



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Perfiles genéticos de respuesta en el glaucoma primario de ángulo abierto e hipertensos oculares, en relación a los principales fármacos utilizados en el tratamiento médico del glaucoma

M^a Isabel Canut Jordana

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

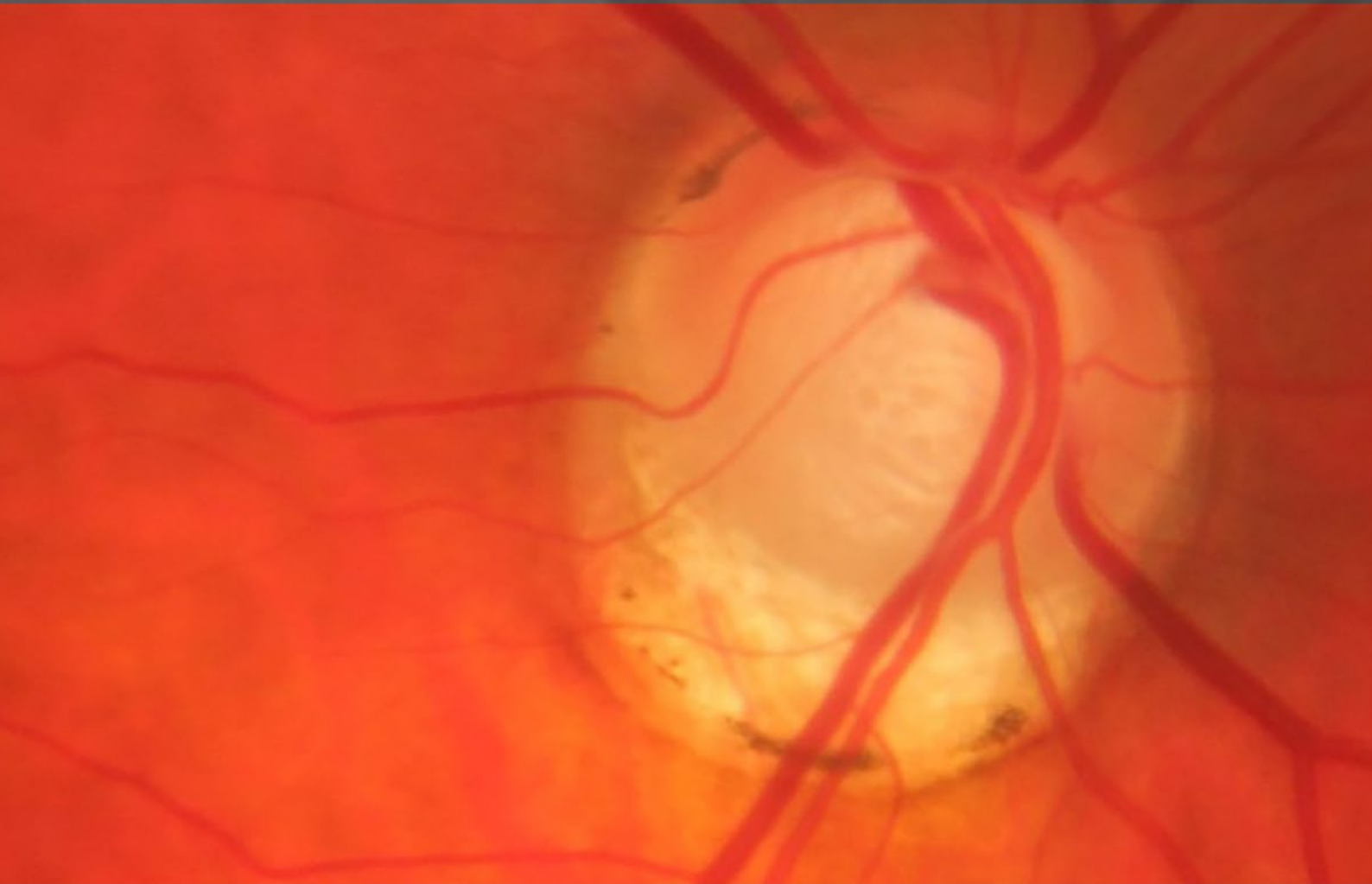
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad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

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



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Medicina
i Ciències de la Salut



**Perfiles genéticos de respuesta en el
glaucoma primario de ángulo abierto
e hipertensos oculares, en relación a
los principales fármacos utilizados en
el tratamiento médico del glaucoma**

M^a Isabel Canut Jordana

Dirección:

**Ricardo Pedro Casaroli-Marano
Jeroni Nadal Reus**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Medicina
i Ciències de la Salut

Título:

“Perfiles genéticos de respuesta en el glaucoma primario de ángulo abierto e hipertensos oculares, en relación a los principales fármacos utilizados en el tratamiento médico del glaucoma”

Autora:

M^a Isabel Canut Jordana

Dirección:

Ricardo Pedro Casaroli-Marano, Jeroni Nadal Reus

Programa:

Medicina e investigación traslacional

Línea de investigación:

Fisiopatología de las enfermedades médico-quirúrgicas: Innovación en el diagnóstico y tratamiento de la patología oftálmica

**Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-quirúrgicas
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
UNIVERSITAT DE BARCELONA
2021**

Jeroni Nadal Reus, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universitat Autònoma de Barcelona y Ricardo-Pedro Casaroli-Marano, Catedrático de Universidad del Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-quirúrgicas de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada: “PERFILES GENÉTICOS DE RESPUESTA EN EL GLAUCOMA PRIMARIO DE ÁNGULO ABIERTO E HIPERTENSOS OCULARES, EN RELACIÓN A LOS PRINCIPALES FÁRMACOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO MÉDICO DEL GLAUCOMA”, presentada por MARIA ISABEL CANUT JORDANA, ha sido realizada en el Centro de Oftalmología Barraquer y en el Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-quirúrgicas de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona bajo ambas direcciones y cumple con todos los requisitos necesarios para su tramitación y posterior defensa ante el tribunal correspondiente. La tesis doctoral es original, fruto de la investigación de la doctoranda y de forma colaborativa, habiendo sido cumplido los códigos de ética y de buenas prácticas, no conteniendo plagios, siendo que la doctoranda y los directores consienten que esta memoria sea sometida a procedimientos para comprobar su originalidad.



Mª Isabel Canut Jordana
Doctoranda



Dr. Jeroni Nadal Reus
Director



Dr. Ricardo P. Casaroli-Marano
Director

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores y maestros, que han sabido remarcar la importancia del trabajo y la constancia, para poder avanzar como persona y como profesional.

A mi querido amigo, gran referente, Profesor Ricardo Casaroli, por orientarme en todo el trabajo de investigación y memoria de la tesis, sin él no hubiese sido posible este camino.

A Jeroni Nadal, co-director de tesis, y un gran puntal personal y profesional en mi vida.

Al Profesor Joaquím Barraquer, que me enseñó las riendas de mi profesión, y el sentido de la responsabilidad ante el paciente. Al Doctor José Luis Ruiz Bulumar, por su paciencia en la enseñanza y por su gran humanidad. Al Profesor Rafael I. Barraquer y familia, por buscar siempre la excelencia en la oftalmología.

A todo el personal del Centro de Oftalmología Barraquer que he tenido el placer de poder compartir mis jornadas laborales, siempre con el mejor ambiente y, en especial, a todo el equipo de Glaucoma que me han guiado y enseñado el complejo y apasionante mundo del glaucoma, de la mano de los doctores Ignacio García Barberán y Muhsen Samaan, y recientemente de los doctores Bachar Kudsieh, Fran Ruiz Tolosa, Marta Mármol, Federico Trejos, Ramón Cobián y Andrés Fernández-Vega, compañeros de viaje inigualables.

A mi querida amiga y compañera de trabajo M^o Luisa Giménez, siempre pendiente de que todo salga a la perfección, atenta en todos los detalles diarios.

A Alex Barrios, por su extrema paciencia y enorme profesionalidad.

A Lluís Armengol y Olaya Villa, por su gran trabajo y enseñanzas en el mundo de la genética.

A mis familiares y amigos, por estar siempre a mi lado.

A todos mis compañeros de profesión de los que siempre he aprendido, y además tengo la suerte de tenerlos como amigos.

DEDICATORIAS

A mis abuelos, que nos enseñaron el camino del esfuerzo, en especial a mi abuela Lola, de la que es difícil poder describir tantos y buenos adjetivos que la caracterizaban. Me enseñó a luchar por la familia, pilar fundamental de mi vida.

A mi padre, Joaquim, guía indiscutible en mi vida, exigente y complaciente a la vez, me enseñó a esforzarme en conseguir lo mejor de mí y a no desesperarse ante la adversidad.

A mi madre, Montserrat, una trabajadora incansable, por orientarme en mi camino de forma discreta pero eficaz.

A mi hermana Montse, siempre pendiente de todos, por su cariño y conseguir que lo difícil se vuelva fácil.

A mi marido, Jeroni, por compartir un viaje de vida y profesión juntos.

A mis hijos, Bernat y Víctor, fantásticos jóvenes con grandes ilusiones que las están haciendo posible gracias a sus valores humanos y esfuerzo.

ÍNDICE

1. GLOSARIO	13
2. RESUMEN DE LA TESIS	17
3. INTRODUCCIÓN.....	21
3.1. Epidemiología del glaucoma	23
3.2. Definición y clasificación de glaucoma	24
3.2.1. Definición de glaucoma	24
3.2.2. Etiopatogenia de glaucoma.....	24
3.2.3. Clasificación de glaucoma.....	25
3.2.4. Glaucoma primario: de ángulo abierto (GPAA) <i>versus</i> por cierre angular (GPCA)	32
3.2.5. Factores de riesgo en el glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA)	33
3.2.6. Diagnóstico de glaucoma	37
1.2.6.1. Anamnesis realizada al paciente.	37
1.2.6.2. Examen ocular	37
3.3. Repercusiones funcionales del glaucoma	46
3.4. Opciones terapéuticas del glaucoma	47
3.4.1. Tratamiento médico.....	48
3.4.2. Tratamiento láser.....	59
3.4.3. Tratamiento quirúrgico.....	60
3.5. Farmacogenética y farmacogenómica en el glaucoma.....	63
4. HIPÓTESIS DE TRABAJO	67
5. OBJETIVOS	71
6. MATERIAL Y MÉTODOS	75
6.1. Aspectos éticos	77
6.2. Estructura y diseño del estudio	77
6.2.1. Criterios de inclusión	78
6.2.2. Criterios de exclusión	78
6.2.3. Grupos de estudio	79

6.3. Estudio farmacogenético	82
6.3.1. Aproximación para la identificación de variantes genéticas de número de copia	82
6.3.2. Recogida de muestras y análisis de la cohorte.....	84
6.4. Tratamiento estadístico.....	86
7. RESULTADOS	87
7.1. Respuesta al tratamiento	91
7.2. Identificación de <i>loci</i> candidatos para la respuesta terapéutica.....	93
7.2.1. Fase de aproximación	93
7.2.2. Fase de validación	95
7.2.3. Estudio de probabilidad de respuesta en relación al <i>locus</i> estudiado (<i>MLIP</i>) ...	100
7.3. Aproximación práctica de los resultados.....	101
8. DISCUSIÓN.....	103
9. CONCLUSIONES.....	113
10. BIBLIOGRAFÍA.....	115
11. ANEXOS.....	135
11.1. Artículo.....	137
11.1.1. Título, autores y referencia del artículo publicado	137
11.1.2. Resumen del artículo publicado	137
11.1.3. Artículo publicado	139
11.3. Patente	148



