

January 2003

## Técnicas moleculares: Un avance en el diagnóstico y conocimiento de patología oculares

Patricia Hernández Rodríguez  
revistasaludvisual@lasalle.edu.co

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/svo>



Part of the [Eye Diseases Commons](#), [Optometry Commons](#), [Other Analytical, Diagnostic and Therapeutic Techniques and Equipment Commons](#), and the [Vision Science Commons](#)

---

### Citación recomendada

Hernández Rodríguez P. Técnicas moleculares: Un avance en el diagnóstico y conocimiento de patología oculares. Cienc Tecnol Salud Vis Ocul. 2003;(1): 113-123.

This Artículo de Investigación is brought to you for free and open access by the Revistas científicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Ciencia y Tecnología para la Salud Visual y Ocular by an authorized editor of Ciencia Unisalle. For more information, please contact [ciencia@lasalle.edu.co](mailto:ciencia@lasalle.edu.co).

# TECNICAS MOLECULARES: UN AVANCE EN EL DIAGNOSTICO Y CONOCIMINETO DE PATLOGIAS OCULARES

PATRICIA HERNANDEZ RODRIGUEZ MSc

## RESUMEN

Hace 40 años era imposible pensar en la manipulación genética; pero la marcha incensante que permitió la comprensión de algunos aspectos de la regulación génica en condiciones normales y patológicas, ha generado un amplio campo investigativo. El descubrimiento de la estructura doble del DNA, la purificación del DNA y el conocimiento de la actividad que presenta ciertas enzimas (endonucleasas de restricción) sobre los ácidos nucleicos, puso en el escenario científico las herramientas necesarias para comprender ciertos procesos fisiológicos. Son muchas las disciplinas que han utilizado las tecnologías moleculares como puente para ampliar el conocimiento y sin duda, en las ciencias relacionadas con el estudio del ojo esta nueva herramienta ha generado un fuerte impacto. La correlación entre genotipo y fenotipo ha permitido precisar la clasificación de enfermedades oculares hereditaria como el albinismo. Igualmente ha generado un nuevo camino para la comprensión de la fisiología de enfermedades con un componente genético en su etiología, como en el caso del glaucoma. A partir de la genética molecular se han desarrollado técnicas, a nivel del DNA, para el diagnóstico prenatal o presintomático de patologías como la Retinitis Pigmentosa y el Retinoblastoma. El uso de la PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction), el desarrollo del DNA recombinante y la ingeniería genética ha revolucionado por completo la biología, el estudio molecular ha sido la piedra angular para múltiples adelantos científicos. Mediante esta revisión se pretende realizar una síntesis de las principales metodologías moleculares y determinar en términos globales su contribución en las ciencias relacionadas con el estudio ocular.

**Palabras claves:** patologías oculares, PCR, terapia génica, secuenciación DNA, electroforesis de proteínas.

## **MOLECULAR TECHNIQUES: PROGRESS IN OCULAR PATHOLOGY DIAGNOSIS AND KNOWLEDGE**

### **ABSTRACT**

40 years ago it was impossible to think about the genetic manipulation, but the continuous breakthroughs that have permitted the comprehension of some aspects of the gene regulation in pathological and normal conditions has generated an extensive investigative field. The discovery of the DNA double structure, the purification of the DNA and the knowledge of activity of certain enzymes (endonucleasas of restriction) on nucleic acid, put in the scientific that have used the molecular technologies as a bridge to expand the knowledge and without a doubt in the sciences related to the study of the eye this new tool has generated a strong impact. The correlation among genotype and fenotype has helped to better classify the ocular heredity of illnesses with a genetic component in it's a etiology, as in the case of the glaucoma. Techniques have been developed from molecular genetics, to the DNA level for the diagnostic of prenatal or presintomatico of pathologies as the Retinitis Pigmentosa and the Retinoblastoma. The use of the PCR (Polymerase Chain Reaction),. The development of the recombinant DNA and the genetic engineering have revolutionized completely the biology; the molecular study has been the cornerstone for many scientific advances. By means of this revision, a synthesis of the main molecular methodologies is to be conducted to determine globally its contribution to the related sciences with the ocular study.

