therapy: current progress and future prospects. *Trends Mol Med*. 2009;15:23-31.
- Moham RR, Tovey JCK, Sharma A. Gene therapy in the cornea: 2005-present. *ProgRetin Eye Res*. 2012;31:43-64.
- Liu MM, Tao J, Chan C. Gene therapy for ocular diseases. *Br J Ophthalmol*. 2011;95:604-12.
- Sahni JN, Angi M, Irigoyen C, et al. Therapeutic Challenges to Retinitis Pigmentosa: From Neuroprotection to Gene Therapy. *Curr Genomics*. 2011;12:276-84.
- Stein L, Roy K, Kaushal S. Clinical gene therapy for the treatment of RPE65-associated Leber congenital amaurosis. *Expert Opin Biol Ther*. 2011;11:429-39.c
- Alexander JJ, Umino Y, Everhart D, et al. Restoration of cone vision in a mouse model of achromatopsia. *Nat Med*. 2007;13:686-7.
- Kong J, Kim SR, Binley K, et al. Correction of the disease phenotype in the mouse model of Stargardt disease by lentiviral gene therapy. *Gene Ther*. 2008;15:1311-20.
- DiPolo A, Aigner LJ, Dunn RJ, et al. Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Müller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:3978-83.
- Johnson EC, Guo Y, Cepurna WO, et al. Neurotrophin roles in retinal ganglion cell survival: lessons from rat glaucoma models. *Exp Eye Res*. 2009;88:808-15.
- Barraza RA, Rasmussen CA, Lowen N, et al. Prolonged transgene expression with lentiviral vectors in the aqueous humor outflow pathway in nonhuman primates. *Hum Gene Ther*. 2009;20:191-200.
- Barraza RA, McLaren JW, Poeschla EM. Prostaglandin pathway gene therapy for sustained reduction of intraocular pressure. *Mol Ther*. 2010;18:491-501.
- Spiga MG, Borrás T. Development of a gene therapy virus with a glucocorticoid-inducible MMP1 for the treatment of steroid glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:63029-41.
- Saishin Y, Silva RL, Saishin Y, et al. Periocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization in a human-sized eye. *Hum Gene Ther*. 2005;16:473-8.
- O'Reilly M, Palfi A, Chadderton N, et al. RNA interference mediated suppression and replacement of human rhodopsin in vivo. *Am J Hum Genet*. 2007;81:127-35.
- Reich SJ, Fosnot J, Kuroki A, et al. Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis*. 2003;9:210-16.
- Murata M, Takanami T, Shimizu S, et al. Inhibition of ocular angiogenesis by diced small interfering RNAs (siRNAs) specific to vascular endothelial growth factor (VEGF). *Curr Eye Res*. 2006;31:171-80.
- Lewin AS, Drenser KA, Hauswirth WW, et al. Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Med*. 1998;4:961-71.
- Law LY, Zhang WV, Stott NS, et al. In vitro optimization of antisense oligodeoxynucleotide design: an example using the connexin gene family. *J Biomol Tech*. 2006;17:270-82.
- Chang CY, Lau-Fenton WT, Law LY, et al. Antisense down regulation of connexin 31.1 reduces apoptosis and increases thickness of human and animal corneal epithelia. *Cell Biol Int*. 2009;33:376-85.
- Kim B, Tang Q, Biswas PS, et al. Inhibition of ocular angiogenesis by siRNA targeting vascular endothelial growth factor pathway genes: therapeutic strategy for herpetic keratitis. *Am J Pathol*. 2004;165:2177-85.
- Strachan T, Read A. Genetic approaches to treating diseases. En Human Molecular Genetics. Strachan T, Read A (Eds). Garland Science. 4a. ed. New York; 2011, pp 677-704.
- Sullivan JM, Pietras KM, Shin BJ, et al. Hammerhead ribozymes designed to cleave all human rodopsin mRNAs which cause autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Vis*. 2002;8:102-13.