1. Glosario

1. GLOSARIO

A	ANR	anillo neuroretiniano
	AO	ambos ojos
B	BCVA	<i>Best Corrected Visual Acuity</i> (Mejor Agudeza Visual)
	BL	betabloqueantes tópicos (maleato de timolol)
C	C	copa
	CAA	cierre angular agudo
	CAI	cierre angular intermitente
	CAP	cierre angular primario
	CFNR	capa de fibras nerviosas de la retina
	CGH	<i>Comparative Genome Hybridization</i> (Hibridación Comparativa del Genoma)
	CNO	cabeza nervio óptico (disco óptico)
	CNV	<i>Copy Number Variation</i> (Variación del Numero de Copias)
	CV	campo visual
D	DE	desviación estándar
	DM	Diabetes Mellitus
	DO	disco óptico
	DPA	defecto pupilar aferente
E	ECC	espesor corneal central
	EGS	European Glaucoma Society
G	GAA	glaucoma de ángulo abierto
	GCA	glaucoma por cierre angular
	GCCA	glaucoma crónico por cierre angular
	GCP	glaucoma congénito primario
	GLM	<i>Generalized Linear Model</i> (Modelo Lineal Generalizado)
	GLPSX	glaucoma pseudoexfoliativo
	GP	glaucoma primario
	GPAA	glaucoma primario de ángulo abierto
	GPC	Guías de Práctica Clínica Glaucoma
	GPCA	glaucoma primario por cierre angular
	GS	glaucoma secundario
	GSAA	glaucoma secundario de ángulo abierto
	GSCA	glaucoma secundario por cierre angular
	GTN	glaucoma de tensión normal o normotensivo
	GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i> (Estudios de Asociación Ampla del Genoma)

H	HTO	Hipertensión ocular
M	MLPA	<i>Multiplex Ligation Probe Amplification</i> (Amplificación mediante Sonda .. de Unión Multiplex)
	mmHg	milímetros de mercurio
	µm	micras o micrómetros
N	nm	nanómetros
	NO	nervio óptico
	NR	no respondedores
O	OCT	<i>Optical Coherence Tomography</i> (Tomografía de Coherencia Óptica)
	OCT-SA	Tomografía de Coherencia Óptica del segmento anterior
	OD	ojo derecho
	OI	ojo izquierdo
	OMS	Organización Mundial de la Salud
P	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
	PG	análogos de las prostaglandinas tópicas (latanoprost)
	PIO	presión intraocular
	PPP	<i>Preferred Practice Patter</i> (Patrón de Práctica Preferido)
R	R	respondedores
	RoP	riesgo probable de progresión
	RPA	reflejo pupilar aferente
	RS	revisiones sistemáticas
S	SAP	sinequias anteriores periféricas
	SCAP	sospecha de cierre angular primario o ángulo ocluible
	SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de Nucleótido Simple)
	SPSX	síndrome pseudoexfoliativo
T	TLA	trabeculoplastia láser argón
	TLS	trabeculoplastia láser selectiva

Acrónimos de estudios referenciados

AGIS	<i>Advanced Glaucoma Intervention Study</i>
BESs	<i>Barbados Eye Studies Group</i>
BMES	<i>Blue Mountains Eye Study</i>
CIGTS	<i>Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study</i>
CNTGS	<i>Collaborative Normal Tension Glaucoma Study</i>
EGPS	<i>European Glaucoma Prevention Study</i>
EMGT	<i>Early Manifest Glaucoma Trial Group</i>
GLT	<i>Glaucoma Laser Trial</i>
LALES	<i>Los Angeles Latino Eye Study</i>
LoGTS	<i>Low-pressure Glaucoma Treatment Study Group</i>
OHTS	<i>Ocular Hypertension Treatment Study</i>



2. Resumen de la tesis

2. RESUMEN DE LA TESIS

Objetivos

El objetivo principal es el de definir perfiles de respuesta terapéutica para los fármacos más frecuentemente utilizados en el tratamiento médico del glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) e hipertensión ocular (HTO) como son los betabloqueantes y los análogos de las prostaglandinas tópicos, utilizando aproximaciones de farmacogenética. Como objetivos secundarios es el de analizar el porcentaje de reducción de la presión intraocular (PIO) diurna, en términos de eficacia definida, en los grupos de respondedores (R) y no respondedores (NR) para cada uno de los fármacos estudiados en los pacientes que requirieron tratamiento médico para GPAA y/o HTO, y así, poder identificar variantes de número de copias (CNV, *Copy Number Variants*) asociadas a las diferencias de respuesta farmacológica.

Material y Métodos

Se diseñó un estudio prospectivo observacional, aleatorizado con intervención en el que se incluyeron pacientes diagnosticados de GPAA o HTO, que requirieron tratamiento hipotensor, definiéndose dos grupos: grupo BL (tratados con betabloqueantes tópicos - maleato de timolol) y grupo PG (tratados con análogos de las prostaglandinas tópicos - latanoprost) para el control de la PIO. Se realizó una aproximación para la identificación de CNV, basada en *microarrays* de alta resolución y metodologías de alto rendimiento, en grupos de pacientes respondedores (R) y no respondedores (NR). En la fase de validación de los hallazgos, se utilizó la técnica del MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification), con la que se analizaron una cohorte extendida de pacientes R y NR para cada uno de los tratamientos estudiados.

Resultados

Se realizó una preselección de 353 individuos, se aleatorizó una cohorte de 165 pacientes, de los que 14 tuvieron que ser excluidos por diferentes motivos. De los 151 individuos restantes, se asignó 70 en el grupo BL, y 81 en el grupo PG. A las 6 semanas (± 3 días) después de la instauración del tratamiento, se valoró de nuevo la PIO y, según el porcentaje de respuesta hipotensora constatada, se etiquetaron en respondedores (R) o no respondedores (NR). Con el retratamiento cruzado, se logró que 26 individuos NRBL (no respondedores a los betabloqueantes), se incluyeran en el grupo PG recibiendo este fármaco (latanoprost) y, de la misma forma 35 NRPG (no respondedores a prostaglandinas) pasaron al grupo BL recibiendo el fármaco correspondiente (maleato de timolol). En el grupo BL, 44 (62,8 %) respondieron y 26 (37,2 %) no respondieron, mientras que en el grupo PG, 46 (56,7 %) respondieron y 35 (43,3 %) no respondieron. En el grupo BL, el promedio de la PIO basal

fue de $24,3 \pm 2,9$ mmHg que disminuyó a $19,0 \pm 3,1$ mmHg tras el tratamiento. En el grupo PG, el promedio de la PIO basal fue de $24,4 \pm 2,2$ mmHg, y disminuyó a $18,9 \pm 3,3$ mmHg después de recibir tratamiento.

El análisis farmacogenético, nos permitió identificar 7 regiones genómicas candidatas - *13q21*, *GSTT1*, *LCE1D*, *PHACTR1*, *MLIP*, *1p31* y *2q22* - que mostraron diferencias en el CNV al compararse los grupos de R y NR. En relación al grupo BL se constató que cuanto mayor sea el número de copias de la variante *MLIP*, menor es la capacidad para disminuir la PIO (OR = 0.40, p = 0.0057). Y, en relación al grupo PG, la distribución de alelos de *MLIP* también fue significativamente diferente entre los R y los NR para la respuesta al tratamiento con latanoprost (prueba exacta de Fisher, p = 0.03814) de forma que la presencia de copias de *MLIP* confiere una disminución significativamente mayor de la PIO (OR = 2.34, p = 0.01057).

Discusión

Nuestros resultados demuestran una relación significativa entre la respuesta al tratamiento farmacológico, con los principales principios activos utilizados en la práctica clínica – betabloqueantes y análogos de las prostaglandinas – y determinados perfiles de genotipo. Los pacientes con un mayor número de copias de *MLIP* exhibieron una mayor respuesta hipotensora al latanoprost, al mismo tiempo que presentaron una menor respuesta al maleato de timolol. Los pacientes con menor número de copias de *MLIP* exhibieron una mayor respuesta hipotensora al maleato de timolol. El estudio de la probabilidad de respuesta relacionada al CNV de *MLIP*, nos ha permitido establecer una estimación de eficacia de respuesta de hasta un 90 % en el grupo de los análogos de las prostaglandinas tópicos cuando se dispone de 2 copias de alelo (genotipo AA) y de aproximadamente un 70 % para la respuesta a los betabloqueantes tópicos, en ausencia o en presencia de una sola copia (genotipo B). Todo ello, nos permite interpretar que se puede disponer de un biomarcador farmacogenético orientativo para determinar el inicio de un tratamiento hipotensor tópico que se plantea como crónico.

Conclusiones

El CNV de *MLIP* está relacionado con la respuesta terapéutica farmacológica para los análogos de las prostaglandinas (latanoprost) y los betabloqueantes (maleato de timolol) de uso tópico, en la terapia médica del GPAA y/o HTO, y contribuye para predecir su eficacia. Este hecho, representa por un lado optimizar la respuesta terapéutica con relación al tiempo de respuesta, y por otro, mitigar los posibles efectos adversos consecuentes de su administración. El gen *MLIP* se perfila como un biomarcador farmacogenético para una aproximación de medicina personalizada.



3. Introducción

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Epidemiología del glaucoma

El glaucoma constituye la segunda causa de ceguera en el mundo, después de la catarata, y la segunda causa más frecuente entre los mayores de 40 años en países occidentales (Quigley HA and Broman AT, 2006; WHO, 2004). Disponemos de estudios que ya estimaban que para el año 2010 habría más de 60 millones de personas afectadas en el mundo, de las cuales más de 8 millones presentarían una ceguera bilateral y que, para el año 2020, se estimaba que estas cifras aumentasen a 80 millones y 11,2 millones, respectivamente (Quigley HA, 1996; Quigley HA and Broman AT, 2006). Según estas mismas fuentes, en el año 2020, ya se especulaba que Europa concentrará el 27 % del total de personas con glaucoma, llegando a afectar al 2,4 % de la población europea mayor de 40 años.

El glaucoma de ángulo abierto (GAA) es la forma clínica más habitual de esta patología en nuestro medio. Se estimó que, para el año 2010, habría casi 45 millones de personas con GAA en el mundo, siendo los países occidentales los más afectados en números absolutos con un 23,9 % (aproximadamente 11 millones) del total de afectados (Quigley HA and Broman AT, 2006). La prevalencia en EEUU en 2004 era de alrededor del 2 % (Friedman DS et al, 2004), con una estimación de 2,2 millones de pacientes afectados, pudiendo llegar a ser de 3,3 millones en 2020. Sin embargo, existen grandes diferencias en la prevalencia del glaucoma en diferentes grupos étnico-raciales (Vajaranant TS et al, 2012; Klein BE and Klein R, 2013) siendo más prevalente en la población afroamericana (Sommer A et al, 1991b; Friedman DS et al, 2004).

El glaucoma congénito primario (GCP) constituye una entidad clínica con un perfil diferente del resto de los glaucomas, ya que suele presentarse desde el momento del nacimiento hasta pasados los dos años de vida, siendo la prevalencia en raza caucásica de 1:12.000-18.000 recién nacidos. Su incidencia puede ser de 5 a 10 veces mayor si existe consanguinidad entre los padres, es más común entre los varones (65 %) y puede ser bilateral en el 70 % de los pacientes (Weinreb RN et al, 2013).

La *European Glaucoma Society* (EGS) en su edición del 2014, referenciaba que alrededor del 50 % de los casos de glaucoma en países occidentales no está diagnosticado (EGS, 2014). Es conocida también las diferencias en cuanto a la prevalencia, en diferentes grupos raciales, estimándose que del 1,1 al 3 % de sujetos de raza blanca podrían estar afectados, mientras que entre las personas de raza negra este porcentaje podría alcanzar entre el 4,2 al 8,8 % de la población (Tielsch JM et al, 1991a; Tielsch JM et al, 1991b). En Europa, según estudios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) / *World Health*

Organization (WHO), entre un 0,41 y un 1,86 % de las personas dentro del rango de edad de 40 a 65 años pueden estar afectadas, incrementándose hasta el 3 % en mayores de 75 años (WHO, 2004; Roodhooft JMJ, 2002). En España existen pocos estudios poblacionales sobre el glaucoma, y los estudios epidemiológicos consultados muestran que alrededor de un 2 % de la población mayor de 45 años presenta la enfermedad, observándose un incremento anual del 1 % a partir de los 65 años. Este incremento podría llegar a ser del 10 % si se tienen antecedentes familiares (Antón A et al, 2004).

3.2. Definición de glaucoma y clasificación de glaucoma

3.2.1. Definición de glaucoma

El *glaucoma* es una neuropatía óptica progresiva que tiene como tejido diana de afectación las células ganglionares retinianas y sus axones, que constituyen la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR), con la consiguiente pérdida en la capacidad estructural y funcional de las mismas (Quigley HA, 1986). Esta afectación puede llegar a provocar una pérdida visual, que puede ser parcial o bien total, en función del grado de lesión y/o pérdida de estas células y axones, con carácter irreversible tanto estructural como funcional una vez establecida. Además, puede evolucionar hacia una atrofia total del nervio óptico en caso de no controlarse las causas que lo provocan (WGA, 2004; EGS, 2014; PPP, 2015; PPP, 2016).