**Key word:** ocular pathology, PCR, gene therapy, DNA secuenciation, protein electrophoresis.

## **Técnica PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)**

La finalidad de esta técnica es la amplificación en masa de determinado fragmento de DNA por medio de un "termociclador". Consiste de manera global en una serie repetitiva de ciclos, cada uno de los cuales consta de un patrón de denaturación (Temperatura 94°C), un tiempo de alineamiento del "primer" (Temperatura de 45-55°C) y un periodo de extensión (Temperatura de 72° C), que se logra mediante una enzima DNA polimerasa termostable, para crear una acumulación de fragmentos específicos. El producto sintetizado en cada ciclo puede servir como patrón en el próximo número de copias de DNA, creándose una reacción en cadena que permite amplificar un fragmento específico de DNA. Esta técnica ofrece "sensibilidad" debido a que a partir de cantidades muy pequeñas de material genético se detecta la presencia del microorganismo en una muestra; "especificidad" ya que a través de condiciones estrictas se logra amplificar únicamente el microorganismo que se busca detectar; "velocidad" que permite un procesamiento rápido si se compara con otras técnicas para detectar bacterias, hongos y virus, que requieren de cultivos celulares para aislamiento de virus. Finalmente se puede mencionar que ofrece "versatilidad" ya que con el mismo fundamento se permite el diagnóstico de diversos microorganismos.

## **Electroforesis de ácidos nucleicos y proteínas**

La finalidad de esta técnica es separar biomoléculas por peso molecular bajo la acción de un campo eléctrico. De esta forma los fragmentos de DNA que se obtienen a partir de la utilización de enzimas de restricción (que tienen la capacidad de cortar el DNA en sitios específicos) puede separarse uno del otro mediante la electroforesis en geles de agarosa (polisacárido puro que se utiliza para realizar placas de agar). El gel se sumerge en un buffer (solución amortiguadora) y los fragmentos de DNA se cargan en pozos. Estos se mueven a través del gel por acción de una carga eléctrica. Una vez transcurrido el tiempo de corrimiento de los fragmentos, el gel se sumerge en un colorante Bromuro de etidio para ser visualizado en un transiluminador observando los diversos fragmentos.

## **Secuenciación de DNA**

La finalidad de esta técnica radica en investigar la secuencia exacta de nucleótidos de un determinado fragmento de DNA. El principio básico de un método se explica que durante la síntesis de una cadena de DNA, la enzima polimerasa añade los dNTP uno tras otro, en el orden que tiene la cadena molde. Durante este proceso de secuenciación, generalmente se realizan cuatro reacciones correspondientes a cada una de las bases nitrogenadas que hacen parte de la cadena de DNA.

## Clonación de fragmentos de DNA

Este método consiste en introducir un fragmento de DNA dentro de un vector, el cual usualmente es un plásmido o un virus ya que poseen una capacidad alta de replicación dentro de las células. Este proceso comprende:

- Rompimiento de las células vivas.
- Remoción del material genético de las células.
- Obtención de genes específicos, separándolos del resto de DNA (para esto se utilizan las enzimas de restricción que reconocen y cortan secuencias específicas en el DNA).
- Incorporación de secuencias específicas de vectores. Estos son secuencias cortas de DNA que pueden penetrar la membrana de una célula viva y multiplicarse dentro de ella. Los vehículos o vectores reciben diferentes denominaciones dependiendo del tamaño que tengan; de esta forma se conocen: los plásmidos son fragmentos de DNA de 5 a 10 Kb (un Kb corresponde a 1000 pares de nucleótidos); los bacteriófagos son virus que infectan bacterias y tienen un tamaño aproximado de 45 KbM; y el Yac que es un cromosoma artificial de levaduras con tamaño de 1000 Kb.
- Transferencia del vector a la célula hospedera adecuada que usualmente es una bacteria o levadura.
- Multiplicación celular para formar los clones que contienen millones de células idénticas. Mediante esta técnica se ha transferido un fragmento de gen que no hace parte natural de la célula quedando esta nueva célula con un fragmento de DNA foráneo.