- Spoerri PE, Afzal A, Li Calzi S, et al. Effects of VEGFR-1, VEGFR-2, and IGF-IR hammerhead ribozymes on glucose-mediated tight junction expression in cultured human retinal endothelial cells. *Mol Vis*. 2006;12:32-42.
- Burney TJ, Davies JC. Gene therapy for the treatment of cystic fibrosis. *Appl Clin Genet*. 2012;5:29-36.
- Flotte TR, Trapnell BC, Humphries M, et al. Phase 2 clinical trial of a recombinant adeno-associated viral vector expressing a-1-antitrypsin: interim results. *Hum Gene Ther*. 2011;22:1239-47.
- Jarmi S, Kymäläinen H, Popplewell L, et al. New developments in the use of gene therapy to treat Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Biol Ther*. 2014;14:209-30.
- Worgall S, Sondh D, Hackett NR, et al. Treatment of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis by CNS administration of a serotype 2 adeno-associated virus expressing CLN2 cDNA. *Hum Gene Ther*. 2008;19:463-74.
- Bactus RT, Baumann TL, Brown L, et al. Advancing neurotrophic factors as treatments for age-related neurodegenerative diseases: developing and demonstrating clinical proof-of-concept for AAV-neurturin (CERE 120) in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2013;34:35-61.
- Zhong L, Jayandharan GR, Aslanidi GV, et al. Development of novel recombinant AAV vectors and strategies for the potential gene therapy of hemophilia. *J Genet Syndr Gene Ther*. 2012;S1.
- Maguire AM, High KA, Auricchio A, et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2009;374:1597-605.
- Allocca M, Tessitore A, Cotugno G, et al. AAV mediated gene transfer for retinal diseases. *Expert Opin Biol Ther*. 2006;6:1279-94.
- Vandenbergh LH, Auricchio A. Novel adeno-associated viral vector for retinal gene therapy. *Gene Ther*. 2012;19:162-8.
- Allocca M, Doria M, Petrillo M, et al. Serotype-dependent packaging of large genes in adeno-associated viral vectors results in effective gene delivery in mice. *J Clin Invest*. 2008;118:1955-64.
- Tan MH, Smith AJ, Pawlyk B, et al. Gene therapy for retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis caused by defects in AIPL1: effective rescue of mouse models of partial and complete Aip1 deficiency using AAV2/2 and AAV2/8 vectors. *Hum Mol Genet*. 2009;18:2099-114.
- Bartel MA, Weinstein JR, Schaffer DV. Directed evolution of novel adeno-associated viruses for therapeutic gene delivery. *Gene Ther*. 2012;19:694-700.

38. Ali RR, Reichel MB, Thrasher AJ, et al. Gene transfer into the mouse retina mediated by an adeno-associated viral vector. *Hum Mol Genet.* 1996;5:591-4.
39. Ali RR, Reichel MB, De Alwis M, et al. Adeno-associated virus gene transfer to mouse retina. *Hum Gene Ther.* 1998;9:81-6.
40. Bennet J, Duan D, Engelhardt, et al. Real-time, noninvasive in vivo assessment of adeno-associated virus mediated retinal transduction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38:2857-63.
41. Le Meur G, Weber M, Péron Y, et al. Postsurgical assessment and long-term safety of recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into the retinas of dogs and primates. *Arch Ophthalmol.* 2005;123:500-6.
42. Allocca M, Mussolini C, García-Hoyos M, et al. Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. *J Virol.* 2007;81:11372-80.
43. Chévez-Barrios P, Chintagumpala M, Mieler W, et al. Response of retinoblastoma with vitreous tumor seeding to adenovirus-mediated delivery of thymidine kinase followed by ganciclovir. *J Clin Oncol.* 2005;23:7927-35.
44. Lamartina S, Cimino M, Roscilli G, et al. Helper-dependent adenovirus for the gene therapy of proliferative retinopathies: stable gene transfer, regulated gene expression and therapeutic efficacy. *J Gene Med.* 2007;9:862-74.