3.2.2. Etiopatogenia del glaucoma

La etiopatogenia del glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) es compleja, multifactorial y desconocida en la mayoría de casos en adultos. Están implicadas estructuras oculares como la malla trabecular y la cámara anterior ocular, provocando una obstrucción en el flujo del humor acuoso, generalmente asociado a un aumento de la presión intraocular (PIO) y consecuentemente una alteración progresiva en la CFNR y cabeza nervio óptico (CNO), pudiendo conducir a la ceguera (Weinberg RN et al, 2004).

Existen diferentes teorías etiopatogénicas para el glaucoma, todas ellas no son excluyentes, y puede que diversos factores etiopatogénicos participen en distinto grado en cada individuo, ofreciendo una variedad considerable de expresiones clínicas de la enfermedad. Clásicamente, se han descrito dos teorías: la mecánica y la vasogénica. En la teoría mecánica, el daño axonal es ocasionado por el impacto generado por la hipertensión intraocular sobre la capa de fibras ganglionares contra la lámina cribosa (Miller KM and Quigley HA, 1988), con el consecuente daño axonal. La teoría vasogénica, se sustenta en que el desarrollo del daño glaucomatoso en la CNO se debe a la isquemia producida por el desequilibrio entre la PIO y la presión sanguínea (Anderson DR, 1999), con alteraciones en la presión de perfusión, que podría ser relevante para desencadenar el daño (Grieshaber MC et al, 2007).

Más recientemente se ha estudiado como determinadas mutaciones en diferentes genes, tales como *MYOC*, *OPTN*, *WDR36*, podrían estar implicadas en la etiología de la enfermedad, pero estarían relacionadas con un número limitado de casos familiares y solo explicarían una pequeña proporción de glaucoma entre la población general. Actualmente se estudian otros factores genéticos, como los asociados a la regulación de la PIO y su interacción con otros genes relacionados con el desarrollo de la enfermedad (Van Koolwijk LM et al, 2012). Entre otros aspectos etiopatogénicos descritos, se encuentran las fluctuaciones en el riego sanguíneo ocular y el estrés oxidativo secundario al que puedan estar sometidas las células ganglionares de la retina, como es el caso del glaucoma de tensión normal o glaucoma normotensivo (GTN) (EGS, 2014; GPC, 2017).

Asimismo, existe controversia sobre la necesidad de realizar un cribado de GPAA en adultos asintomáticos, como también un amplio debate acerca de la necesidad de realizarlo en poblaciones específicas con riesgo de desarrollarlo, como en los individuos mayores de 40 años, raza negra, antecedentes familiares, miopía y diabetes mellitus (Mowatt G et al, 2008).

3.2.3. Clasificación de glaucoma

Existen diferentes formas clínicas de presentación, y suele acompañarse de un aumento sostenido de la PIO en el llamado glaucoma hiperbárico o de presión alta, siendo este, el factor de riesgo más importante conocido. Sin embargo, también existe el GTN, en el que la PIO registrada en todas las determinaciones realizadas está dentro del rango de la normalidad, cifrada entre los 10 y 21 mmHg (CNTGS, 1998; Anderson DR et al, 2003; De Moraes CG et al, 2012).

Una de las clasificaciones más actuales y de las más utilizadas es la de la EGS, expuesta en *Terminology and Guidelines for Glaucoma, 4th Edition* (EGS, 2014,2017b). Así podemos hablar de formas primarias y formas secundarias, en función de donde se origina inicialmente las causas que contribuirán al desarrollo de glaucoma. Los glaucomas primarios se presentan como una disfunción primaria ocular, mientras que los glaucomas secundarios son originados por alguna causa desencadenante conocida ya sea ocular, sistémica o bien adquirida. Además, se tiene en cuenta el factor edad de aparición, ya que las formas congénitas obedecen a una alteración intrauterina, en la que supuestamente no ha habido un funcionalismo dentro de los parámetros de normalidad desde la fase de desarrollo embrionario, por lo que constituye ya de entrada una entidad aparte, sin poder extrapolar muchos parámetros del glaucoma juvenil o del adulto, con la consiguiente implicación clínica así como posibles repercusiones terapéuticas (EGS, 2017c).

Las características del ángulo camerular, nos permiten clasificarlos en ángulo abierto (GAA), o por cierre angular (GCA), como subgrupos dentro de las formas primarias (GP) y secundarias (GS) (Figuras 1 y 2) (ver Tabla 1).

1. Formas primarias congénitas / glaucomas infantiles

1.1. Glaucoma congénito primario (GCP)

- 1.1.1. Neonatal o de aparición tras el nacimiento (0-1 mes)
- 1.1.2. Inicio infantil (de 1 a 24 meses)
- 1.1.3. Inicio tardío o diagnóstico tardío (> 2 años)
- 1.1.4. Casos espontáneos no progresivos con PIO normal, pero con signos típicos de GCP

1.2. Glaucoma de ángulo abierto infantil de inicio tardío/juvenil precoz (comienzo en mayores de 2 años hasta la pubertad)

1.3. Glaucoma infantil secundario

- 1.3.1. Glaucomas asociados a anomalías oculares no adquiridas
 - » Anomalía de Axenfeld Rieger (Síndrome si tiene asociaciones sistémicas)
 - » Anomalía de Peters (Síndrome si tiene asociaciones sistémicas)
 - » Ectropium uveal
 - » Hipoplasia congénita de iris
 - » Aniridia congénita
 - » Persistencia de vítreo primario hiperplásico
 - » Melanocitosis oculodérmica (Nevus de Ota)
 - » Distrofia polimorfa posterior
 - » Microftalmos
 - » Microcórnea
 - » Ectopia lentis
- 1.3.2. Glaucoma asociado con enfermedades o síndromes sistémicos no adquiridos
 - » Cromosomopatías
 - » Conectivopatías
 - » Enfermedades metabólicas
 - » Facomatosis
- 1.3.3. Glaucoma asociado con enfermedades adquiridas
 - » Uveítis
 - » Traumatismo (hifema, recesión angular, ectopia lentis)
 - » Cortisónico
 - » Tumores (benigno/maligno, ocular/orbitario)
 - » Retinopatía de la prematuridad
- 1.3.4. Glaucoma secundario a cirugía de catarata en la infancia

2. Glaucomas primarios de ángulo abierto (GPAA)

2.1. Glaucoma primario de ángulo abierto

- » De presión alta
- » De presión normal o normotensivo (GTN)

2.2. Glaucoma juvenil primario

2.3. Sospecha de glaucoma primario de ángulo abierto

2.4. Hipertensión ocular (HTO)

3. Glaucomas secundarios (GS)

3.1. Glaucomas secundarios de ángulo abierto (GSAA)

3.1.1. Glaucomas secundarios de ángulo abierto causados por enfermedades oculares

3.1.1.1. Glaucoma exfoliativo (pseudoexfoliativo) (GLPSX)

3.1.1.2. Glaucoma pigmentario

3.1.1.3. Glaucomas inducidos por el cristalino

» Glaucoma facolítico

» Secundario a lesión traumática del cristalino con liberación de partículas

» Glaucoma facoanafiláctico

» Oftalmía simpática

3.1.1.4. Glaucoma asociado a hemorragia intraocular

3.1.1.5. Glaucoma uveítico

3.1.1.6. Glaucoma neovascular

3.1.1.7. Glaucoma secundario a tumores intraoculares

3.1.1.8. Glaucoma asociado a desprendimiento de retina

3.1.2. Glaucoma de ángulo abierto debido a trauma ocular

3.2. Glaucomas secundarios de ángulo abierto iatrogénicos

3.2.1. Glaucoma debido a tratamiento esteroideo

3.2.2. Glaucoma secundario de ángulo abierto debido a láser y cirugía oculares

3.3. Glaucoma secundario de ángulo abierto causado por enfermedad extra-bulbar

3.3.1. Glaucoma causado por aumento de la presión venosa episcleral

4. Cierre angular primario (CAP). Glaucoma por cierre angular (GCA)

4.1. Cierre angular primario

» Sospecha de cierre angular primario (SCAP) o ángulo ocluable

» Cierre angular agudo (CAA)

» Cierre angular intermitente (CAI)

» Secuelas o status post-cierre angular agudo

4.2. Glaucoma primario por cierre angular (GPCA)

4.3. Glaucoma crónico por cierre angular (GCCA)

5. Cierre angular secundario

5.1. Cierre angular secundario por bloqueo pupilar

5.2. Cierre angular secundario por mecanismo de “tracción” anterior sin bloqueo pupilar

5.2.1. Glaucoma neovascular

5.2.2. Síndrome irido-córneo-endotelial

5.2.3. Distrofia polimorfa posterior

5.2.4. Crecimiento epitelial y fibroso tras cirugía del segmento anterior o trauma penetrante

5.2.5. Membrana inflamatoria

5.2.6. Sinequias periféricas anteriores (SAP) tras trabeculoplastia láser argón (TLA)

5.2.7. Aniridia

5.3. Cierre angular secundario por mecanismo de “empuje” posterior sin bloqueo pupilar

5.3.1. Glaucoma por “misdirección” (también conocido como bloqueo cilio-cristaliniano, ciliar o glaucoma maligno)

5.3.2. Quistes de iris y cuerpo ciliar, tumores intraoculares

5.3.3. Aceite de silicona u otros fluidos o gases introducidos en la cavidad vítrea

5.3.4. Efusión uveal

5.3.5. Retinopatía de la prematuridad (estadio V)

5.3.6. Anomalías congénitas que pueden asociarse con glaucoma secundario

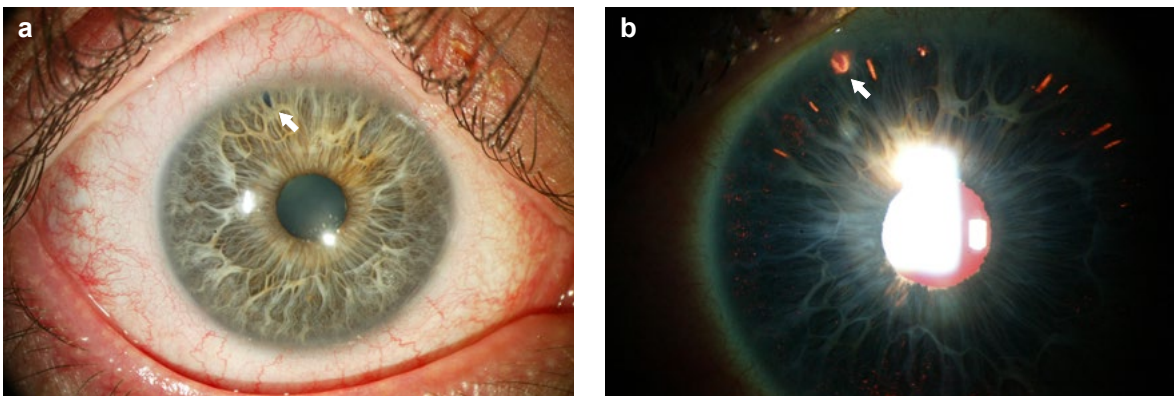


Figura 1. Glaucoma pigmentario en el que vemos una iridotomía láser realizada a las 11:30 horas (a) y (b) (flecha blanca), y dispersión de pigmento por retroiluminación (b).

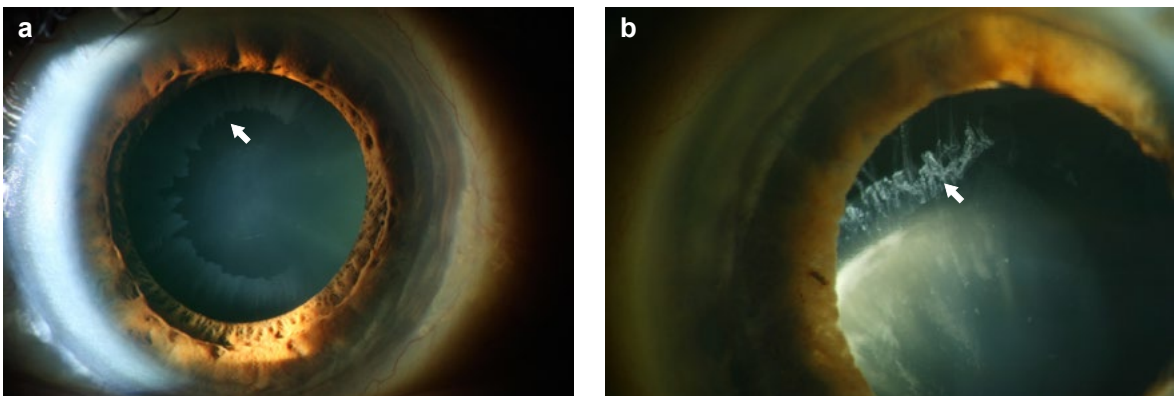


Figura 2. Glaucoma pseudoexfoliativo con material de pseudoexfoliación (flecha blanca) localizado en cristalloides anterior (a) y en la zónula (b) con subluxación zonular característica de este tipo de glaucoma.