Otras técnicas utilizadas a nivel del DNA son: análisis indirecto de repeticiones CA por PCR, análisis con fragmentos polimorfos de restricción RLFP (Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción) y utilización de STR (Regiones en tandem pequeñas). En el análisis indirecto de repeticiones CA por PCR donde son utilizados "primer" fluorescentes que determinan regiones específicas en el gen y permiten por consiguiente evidenciar mutaciones en portadoras y afectados. En los estudios moleculares en los que se utilizan STR se han identificados cambios mutacionales, detección de portadoras, diagnóstico prenatal y consanguinidad genética. Este análisis con STR se establece utilizando una PCR *multiplex* con "primer" fluorescentes para regiones específicas del DNA, los cuales se usan como marcadores. Estos se amplifican en un control, se adicionan a cada muestra (material de estudio) y son electroforosados en el secuenciador para luego ser analizados de manera simultánea y determinar si las muestras tienen mutaciones al ser comparadas con los controles. Esta técnica ofrece ventajas debido a que requiere poca cantidad de DNA, un número bajo de ciclos en la PCR con lo cual se simplifica el tiempo en la obtención de resultados, además ofrece una mayor normatividad y precisión y se elimina la necesidad de usar material radiactivo.

En el análisis con RFLP se han podido establecer a partir de los polimorfos, mapas genéticos con los que identifica el cromosoma que posee la mutación. Estos polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) se originan debido a variaciones en la secuencia de nucleótidos del DNA. La

variación se presenta de manera aleatoria a través de todo el genoma; los cambios en la secuencia de DNA indican que los fragmentos que produce una enzima de restricción determinada pueden tener longitudes diferentes en distintas personas, estos cambios se detectan ya que presentan una movilidad electroforética diferente generando diversas bandas. Este hecho permite que estos polimorfismos se utilicen como marcadores para realizar análisis genético indirecto, identificando a las portadoras de una enfermedad genética.

Estas técnicas son altamente precisas y ofrecen excelentes resultados. Son ideales para detectar diferentes tipos de mutaciones en un gran número de individuos; esto ha implicado grandes adelantos en el conocimiento de múltiples enfermedades y ha ocasionado un mayor impacto sobre la prevención de familias en riesgo.

### **Terapia génica**

Esta metodología busca el reemplazo o recuperación de genes alterados o la incorporación de segmentos de DNA como mecanismos de terapia; por consiguiente, si se conoce el segmento alterado es posible incorporar en la célula defectuosa una copia normal del gen. Por esto es necesario identificar y sintetizar el fragmento de ADN, introducir por métodos físicos, químicos o biológicos el segmento de ADN en las células y finalmente asegurarse que la incorporación de este material no causa efectos secundarios como rechazo por el organismo o reacciones por parte del sistema inmunológico. La incorporación de estos genes se puede realizar en las células somáticas, de esta forma, se cambia el genoma del individuo pero esta modificación no pasa a los descendientes; por el contrario, si el reemplazo genético se lleva a cabo en los gametos, se cambio se transmite a la siguiente generación.

### **Bases genéticas de enfermedades oculares comunes**

Las enfermedades asociadas con alteraciones oculares pueden originarse a nivel cromosómico, monogénico y multifactorial. A nivel cromosómico se presentan deficiencias por fallas en el número o estructuras de los cromosomas. Los defectos debido al número de cromosomas se pueden denominar aneuploidias y poliploidias. En el primer caso existe pérdida o ganancia de uno o dos cromosomas, siendo al pérdida una *monosomía* y la ganancia una *trisomía*; y en segundo caso existen dos o tres juegos completos de cromosomas así: 92, 138, 184... Los defectos debido a cambios en la estructura pueden darse por duplicaciones, deleciones, constituyen pérdida de un segmento de DNA. Translocación implica que un segmento de cromosoma se adicione a otro, por ejemplo: un fragmento del cromosoma 21 al cromosoma 14; en las inversiones un pedazo de cromosoma se rompe, gira sobre su eje y se reorganiza en el mismo cromosoma y división celular, lo que ocasiona que una célula contenga el brazo largo del cromosoma y no tenga la información correspondiente al brazo corto y viceversa.

Los trastornos monogénicos son debidos a genes con mutaciones simples, pueden ser autosómicos dominantes, autosómicos recesivos y ligados al cromosoma X. En las fallas génicas que originan mutaciones autosómicas dominantes, tanto el genotipo homocigoto como el genotipo heterocigoto se ven afectados mientras que en las mutaciones asociadas a herencia

autosómica recesiva solo se va a manifestar en defecto en caso de homocigosis. En la herencia ligada al X, las mujeres por tener dos cromosomas pueden ser homocigotas o heterocigotas (portadoras); en el caso de los hombres que solo presentan un cromosoma X estarían afectados si heredan el cromosoma X que tiene el gen mutante y serán heterocigotos.