45. Retinal Information Network (Homepage en Internet). Texas: The University of Texas-Houston Health Science Center c2013 (actualizada el 8 de diciembre de 2014; consultado el 15 de diciembre de 2014). Disponible en: <https://sph.uth.edu/retnet/>
46. Smith AJ, Bainbridge JW, Ali RR. Gene supplementation therapy for recessive forms of inherited retinal dystrophies. *Gene Ther.* 2012;19:154-61.
47. Ali RR, Sarra GM, Stephens C, et al. Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat Genet.* 2000;25:306-10.
48. Sarra GM, Stephens C, De Alwis M, et al. Gene replacement therapy in the retinal degeneration slow (rds) mouse: the effect on retinal degeneration following partial transduction of the retina. *Hum Mol Genet.* 2001;10:2353-61.
49. Veske A, Nilsson SE, Narfstrom K, et al. Retinal dystrophy of Swedish briard/briard-beagle dogs is due to a 4-bp deletion in RPE65. *Genomics.* 1999;57:57-61.
50. Acland GM, Aguirre GD, Ray J, et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet.* 2001;28:92-5.
51. Acland GM, Aguirre GD, Bennet J, et al. Long term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Mol Ther.* 2005;12:1072-82.
52. Hufnagel RB, Ahmed ZM, Corrêa ZM, et al. Gene therapy for Leber congenital amaurosis: advances and future directions. *Graefes Arch Exp Ophthalmol.* 2012;250:1117-28.
53. Koenekoop RK. An overview of Leber congenital amaurosis: a model to understand human retinal development. *Surv Ophthalmol.* 2004;49:379-98.
54. Al-Khayer K, Hagstrom S, Pauer G, et al. Thirty-year follow-up of a patient with Leber congenital amaurosis and novel *RPE65* mutations. *Am J Ophthalmol.* 2004;137:375-7.
55. Traboulsi El. The Marshall M. Park memorial lecture: making sense of early-onset childhood retinal dystrophies-the clinical phenotype of Leber congenital amaurosis. *Br J Ophthalmol.* 2010;94:1281-7.
56. Maguire AM, Simonelli F, Pierre EA, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med.* 2008;358:2240-8.
57. Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med.* 2008;358:2231-9.
58. Hauswirth W, Aleman TS, Kaushal S, et al. Phase I trial of Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short terms results. *Hum Gene Ther.* 2008;19:979-90.
59. Simonelli F, Maguire AM, Testa F, et al. Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. *Mol Ther.* 2010;18:643-50.
60. Testa F, Maguire AM, Rossi S, et al. Three-Year Follow-up after Unilateral Subretinal Delivery of Adeno-Associated Virus in Patients with Leber Congenital Amaurosis Type 2. *Ophthalmol.* 2013;120:1263-91.
61. Westerfield C, Mukai S. Stargardt's disease and the ABCR gene. *Sem Ophthalmol.* 2008;23:59-65.
62. Weng J, Mata NL, Azarian SM, et al. Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice. *Cell.* 1999;98:13-23.
63. Binley K, Widdowson P, Loader J, et al. Transduction of photoreceptors with equine infectious anemia virus lentiviral vectors: safety and biodistribution of StarGen for Stargardt disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54:4061-71.
64. Han Z, Conley SM, Naash MI. Gene therapy for Stargardt disease associated with ABCA4 gene. *Adv Exp Med Biol.* 2014;801:719-24.
65. Coussa RG, Traboulsi El. Choroideremia: a review of general findings and pathogenesis. *Ophthalmic Genet.* 2012;33:57-65.
66. Roberts MF, Fishman GA, Roberts DK, et al. Retrospective, longitudinal, and cross sectional study of visual acuity impairment in choroideremia. *Br J Ophthalmol.* 2002;86:658-62.
67. McLaren RE, Groppe M, Barnard AR, et al. Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet.* 2014;383:1129-37.
68. Boye SE, Boye SL, Lewin AS, et al. A comprehensive review of retinal gene therapy. *Mol Ther.* 2013;21:509-19.
69. Tschenkner M, Schlichtenbrede FC, Howe S, et al. Long-term preservation of retinal function in the RCS rat model of retinitis pigmentosa following lentivirus-mediated gene therapy. *Gene Ther.* 2005;12:694-701.