TABLA 1. Clasificación de Glaucoma RESUMEN (EGS, 2014, 2017b)

1. Formas primarias congénitas / glaucomas infantiles

- 1.1. Glaucoma congénito primario (GCP)
- 1.2. Glaucoma de ángulo abierto infantil de inicio tardío / juvenil precoz
- 1.3. Glaucoma infantil secundario

2. Glaucomas primarios de ángulo abierto (GPAA)

- 2.1. Glaucoma primario de ángulo abierto
- 2.2. Glaucoma juvenil primario
- 2.3. Sospecha de glaucoma primario de ángulo abierto
- 2.4. Hipertensión ocular (HTO)

3. Glaucomas secundarios (GS)

- 3.1. Glaucomas secundarios de ángulo abierto (GSAA)
- 3.2. Glaucomas secundarios de ángulo abierto iatrogénicos
- 3.3. Glaucoma secundario de ángulo abierto causado por enfermedad extrabulbar

4. Cierre angular primario (CAP). Glaucoma por cierre angular (GCA)

- 4.1. Cierre angular primario (CAP)
- 4.2. Glaucoma primario por cierre angular (GPCA)
- 4.3. Glaucoma crónico por cierre angular (GCCA)

5. Cierre angular secundario. Glaucoma secundario por cierre angular (GSCA)

- 5.1. Cierre angular secundario por bloqueo pupilar
- 5.2. Cierre angular secundario por mecanismo de “tracción” anterior sin bloqueo pupilar
- 5.3. Cierre angular secundario por mecanismo de “empuje” posterior sin bloqueo pupilar

Así, la EGS, en la terminología y pautas para el tratamiento del glaucoma, refiere que la anatomía ocular, su función y nivel de PIO son factores que deben tenerse en cuenta en la identificación y clasificación de los distintos tipos de glaucoma (EGS, 2017a). Para su correcta clasificación deberíamos realizar una buena anamnesis, para conocer el momento de aparición del mismo y de posibles factores desencadenantes y, a su vez, realizar un exhaustivo estudio basándose en cuatro puntos clínicos fundamentales como son:

- a. La descripción del ángulo camerular valorándolo mediante gonioscopia (Figura 3). La gonioscopia consiste en el examen clínico y el estudio descriptivo de la profundidad del ángulo camerular en grados, con la ayuda de una lente gonioscópica que permite localizar diferentes estructuras anatómicas angulares que serán la base para la clasificación de la profundidad camerular (Figura 4). Esta se orienta en base a las clasificaciones de Scheie (Scheie HG, 1957) o también la de Spaeth (Spaeth GL, 1971) entre las más frecuentemente referenciadas y utilizadas. Actualmente también disponemos de técnicas de imagen como la tomografía de segmento anterior (OCT-SA) (Figura 5) que pueden objetivar la amplitud del ángulo camerular (Kale-Landoy M et al, 2007) e incluso, permite comparar los métodos gonioscópicos con los tomográficos (Sakata LM et al, 2008) y los tomográficos con la biomicroscopia ultrasónica (Dada T et al, 2007).
- b. El examen biomicroscópico con lámpara de hendidura, en base al método de Van Herick que permite clasificar la profundidad de la cámara anterior central y periférica mediante el examen con lámpara de hendidura (Van Herick W et al, 1969).
- c. El análisis de la morfología papilar (Jonas JB et al, 1988) valorando posibles defectos estructurales en el tamaño, forma y coloración de la CNO.
- d. La valoración de posibles defectos en el campo visual (CV) (Hodapp E et al, 1993; Shan NN et al, 2006; EGS, 2014).

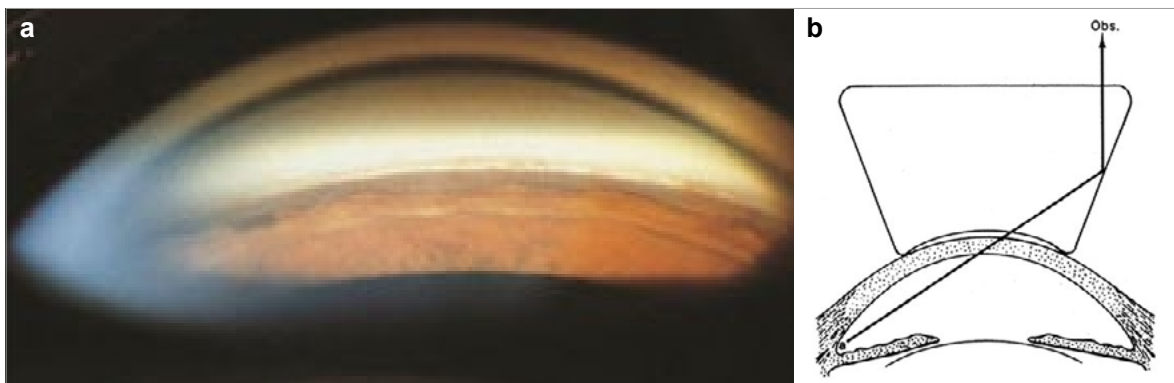


Figura 3. (a) Imagen gonioscópica del ángulo camerular. (b) Dibujo de lente gonioscópica apoyada sobre la córnea, con luz que incide a nivel angular y permite su visualización y estudio (EGS, 2014)

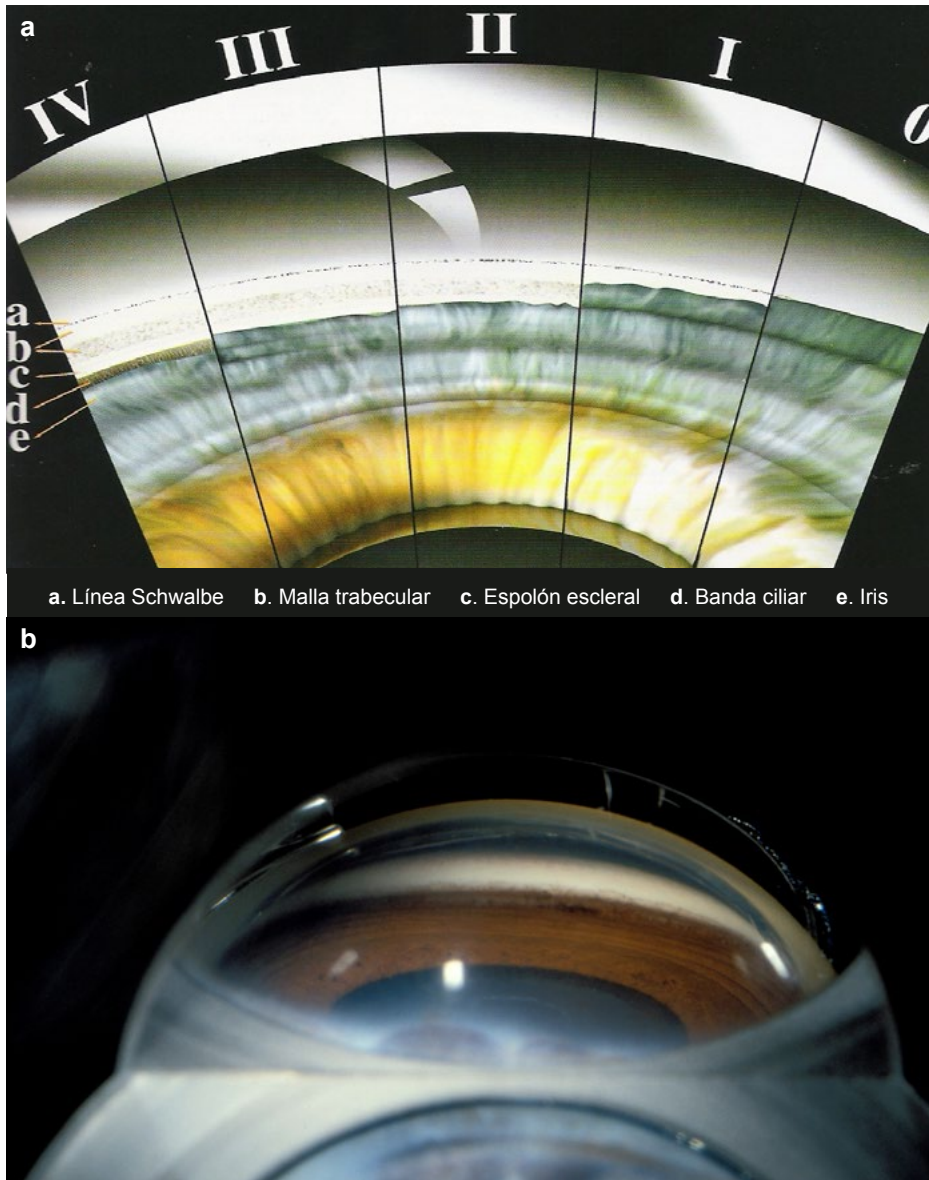


Figura 4. (a) Grados de profundidad del ángulo camerular (Teus MA, 1999). **(b)** Imagen angular con lente gonioscópica.

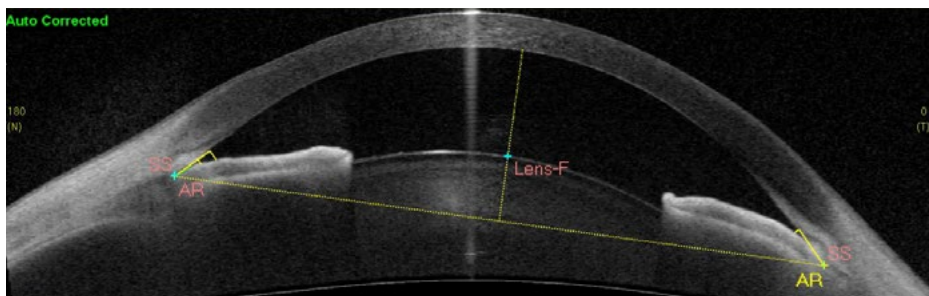


Figura 5. Imagen gonioscópica del ángulo camerular mediante estudio tomográfico de segmento anterior (OCT-SA). En este caso se constata un cierre angular.

3.2.4. Glaucoma primario: GPAA versus GPCA

El GAA es la forma clínica más habitual de esta patología en nuestro medio (Quigley HA and Broman AT, 2006). Se han estudiado diferentes factores que aumentarían el riesgo de desarrollo del GPAA, como por ejemplo la presencia de PIO elevada (Gordon MO and Kass MA, 1999; Gordon MO et al, 2002; Landers J et al, 2002; Varma R et al, 2004; EGS, 2014), raza negra (Sommer A, 1996; EGS, 2014), antecedentes familiares de glaucoma (Nemesure B et al, 2001; Weih LM et al 2001), y la miopía, entre otros (EGS, 2014; GPC, 2017; PPP, 2016).

Dentro de los glaucomas primarios, cabe diferenciar el de ángulo abierto (GPAA) *versus* el ocasionado por un cierre angular, conocido como glaucoma primario por cierre angular (GPCA). Ambos tienen una etiopatogenia muy distinta y, una vez descrita la de ángulo abierto, podemos definir los mecanismos que actúan en el GPCA como factores etiopatogénicos diferenciales (Weinreb RN and Khaw PT, 2004).

El cierre aposicional primario (CAP) o sinequial del ángulo camerular puede conllevar un GPCA producido por múltiples mecanismos, siendo el bloqueo pupilar el elemento clave en la mayoría de los casos. Cualquier ojo con al menos 180° de contacto irido-trabecular y PIO alta o con sinequias anteriores periféricas (SAP) sin causa secundaria de las mismas, se clasifica como CAP. Y, en el supuesto de llegar a producirse una neuropatía óptica glaucomatosa, supone una evolución de CAP a GPCA (Foster PJ and Johnson GJ, 2001).