Los trastornos multifactoriales se deben a alteraciones en varios genes y son producto de múltiples factores genéticos y ambientales; es poco lo que se conoce sobre estos genes en patologías oculares. En la actualidad se sabe que en la patogénesis de glaucoma de ángulo primario abierto interviene un componente genético importante, sin embargo aun se desconoce la cantidad de genes que participan y la forma en que interactúan con factores ambientales. De igual forma, el DNA mitocondrial reviste gran importancia debido a que algunas enfermedades oculares están asociadas a mutaciones en dicha estructura, especialmente neuropatía óptica de Leber y retinitis pigmentosa de herencia materna entre otras.

Otra patología de orden multifactorial y que presenta alteraciones oculares severas es el retinoblastoma, tumor que aparece en la retina puede ocurrir a cualquier edad, pero se presenta con mayor frecuencia en preescolares en un 80% de los casos diagnosticados antes de los cinco años. El tumor puede ser unilateral (70%) o bilateral (30%). El retinoblastoma se limita generalmente al ojo y puede ocurrir en forma hereditaria (40%) y no hereditaria (60%). La enfermedad bilateral generalmente es hereditaria y se debe a mutaciones de tipo deleción en el gen del retinoblastoma ubicado en la banda 14 del brazo largo (q) del cromosoma 13. Los pacientes con retinoblastoma de tipo hereditario presentan con mayor frecuencia tumores de tipo óseo asociados. Estos segundos cánceres ocurren de forma espontánea como neoplasias inducidas por el tratamiento; dos tercios ocurren en el tejido irradiado y un tercio ocurre fuera del campo de irradiación.

La mayoría de pacientes con retinoblastoma presentan tumores masivos que afectan más de la mitad de la retina en el momento del diagnóstico, tumores múltiples que afectan difusamente la retina, o impregnación obvia del humor vítreo. La terapia tiene dos aspectos como meta: curar la enfermedad y preservar la salud visual tanto como sea posible, además, la orientación genética debe ser una parte integral de la terapia y todos los hermanos de pacientes con retinoblastoma deben ser examinados periódicamente. Es útil el uso de polimorfismos de DNA para predecir que personas están en riesgo. También es posible realizar estudios a nivel de citogenética que permitan evidenciar deleción en el cromosoma 13.

### **Diagnostico molecular de enfermedades oculares adquiridas**

La técnica de Biología Molecular. Especialmente la PCR, ha tenido un gran impacto en el diagnóstico clínico ya que se ha utilizado para confirmar retinitis por citomegalovirus, necrosis aguda retiniana o tuberculosis ocular en pacientes con signos clínicos atípicos. La utilidad de esta técnica en la identificación de agentes virales o bacterianos que causan patologías oculares es enorme ya que posibilita la obtención de material considerable permitiendo

verificar la presencia de un microorganismo determinado en una muestra ocular mínima. (Morris D.J., y col., 1995) determino la presencia de adenovirus en infección ocular estableciendo que la PCR es un método rápido, aseguro y sensible para detectar el virus en esta patología. Diversos estudios muestran que mediante la utilización de esta técnica ha sido detectada *Leptospira sp*, bacteria causante de leptospirosis, una enfermedad de origen zoonotico que tiene compromiso ocular; igualmente se muestra una contribución en cuanto a diferentes aspectos clínicos de leptospirosis ocular encontrándose que este agente etiológico es el responsable de múltiples casos de uveítis, neuritis y queratitis. Se han identificado mutaciones asociadas con retinitis pigmentosa y mediante esta metodología molecular se han estudiado familias en riesgo (2, 3,4).

Diversos informes muestran como la PCR permitió ampliar el conocimiento de ciertas patologías. Es así como Wolochak y col., (1994) demostraron la pérdida de heterocigocidad en el gen del retinoblastoma en tumores humanos de pituitaria. Fue posible demostrar la heterogeneidad genética en fibrosis congénita de músculos extraoculares (5,6).