70. Buch PK, McLaren RE, Durán Y, et al. In contrast to AAV-mediated Cntf expression, AAV-mediated Gdnf expression enhances gene replacement therapy in rodent models of retinal degeneration. *Mol Ther.* 2006;14:700-9.
71. Deng WT, Dinculescu A, Li Q, et al. Tyrosine-mutant AAV8 delivery of human MERTK provides long-term retinal preservation in RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:1895-904.
72. Conlon TJ, Deng WT, Erger K, et al. Preclinical potency and safety studies of an AAV2-mediated gene therapy vector for the treatment of MERTK associated retinitis pigmentosa. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 2013;24:23-8.
73. Bonnet C, El-Amraoui A. Usher syndrome (sensorineural deafness and retinitis pigmentosa): pathogenesis, molecular diagnosis and therapeutic approaches. *Curr Opin Neurol.* 2012;25:42-9.
74. Hashimoto T, Gibbs D, Lillo C, et al. Lentiviral gene replacement therapy of retinas in a mouse model for Usher syndrome type 1B. *Gene Ther.* 2007;14:584-94.
75. Zalloccchi M, Binley K, Lad Y, et al. ElAV-based retinal gene therapy in the shaker 1 mouse model for Usher syndrome type 1B: development of UshStat. *PLoS One.* 2014;9:e94272.
76. Ratnapriya R, Chew EY. Age-related macular degeneration-clinical review and genetics update. *Clin Genet.* 2013;84:160-6.
77. Lai CM, Shen WY, Brankov M, et al. Long-term evaluation of AAV-mediated sFlt-1 gene therapy for ocular neovascularization in mice and monkeys. *Mol Ther.* 2005;12:659-68.
78. Lai CM, Estcourt MJ, Hirnbeck RP, et al. Preclinical safety evaluation of subretinal AAV2.sFlt-1 in non-human primates. *Gene Ther.* 2012;19:999-1009.
79. Pechan P, Rubin H, Lukason M, et al. Novel anti-VEGF chimeric molecules delivered by AAV vectors for inhibition of retinal neovascularization. *Gene Ther.* 2009;16:10-6.
80. MacLachlan TK, Lukason M, Collins M, et al. Preclinical safety evaluation of AAV2-sFLT01-a gene therapy for age-related macular degeneration. *Mol Ther.* 2011;19:326-34.
81. Ayala-Ramírez R, Graue-Wiechers F, Robredo V, et al. A new autosomal recessive syndrome consisting of posterior microphthalmos, retinitis pigmentosa, foveoschisis, and optic disc drusen is caused by a MFRP gene mutation. *Mol Vis.* 2006;12:1483-9.
82. Crespi J, Buil JA, Bassaganyas F, et al. A novel mutation confirms MFRP as the gene causing the syndrome of nanophthalmos-retinitis pigmentosa-foveoschisis-optic disk drusen. *Am J Ophthalmol.* 2008;146:323-8.
83. Zenteno JC, Buentello-Volante B, Quiroz-González MA, et al. Compound heterozygosity for a novel and recurrent MFRP gene mutation in a family with the nanophthalmos-retinitis pigmentosa complex. *Mol Vis.* 2009;15:1794-8.
84. Won J, Smith RS, Peachey NS, et al. Membrane frizzled-related protein is necessary for the normal development and maintenance of photoreceptor outer segments. *Vis Neurosci.* 2008;25:563-74.
85. Dinculescu A, Estreicher J, Zenteno JC, et al. Gene therapy for retinitis pigmentosa caused by MFRP mutations: human phenotype and preliminary proof of concept. *Hum Gene Ther.* 2012;23:367-76.
86. Dinculescu A, Min SH, Deng WT, et al. Gene therapy in the rd6 mouse model of retinal degeneration. *Adv Exp Med Biol.* 2014;801:711-18.