La **prevalencia** varía considerablemente entre diferentes grupos étnico-raciales, siendo más alta en poblaciones asiáticas, mientras que en la población africana y europea así como sus descendientes, suelen ser de las más bajas (Quigley HA and Broman AT, 2006). A nivel mundial se estimaba que el 0,7 % de la población mayor de 40 años tenían GPCA en 2013, lo que representa 20,2 millones de personas, siendo la mayoría asiáticos (15,5 millones) (Foster PJ and Johnson GJ, 2001; Tham YC et al, 2014). En cuanto a la población europea, en una revisión sistemática reciente se ha estimado que el 0,4 % de los mayores de 40 años presentan GPCA, siendo tres cuartas partes mujeres. La prevalencia aumenta con la edad, llegando a casi el 1 % (0,94 %) en pacientes de más de 70 años. Teniendo en cuenta el envejecimiento progresivo de la población europea, es previsible que esta prevalencia aumente hasta un 9 % en Europa en la próxima década. (Muñoz Negrete FJ et al, 2015).

El GPAA y el GPCA, constituyen los dos tipos de glaucoma con mayor prevalencia mundial, por encima del GS, con etiopatogenia distinta e incluso con factores de riesgo distintos.

Y, a su vez, resulta importante conocer cómo se comporta la PIO dentro de la población no afectada de glaucoma, pero sí de *hipertensión ocular* (HTO), definiendo este término como la detección de una PIO por encima del rango de normalidad sin constatar clínicamente ni mediante pruebas funcionales y/o estructurales, defecto reproducible en la CFNR en el estudio morfológico mediante tomografía de coherencia óptica (OCT), y/o funcional mediante el estudio del CV, que puedan ser sospechosas de glaucoma (EGS, 2004).

El presente estudio se ha centrado en GPAA y HTO, por lo que vamos a profundizar en estas dos entidades en los apartados siguientes, considerando la HTO como el factor de riesgo más importante para el desarrollo de glaucoma.

3.2.5. Factores de riesgo en el GPAA

Los **factores de riesgo** para desarrollar GPAA, se definen en base a los criterios de la medicina basada en la evidencia, como podemos constatar en la mayoría de las Guías de Práctica Clínica (GPC) del glaucoma entre las que destacan como mayormente referenciadas: Guyatt GH et al, 2008; EGS, 2014; PPP, 2015. Los estudios que aportaron más datos dentro del GPAA han sido cinco revisiones sistemáticas (RS): Edwards 2008 (Edwards R et al, 2008), Li 2010 (Li M et al, 2010), Marcus 2011 (Marcus MW et al, 2011), Hollands 2013 (Hollands H et al, 2013) y, un estudio de casos y controles, Topouzis 2011 (Topouzis F et al, 2011) que han evaluado los factores de riesgo para GPAA en la población general.

Estos factores pueden ser clasificados en demográficos como la edad, sexo y raza; oculares, como la PIO y miopía; y no oculares, como la diabetes, antecedente familiar de glaucoma, hábito tabáquico, migraña y alteraciones cardiovasculares, con diferentes calidades de evidencia clínica.

De todos los factores de riesgo expuestos, se constata una recomendación fuerte, en la PIO elevada, miopía, raza negra, antecedentes familiares de glaucoma, edad y diabetes (EGS, 2014; PPP, 2015; GPC, 2017).

- **PIO elevada:** el nivel de la PIO constituye el principal factor de riesgo conocido para el desarrollo de glaucoma y para la progresión del mismo (EGS, 2014). Se estima que el riesgo de tener glaucoma con $PIO \geq 26$ mmHg, puede ser hasta 12 veces mayor que en los individuos con PIO normal (Burr JM et al, 2007). Hay evidencia demostrada de que la reducción de la PIO actúa como un importante factor de protección para la lesión del nervio óptico (NO) en pacientes susceptibles de padecer glaucoma. Los ensayos clínicos más relevantes son *Advanced Glaucoma Intervention Study* (AGIS) (AGIS, 2000); *Ocular Hypertension Treatment Study* (OHTS) (Kass MA et al, 2002); *Early Manifest Glaucoma Trial Group* (EMGT) (Hejl A et al, 2002); *Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study* (CIGTS) (Lichter PR et al, 2001); y *Collaborative Normal Tension Glaucoma Study* (CNTGS) (CNTGS, 1998). Es importante subrayar que, a pesar de la relación entre el nivel de PIO y GPAA, existe una gran variación interindividual en la susceptibilidad del NO al daño relacionado con la PIO (Bonomi L et al, 1998). Esto sugiere que un nivel de PIO superior a 21 mmHg no es un valor absoluto y, resalta el pobre valor predictivo de utilizar un límite de PIO específico como medida para la detección y/o diagnóstico de GPAA (Sommer A et al, 1991) y, siempre requiere de un estudio amplio en el que un cambio de la PIO vaya acompañado de alteraciones morfológicas, estructurales y funcionales de la CNO (Sommer A et al, 1991). En base a ello, se denomina HTO, la entidad clínica que registra cifras de PIO por encima del ran-

go de normalidad establecido, sin constatar cambios estructurales en la CNO y CFNR, ni defectos funcionales en el estudio del CV (Kass MA et al, 2002; Kass MA et al, 2010).

- **Edad avanzada:** constituye otro factor de riesgo importante para el diagnóstico y progresión de glaucoma. Hay estudios epidemiológicos que demuestran como la prevalencia de glaucoma aumenta de forma exponencial con la edad (Gordon MO et al, 2002; Kass MA et al, 2002; Le A et al, 2003; LALES, 2008).
- **Historia familiar de glaucoma:** constituye un factor de riesgo para el glaucoma (Le A et al, 2003; Leske MC et al, 2008). En estudios, en el que los hermanos de los pacientes diagnosticados de glaucoma fueron examinados así como un grupo control, la probabilidad de tener GPAA fueron 9.2 veces más altas para personas que tienen un familiar de primer grado (hermano o padre) con GPAA confirmado (Wolfs RC et al, 1998).
- **Raza, grupo étnico:** para el GPAA las características étnico-raciales son un factor de riesgo importante, constatándose una prevalencia de hasta tres veces mayor en individuos afroamericanos (Africa occidental y afrocaribeños) en comparación con individuos de raza blanca (Leske MC et al, 1994; Mitchell P et al, 1996; Quigley HA et al, 2001; Varma R et al, 2004) siendo la ceguera debida al glaucoma al menos seis veces más frecuente en los individuos afroamericanos (Sommer A et al, 1991a).
- **Espesor corneal central (ECC):** para comprender la implicación del grosor corneal en el diagnóstico de glaucoma, hay que introducir previamente el concepto tonometría, basada en la relación que existe entre la PIO y la fuerza necesaria para deformar la córnea de forma natural (Figuras 6 y 7). En este supuesto, estaríamos hablando de la tonometría de aplanación, ya que existen otras disponibles en la práctica clínica, pero nos centraremos únicamente en esta modalidad ya que constituye el gold estándar en la determinación de la PIO. Se estima que la PIO media en una población adulta normal mediante tonometría Goldmann de aplanación (Goldmann H and Schmidt T, 1957; Ehlers N et al, 1975; Whitacre MM et al, 1993; Shimmyo M et al, 2003), está alrededor de 15-16 mmHg con una desviación estándar (DE) de casi 3 mmHg, considerándose PIO normal, como dos DE por encima de la media, siendo el límite superior 21 mmHg (Davanger M et al, 1991; EGS, 2014). La medida del ECC sirve de ayuda para la interpretación de la lectura de la PIO, y para determinar el riesgo de desarrollar glaucoma (Shan S et al, 1999; Doughty MJ and Zaman ML, 2000; Liu J and Roberts CJ, 2005; Rahman ML et al, 2010; De Moraes CV et al, 2012). Una ECC más delgada en relación al rango de normalidad, es un factor de riesgo independiente asociado a una mayor probabilidad de desarrollar GPAA (Dueker DK et al, 2007; Brandt JD et al, 2001). En el estudio de OHTS (*Ocular Hypertension Treatment Study*) (Kass MA et al, 2002; Kass MA et al 2010) y en el *European Glaucoma Prevention Study* (EGPS) (Miglior S et al, 2005) la media de ECC en el grupo de HTO fue de 570 μm , y el riesgo de desarrollar glaucoma fue más alto en el grupo con grosor corneal inferior a 555 μm , estableciendo el rango de normalidad entre 555-588 μm .

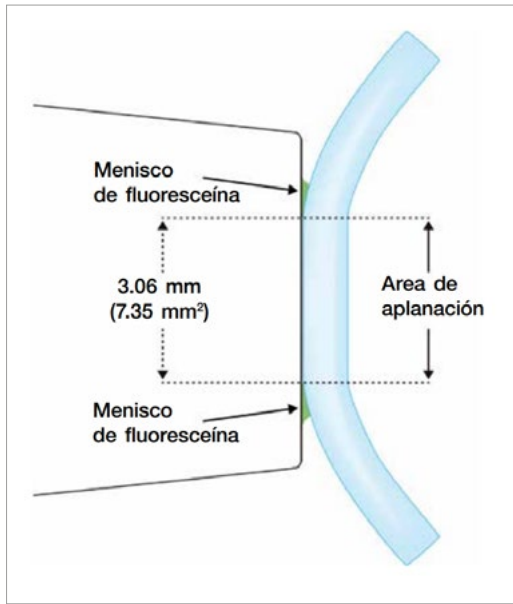


Figura 6. Técnica de tonometría de aplanación Goldmann. Cuando hay contacto entre el prisma del tonómetro (izquierda) y la córnea, el menisco lagrimal teñido con fluoresceína se observa a través del prisma (EGS, 2014).

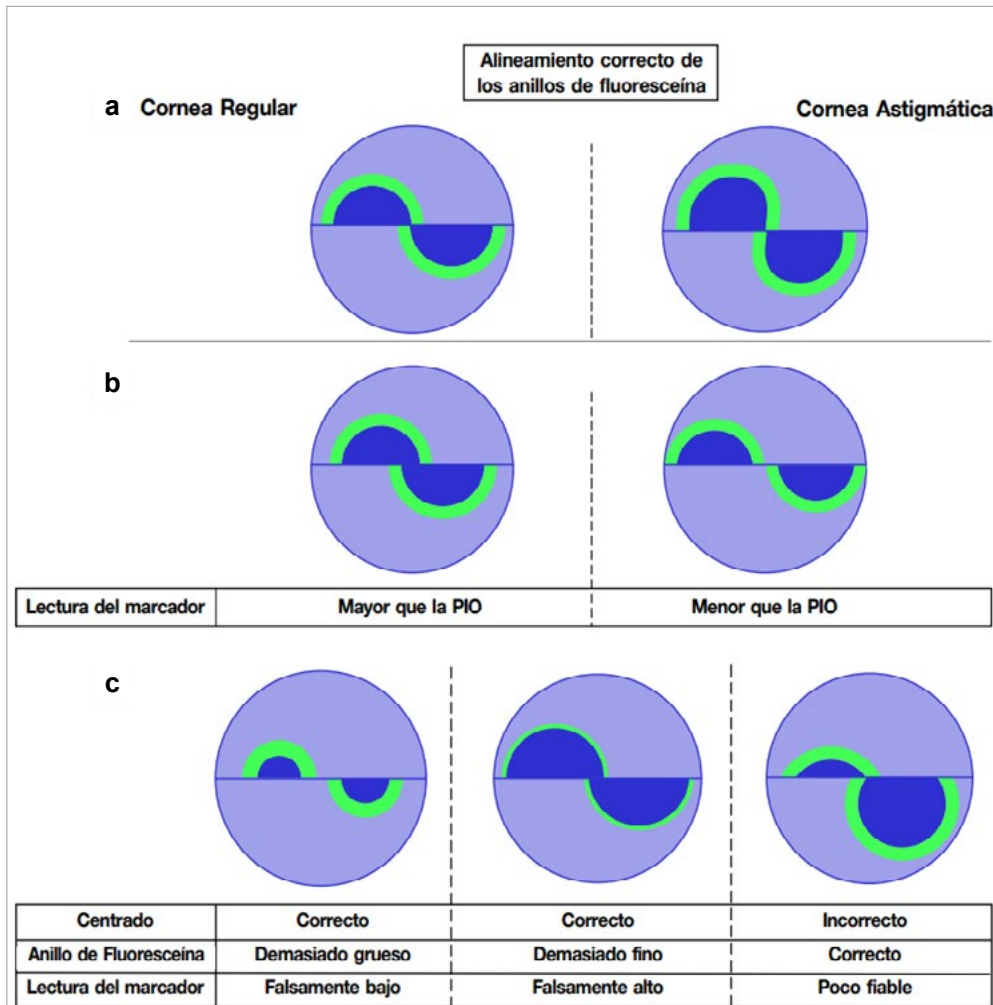


Figura 7. Técnicas de medida de la PIO. (a) correcta. (b) y (c) incorrecta (EGS, 2014).