Con el advenimiento de tecnología molecular ha sido posible comprender ciertos aspectos de enfermedad como retinitis pigmentosa, microoftalmia, retinoblastoma, glaucoma de ángulo abierto, enfermedades oculares por alteraciones en el DNA mitocondrial y varios tipos de distrofia corneal entre otros (7, 8,9,10,11). También se han clonado genes que causan enfermedades oculares a nivel de segmento anterior y posterior. En segmento anterior básicamente aniridia y anomalía de Peters, enfermedades autosomicas dominantes cuyos genes se ubican en la banda 13 del brazo corto del cromosoma 11; el método de aislamiento utilizado fue clonación posicional y gen candidato respectivamente (12, 13). En segmento posterior el número de genes clonados ha sido mayor. Estos se asocian con diferentes patologías, principalmente:

**Retinitis pigmentosa con patrón de herencia diverso:** en la mayoría de los casos se presenta como autosomica dominante pero también se puede encontrar en forma recesiva o digenica; la posición cromosómica es variada dentro de un mismo patrón hereditario ya que se altera un gen diferente. Es así como para la forma autosomica dominante que afecta la síntesis de rodopsina el gen se ubica entre la banda 21-24 del brazo largo del cromosoma 3, mientras que cuando se afecta la traducción de la periferina el gen responsable está ubicado en la banda 21 del brazo corto del cromosoma 6. En cuanto a la forma autosomica recesiva se han ubicado diferentes genes en el cromosoma 4 y 5 principalmente; en todos los patrones de herencia el método de aislamiento ha sido gen candidato (14, 15, 16, 17, 18).

**Ceguera nocturna estacionaria congénita:** enfermedad cuyo patrón de herencia es autosomico dominante. El gen responsable se ubica en la banda 16 del brazo corto del cromosoma 4.

**Degeneración de conos:** patrón de herencia ligado a X, lo que significa que la enfermedad es transmitida por una madre portadora, donde el 50% de los hijos



varones tienen la probabilidad de adquirir la enfermedad y el 50% de sus hijas de transmitirla; el gen se ubica en el brazo largo del cromosoma X y su alteración afecta la síntesis de opsina roja; el método de aislamiento gen candidato (19).

**Retinoblastoma:** el defecto genético afecta la proteína Rb cuyo gen clonado se ubica en la banda 14 del brazo corto del cromosoma 13; el método de aislamiento clonación posicional.

**Neuropatía óptica hereditaria de Leber:** asociada con alteración del DNA mitocondrial cuyo defecto involucra la actividad de enzimas mitocondriales (20, 21).

Estos hallazgos tienen fuertes implicaciones en la comprensión de la fisiopatología de estas entidades genéticas y generan un nuevo concepto de la práctica clínica ocular ya que con los avances en biología molecular no solo se pueden clasificar mejor la patología sino que el diagnóstico se hace específico y seguro; además, se orienta el consejo genético lo que conduce a un panorama más amplio del pronóstico para estos pacientes. Por otra parte, en aquellas enfermedades oculares debidas a mutaciones en genes ubicados en el cromosoma X, es posible identificar a las madres o mujeres por línea materna y generar medidas de prevención secundarias al informar el carácter portador o no portador de ellas.

Esta evolución ocasionada por la utilización de técnicas moleculares ha generado la incorporación de estrategias, con la terapia génica, dirigidas al tratamiento de enfermedades oculares. Campochiaro P.A., (2002) establece la utilización de terapia génica para reemplaza secuencias alteradas en enfermedades de coroides y retina, especialmente en aquellos casos de pérdida de heterocigocidad de genes diferencialmente expresados en fotorreceptores o en células epiteliales pigmentadas de la retina que conducen a degeneración retiniana, algunos experimentos evidencian progresos considerables ya que se permite el entorno de la función visual. Esta substancial evidencia sugiere que en un futuro cercano la terapia génica se constituirá en la base para el tratamiento de pacientes afectados por enfermedades retinianas (22, 23). Igualmente, la terapia génica beneficiara a pacientes con retinoblastoma, degeneración macular y neovascularización por retinopatía diabética, melanoma y neuropatía óptica de Leber, entre otro, generando una nueva era en el tratamiento de problemas oculares (24, 25).