- **Presión de perfusión ocular baja:** entendemos como presión de perfusión ocular, la diferencia entre la presión sanguínea (sistólica y diastólica) y la PIO. Se especula que un descenso en la misma puede suponer cambios en el flujo sanguíneo en la CNO y contribuir a la progresión del daño glaucomatoso. Existen estudios que evidencian una asociación entre presión diastólica de perfusión < 50 mmHg, con una alta prevalencia de GPAA (Memarzadeh F et al, 2010). Sin embargo existe una gran variabilidad en cuanto a factores interpersonales, que requieren mayores estudios poblacionales para establecer conclusiones de mayor evidencia clínica.
- **Diabetes mellitus tipo 2:** a falta de datos concluyentes de la asociación entre diabetes mellitus (DM) tipo 2 y GPAA, existen estudios poblacionales que apoyan la evidencia de que se trata de un importante factor de riesgo para el desarrollo de GPAA, relacionándolo con cambios microvasculares en la CNO, al constatar una mayor probabilidad de presentar lesión en la CFNR, en personas con DM tipo 2. Un metaanálisis sobre 47 estudios, concluye que la DM está asociada con un riesgo aumentado de glaucoma e HTO (Zhao D et al, 2015).
- **Miopía:** son muchos los estudios epidemiológicos en diferentes poblaciones con amplia distribución geográfica mundial, que sugieren que las personas miopes tienen una mayor prevalencia de GPAA que los que no lo son (Mitchell P et al, 1999; Wu SY et al, 2000). Y a su vez, estudios recientes han evidenciado una relación entre longitud axial alargada (miopía axial) y una mayor prevalencia de GAA, basándose en que va asociado a un soporte escleral más débil, aumentando la susceptibilidad de la CNO al daño glaucomatoso (Kuzin AA et al, 2010).
- **Migraña, vasoespasmo:** considerado un factor de riesgo para la lesión glaucomatosa, al disminuir la autorregulación del flujo sanguíneo en la CNO (Krupin T et, al 2005; Park HY et al, 2014).
- **Hipertensión arterial sistémica:** es una relación controvertida, aunque hay estudios que hablan de un riesgo superior al 17 % en hipertensos arteriales para desarrollar GAA, probablemente atribuible a un aumento en la presión de perfusión del cuerpo ciliar, lo que implica un aumento en la producción del humor acuoso, y por tanto de la PIO, como factor de riesgo conocido para desarrollar glaucoma (Newman-Casey PA et al, 2011).
- **Presión del flujo cerebroespinal:** hay estudios que relacionan el gradiente de presión translaminar (diferencia entre la PIO y la presión intracraneal) y glaucoma (Ren R et al, 2010). Pero se necesitan más estudios para establecerlo como un factor de riesgo para desarrollar glaucoma, más allá de tratarse a fecha de hoy, de un hallazgo en los estudios presentados.
- **Factores genéticos:** sabemos que el glaucoma puede presentarse a todas las edades, con una herencia típicamente mendeliana. Se han identificado algunos genes en las formas hereditarias de glaucoma (ej. *MYOC*, *OPTN*, *WDR36*, *TBK1*) y, se han encontrado mutaciones en la mayoría de estos genes, lo que puede suponer la apertura

de una vía para el diagnóstico precoz de la enfermedad, incluso antes de que aparezcan los síntomas y, pudiendo ser útil como asesoramiento genético. Los estudios de genética y genómica, incluyendo los de asociación de genoma completo (GWAS, *Genome-Wide Association Studies*) han acelerado el descubrimiento de genes que contribuyen a la aparición del glaucoma. Los GWAS completos para tres tipos de glaucoma de inicio en adultos, han identificado *loci* novedosos para GPAA (*ABCA1, AFAP1, GMD5, PMM2, TGFB3, FNDC3B, ARHGEF12, GAS7, FOXC1, ATXN2, TXNRD2*); GPAA (*EPDR1, CHAT, GLIS3, FERMT2, DPM2-FAM102*) y glaucoma en el síndrome de pseudoexfoliación (SPSX) (*CACNA1A*). En total, se han asociado dieciséis regiones genómicas en GAA (incluido el subgrupo de GTN), 8 con GCCA y 2 con glaucoma pseudoexfoliativo (GLPSX). Estos estudios están definiendo importantes vías biológicas y procesos que pueden contribuir a conocer mejor la patogenia de la enfermedad (Wiggs JL and Pasquale LR, 2017).

Para identificar nuevos *loci* de riesgo para GAA, se realizó un estudio GWAS en 3.071 casos de GAA y 6.750 controles, y un metaanálisis de los resultados con los datos GWAS para la PIO y los parámetros que puedan relacionarse con glaucoma. Se identificaron y validaron asociaciones en *MYOF* y *CYP26A1, LINC02052* y *CRYGS, LMX1B* y *LMO7*. Curiosamente, algunos de los nuevos *loci* de riesgo contribuyen igualmente al riesgo de otras enfermedades oculares relacionadas genéticamente, incluyendo la miopía y la degeneración macular relacionada con la edad (Gharahkhani P et al, 2018). Recientemente se han identificado mediante GWAS, 15 *loci* asociados a GPAA, incluidos 4 conocidos (*CDKN2B-AS1, ABCA1, SIX6* y *AFAP1*) y 7 nuevos *loci* (*FNDC3B, ANKRD55-MAP3K1, LMX1B, LHPP, HMGA2, MEIS2* y *LOXL1*) (Shiga Y et al, 2018).

3.2.6. Diagnóstico de glaucoma

Para el diagnóstico de glaucoma, se requiere un análisis completo que englobe diferentes puntos como serían:

1.2.6.1. Anamnesis realizada al paciente. Puede resultar fundamental para conocer antecedentes oculares y sistémicos que puedan guardar relación con la patología glaucomatosa.

1.2.6.2. Examen ocular:

- a. Examen de la función visual. Mediante optotipos que ayuden a definir y ponderar la agudeza visual de la que dispone el paciente en el momento de realizar un examen basal.
- b. Reflejo pupilar aferente (RPA). Un defecto pupilar aferente (DPA) puede ser indicativo de un daño avanzado a nivel de CNO y CFNR.
- c. Examen biomicroscópico con lámpara de hendidura:
 - » Examen del segmento anterior: detectar signos clínicos sugestivos de glaucoma.

- » Medida de la PIO (tonometría). Para medir la PIO se suele recurrir a la tonometría de aplanación Goldmann (Tielsch JM et al, 1991b) ya comentado anteriormente, y en casos especiales puede validarse mediante otros métodos de registro de la PIO. Recordar que la tonometría de aplanación debe interpretarse en relación con cambios biomecánicos corneales.
- » Gonioscopía (estudio del ángulo camerular) ya expuesto previamente
- » Examen de fondo de ojo (examen fundoscópico) mayoritariamente centrado en CNO (Figuras 8, 9, 10, 11a y 12a) y CFNR (Figuras 9 y 11a), analizando el tamaño y forma del mismo, la presencia o no de excavación en la CNO (excavación glaucomatosa es la falta de tejido nervioso en la CNO atribuible a una pérdida irreversible en la evolución de la enfermedad glaucomatosa), la disminución en el grosor de la CFNR, así como defectos localizados en forma de muescas en el anillo neuroretiniano (ANR) o bien hemorragias en la CNO (Figura 9), atrofia parapapilar, anatomía de los vasos en el área papilar, así como cambios en la coloración de la CNO (Figuras 10 y 11a), (Morgan JE et al, 2012).

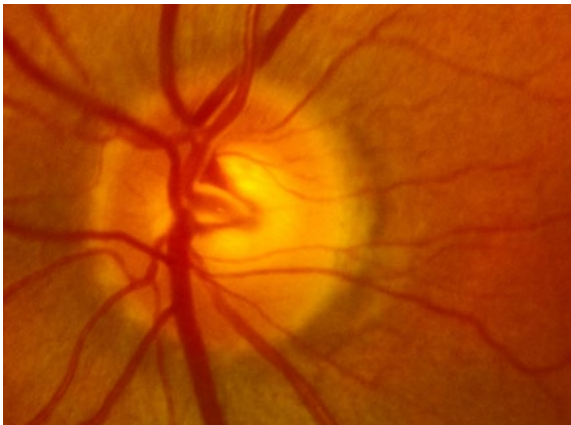


Figura 8. Imagen fotográfica fundoscópica correspondiente a un ojo izquierdo (OI) que permite realizar un exámen estereoscópico así como un análisis estructural, cualitativo y cuantitativo de la CNO.

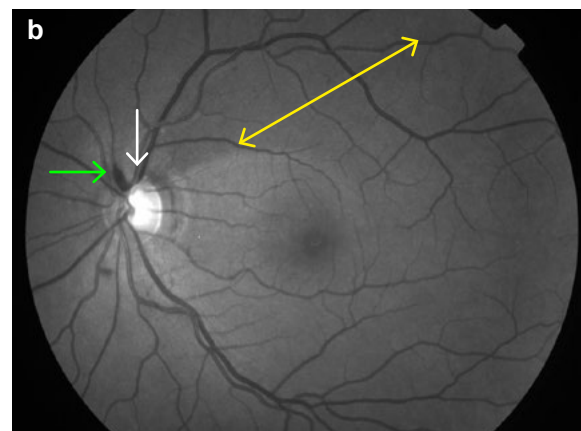
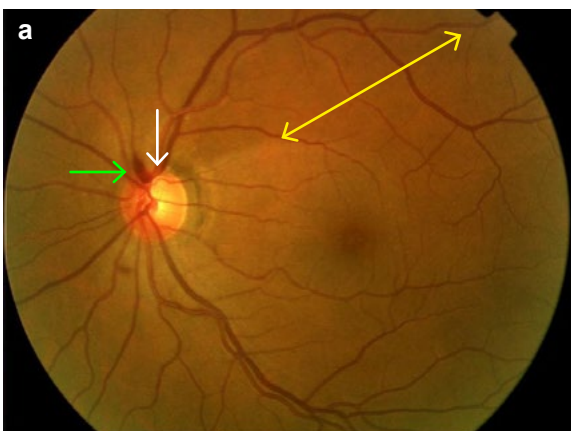


Figura 9. (a y b) Imágenes fotográficas fundoscópicas con detalle en CNO y CFNR correspondientes a un OI. Defecto en el ANR polar superior, en forma de muesca (flecha blanca), a nivel de la CNO y hemorragia (flecha verde), coincidiendo con un defecto en sector en la CFNR (línea amarilla), (b) más visible con luz anerytra.

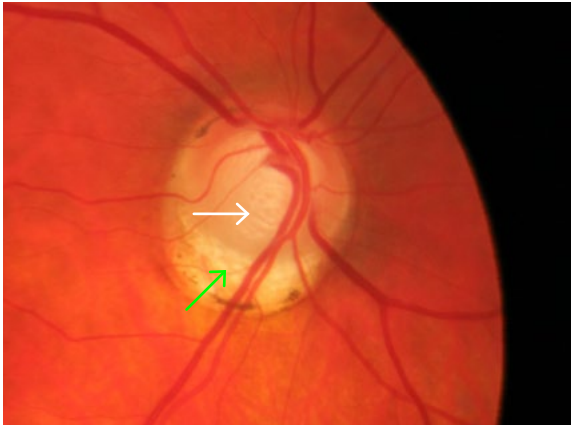


Figura 10. Imagen fotográfica fundoscópica de la CNO correspondientes a un ojo derecho (OD) en el que se aprecia un defecto en el ANR temporal inferior (flecha blanca), coincidiendo con una área de atrofia coroidea peripapilar (flecha verde).

d. Pruebas complementarias:

- » La medida del ECC mediante el estudio paquimétrico, puede ser de gran importancia para una correcta interpretación y ajuste tensional, y a su vez actúa como variable independiente en el riesgo de desarrollar glaucoma, como se ha expuesto en el apartado de factores de riesgo.
- » El examen del CV. Se trata de una prueba funcional relevante tanto en el diagnóstico de glaucoma como en su seguimiento (Weinreb RN and Greve EL, 2005). Es importante correlacionar el defecto campimétrico con la pérdida del ANR a nivel de la CNO (Figuras 11 y 12). Además, una vez establecido el diagnóstico de daño glaucomatoso en la CNO, un concepto muy importante es el de progresión, basándose en el análisis comparativo en relación a CV previos y estableciendo una tasa de progresión que varía en función del daño glaucomatoso establecido (Figuras 12b, 13, 14 y 19).