## BIBLIOGRAFIA

1. Morris D.J., *et al.*, "Polymerase Chain for rapid detection of ocular adenovirus infection", *J. Med Virol*, 1995 Jun; 46(2): 126-32.
2. Mancel E, *et al.*, "Clinical aspects of ocular leptospirosis in New Caledonia" (South Pacific) *Aust NZ J. Ophthalmol*, 1999 Dec; 27(6): 380-6.
3. Chu KM, Rathinan R, Namperumalsammy P and Dean D., "Identification of *Leptospira* species in the pathogenesis of uveitis and determination of clinical ocular characteristics in South India", *J. Infect. Dis.*, 1998 May; 177(5): 1314-21.
4. Farrar GJ, Kenna PF and Humphires, P. "On the genetics of retinitis pigmentosa and on mutation independent approaches to therapeutic intervention". *EMBO J*, 2002 Mar; 21(5): 857-64.
5. Woloschak M, Roberts J, and Kalmon D., "Loss of heterozygosity at the retinoblastoma locus in human pituitary tumors", *Cancer* 1994 Jul; 74(2): 693-96.
6. Traboulsi E., *et al.*, "Evidence of genetic heterogeneity in autosomal recessive congenital fibrosis of the extraocular muscles". *American Journal of Ophthalmology*, 2000, May; 129(5): 658-662.
7. Handschung K, *et al.*, "Triple A syndrome is caused by mutation in AAAS, a new WD-repeat protein gene", *Hum Mol Genet*, 2001, Feb; 10(3): 283-90.
8. Kirkpatrick CJ, *et al.*, "In vitro studies on the expansion of endothelial cell monolayers on components of the basement membrane". *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1990, 58(3): 207-13.
9. McKinnon SJ, *et al.* "Baculoviral IAP repeat-containing-4 protects optic nerve axon in a rat glaucoma model", *Mol Ther*, 2002, Jun; 5(6): 780-7.
10. Serratrice J, *et al.*, "Mitochondrial diseases in adults". *Rev Med Interne*, 2001, Dec; 22 suppl 3: 356-66.
11. Bogdanici C, Miron I and Gherghel D. "Actualities in retinoblastoma's treatment", *Oftalmologia*, 2000, 50(4): 48-54.
12. Jordan T, Hanson Y and Zaletayev D. "The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia", *Nat Genet*, 1992, 1: 328-32
13. Hanson IM, Fletcher JM and Jordan T., "Mutations at the PAX6 locus are found in the heterogeneous anterior segment malformations including Peters anomaly", *Nat Genet*, 1994; 6: 168-73.
14. Dryja TP, McGee TL and Reichel E. "A point mutation of the rodopsin in one form of retinitis pigmentosa", *Nature*, 1990, 343: 364-66.
15. Kajiwara K. Berson EL and Dryja TP., "Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RD5 and ROM1 loci", *Science*, 1994; 264: 1604-1608.
16. McLaughing ME, Lin D, Berson EL and Dryja TP. "Recessive mutations in the gene encoding the beta subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa", *Nat Genet*, 1993, 4: 130-34.
17. McGee TL, *et al.*, "Defects in the rod cGMP-gated channel gene patients with retinitis pigmentosa", *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994; 35: 1716.

18. Huang SH, Huang X and Pittler SJ. "A mutation in the gene encoding the subunit of rod cGMP phosphodiesterase (PDEA) in retinitis pigmentosa", *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995, 825.
19. Reichel, MB, et al., "Gene therapy for retinal degeneration", *Ophthalmol Scand*, 1997, 29: 261-68.
20. Wallace DC, Singh G and Lott MT., "Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy", *Science*, 1988; 242: 1427-1433.
21. Makey DA, et al., "Primary pathogenic mt DNA mutations in multigeneration pedigrees hereditary optic neuropathy", *Am J Hum Genet*, 1996, 59: 481-485.
22. Campochiaro PA., "Gene therapy for retinal and choroidal diseases", *Expert Opin Biol Ther*, 2002, Jun; 2(5): 537-44.
23. Da Cruz L, Rakoczy P, Constable I., "Ocular gene therapy: the basic and current state of research", *Aust N Z J Ophthalmol*, 1997, May; 25(2): 97-104.
24. Singh VK, Trpathi P., "Gene therapy in ocular diseases", *Indian J Ophthalmol*, 2002, Sep; 50(3): 173-81.
25. Mistry A, Thrasher A, Ali R., "Gene therapy for ocular angiogenesis", *Clin Sci*, Lond, 2003, Feb; 5: 23-29.
26. Sheffield VC, Stone EM and Alward WLM., "Genetic linkage of familial open-angle glaucoma to chromosome 1q21-q31", *Nat Genet*, 1993, 4; 47-50.