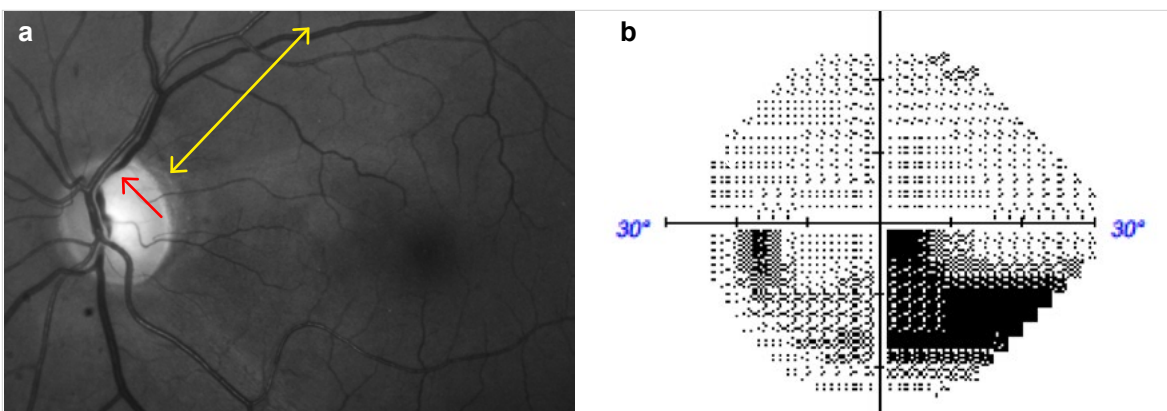


Figura 11. (a) Imagen fotográfica fundoscópica en luz aneritra, en la que se aprecia un defecto en el ANR polar superior (flecha roja), en forma de muesca, coincidiendo con un defecto en sector en la CFNR (línea amarilla), que se correlaciona con el defecto campimétrico **(b)** en forma arciforme, con afectación de los 10° centrales.

- » Registro fotográfico de la CNO y CFNR (Figuras 8, 9, 10, 11a y 12a), al que se le atribuye unos valores de sensibilidad y especificidad de daño glaucomatoso de alrededor del 90 %.
- » Para el estudio estructural de lesión glaucomatosa, recurrimos a un análisis estructural y morfológico de la CNO y CFNR, constituyendo uno de los pilares diagnósticos de glaucoma, en cuanto supone una constatación del daño glaucomatoso, en caso de evidenciarse, de forma objetiva, y en todas las fases evolutivas de la enfermedad, incluso en fases precoces cuando los otros exámenes disponibles no tienen capacidad discriminadora suficiente para detectar lesión (Weinreb RN and Greve EL, 2005). La tomografía de coherencia óptica (OCT), nos permite una adquisición de imágenes rápidas, de gran resolución y con una buena segmentación de las mismas (Figuras 15, 16, 17, 18, y 19). Un estudio basal de la CNO y CFNR, permite no solo diagnosticar una posible lesión glaucomatosa si no también la detección de posibles cambios en el seguimiento, mediante análisis de tendencia (Figuras 15, 17 y 19), (Springelkamp H et al, 2014).

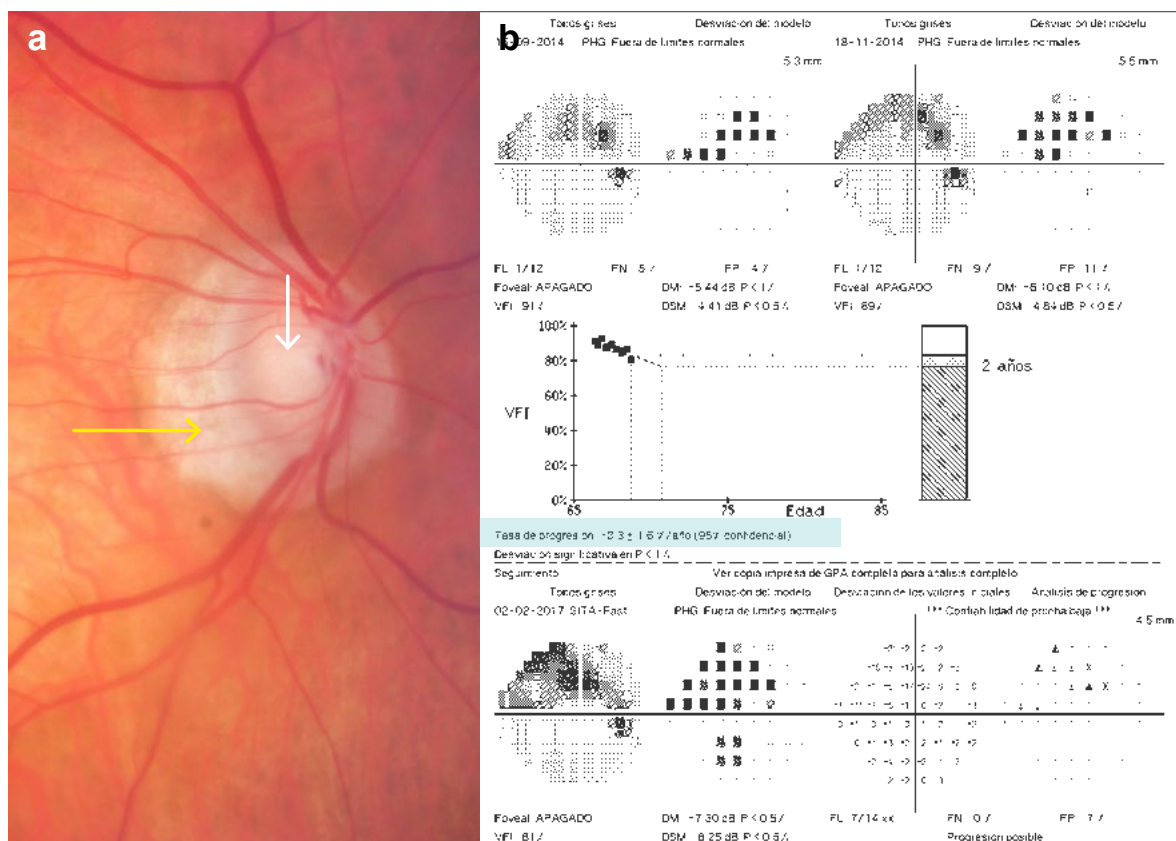


Figura 12. (a) Imagen fotográfica fundoscópica en la que se aprecia un aumento en la excavación de la CNO (flecha blanca), coincidiendo con una zona de esclerocoroidosis (flecha amarilla); **(b)** En los CV realizados en un intervalo de tiempo concreto, constatamos una tasa de progresión por encima de lo esperado (azul) en este caso: $3,3 \pm 1,6\% / \text{año}$.

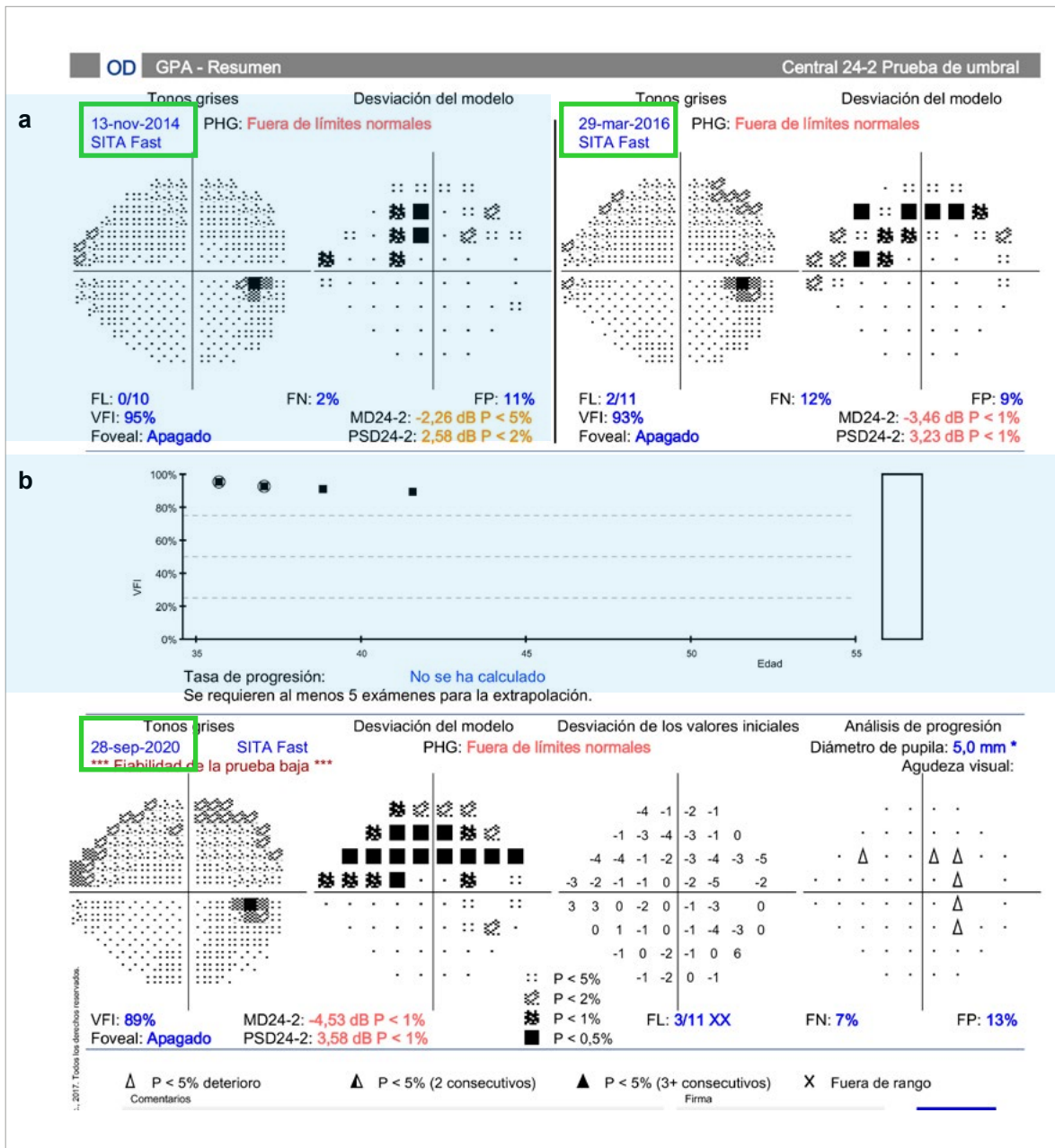


Figura 13. CV del ojo derecho (OD) de una paciente de 40 años, en el momento del diagnóstico de glaucoma (2014) (a), diagramas que remarcan la fecha de examen. CV de seguimiento (2016) y, 6 años después (2020) vemos progresión campimétrica en la curva de tendencia (b).

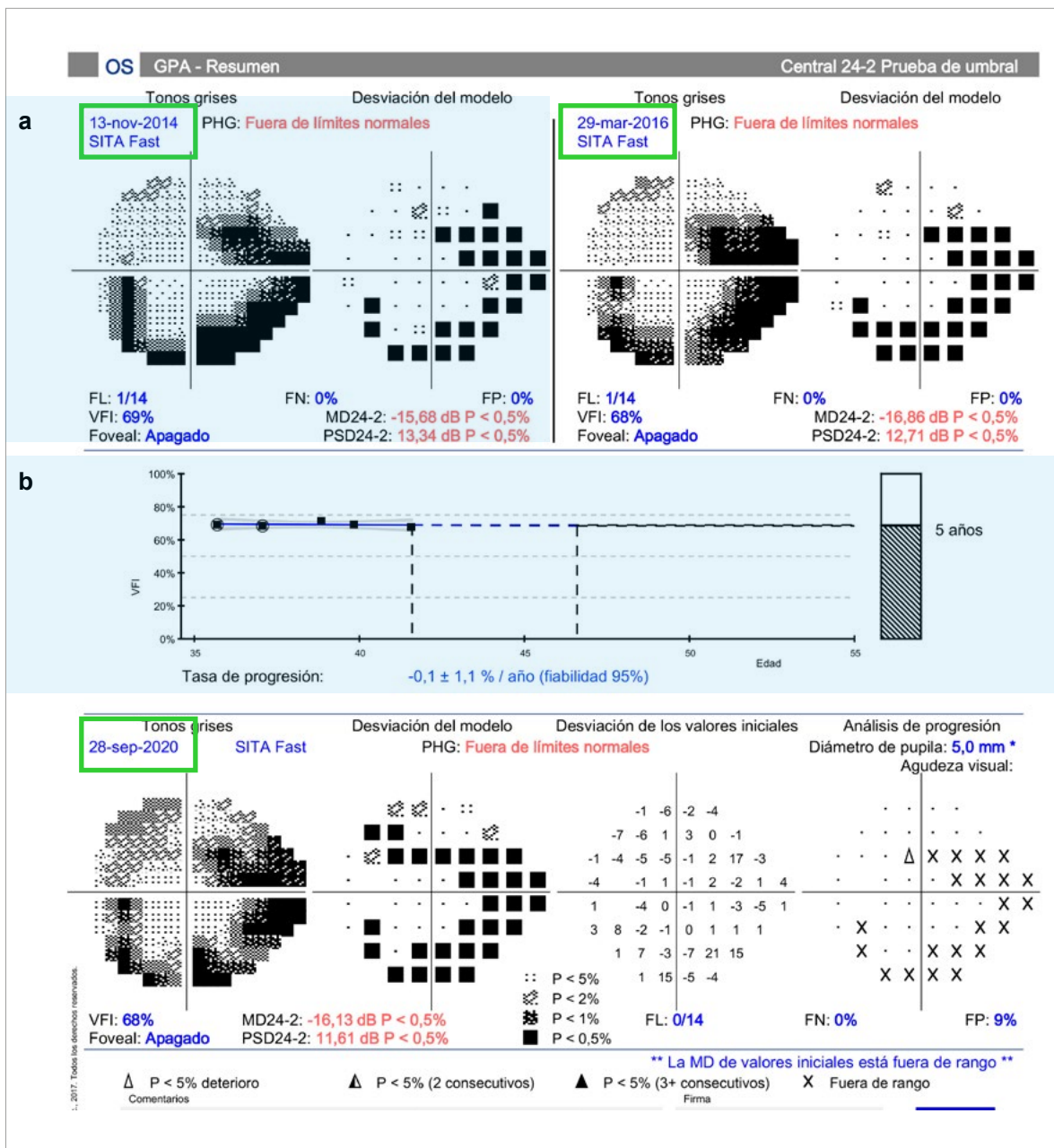


Figura 14. CV del ojo izquierdo (OI) de la misma paciente correspondiente a la figura 13, en el momento del diagnóstico de glaucoma en 2014, y en el seguimiento 6 años después (2020) no vemos progresión campimétrica en la curva de tendencia.

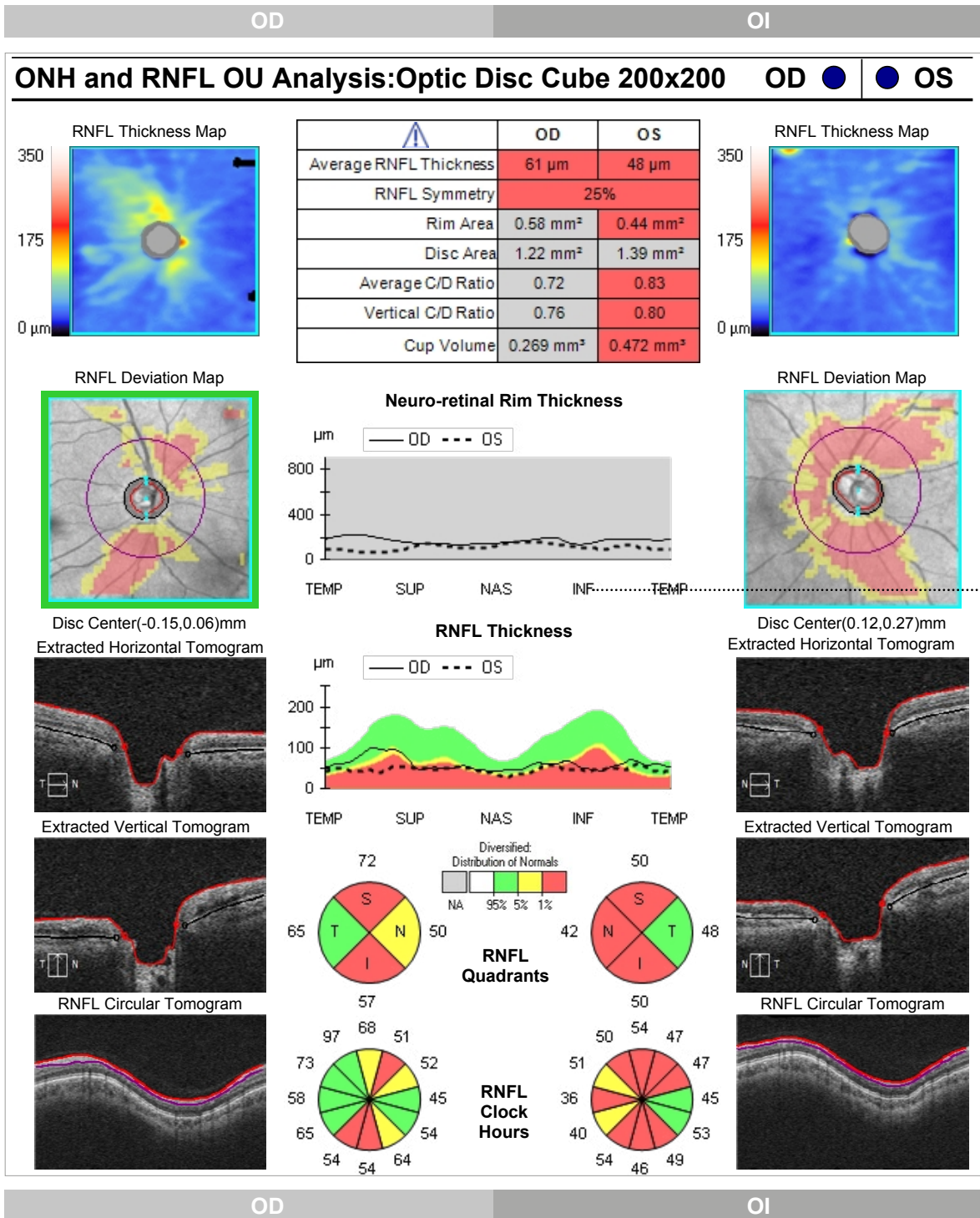


Figura 15. OCT que se corresponde con las figuras 13 y 14. El lado izquierdo de la imagen corresponde al OCT del OD, mientras que en el lado derecho encontramos el OCT del OI. 6 años después del diagnóstico de glaucoma, vemos una pérdida importante de CFNR (registrada en color rojo tanto en la tabla de datos inicial, como en el gráfico representativo), afectando 3 de los 4 cuadrantes en el OI, y 2 en el OD, con un tercer fragmento del disco de color amarillo, lo que supone una lesión incipiente a pesar de la escasa expresión campimétrica (Figura 13) en comparación con el OI (Figura 14).

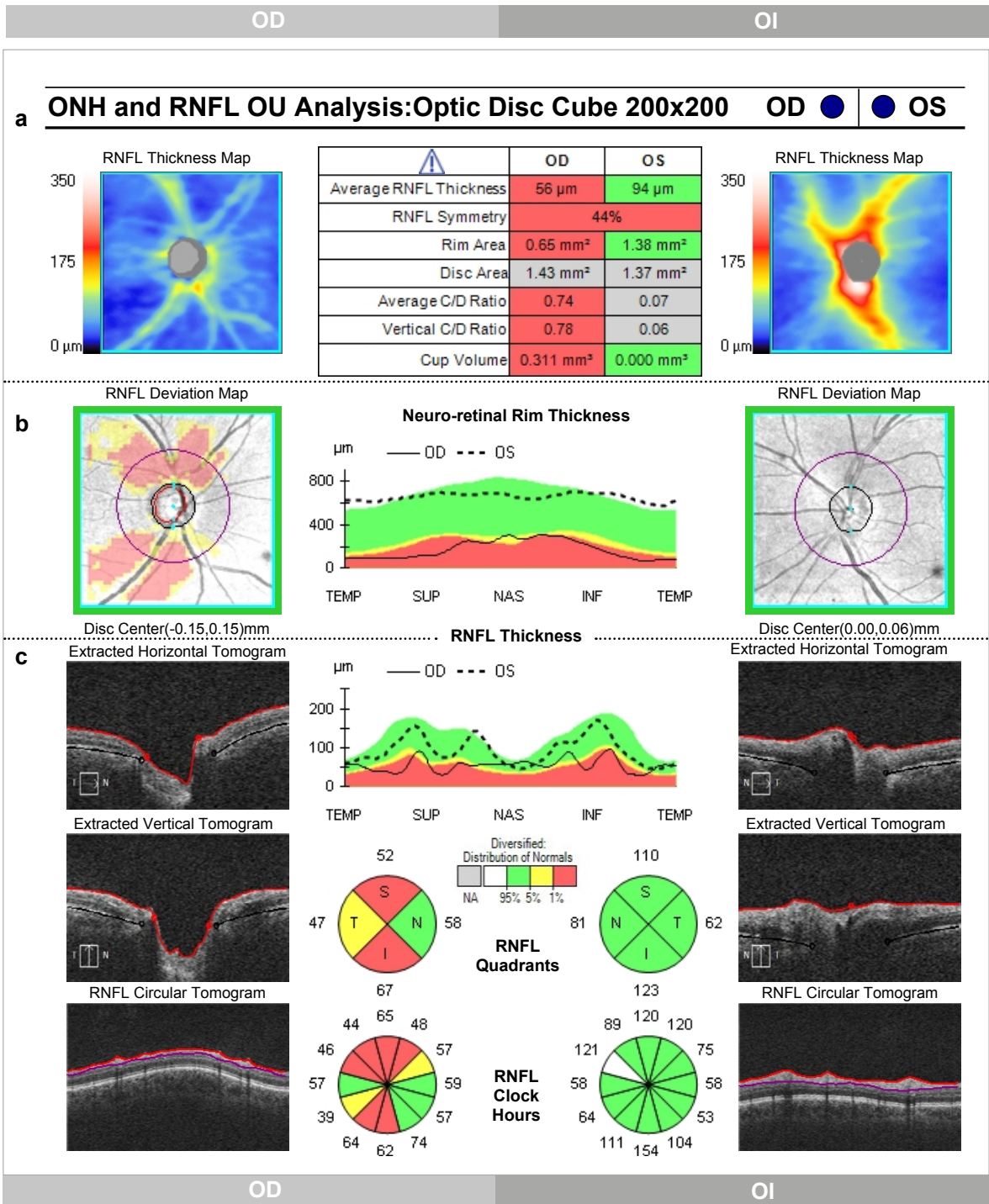


Figura 16. OCT de la CNO y CFNR, de ambos ojos (AO) de un mismo paciente. Esta sería la representación gráfica de un estudio mediante OCT del análisis estructural de la CNO y CFNR para el diagnóstico y seguimiento de glaucoma/HTO. Si realizamos una lectura en sentido vertical, la mitad izquierda corresponde al estudio del OD y la derecha la del OI. En la mitad superior (a) existe una tabla de valores tanto del OD como del OI, que corresponden al grosor de la CFNR registrado, asimetría entre AO, área del ANR, área del DO (disco óptico), relación C/D (copa/DO) y volumen copa. En la mitad central (b), está registrado el grosor del ANR de AO tanto de forma lineal como en volumen, así como en cada cuadrante. En la mitad inferior (c), están representadas la CFNR por cuadrantes, y también según distribución horaria, tanto en OD como en OI. A ambos lados y de forma descendente, consta el mapa de grosor de CFNR, y justo debajo, el mapa de desviación de CFNR. En el tercio inferior, cortes tomográficos horizontales, verticales y circulares de la CFNR.

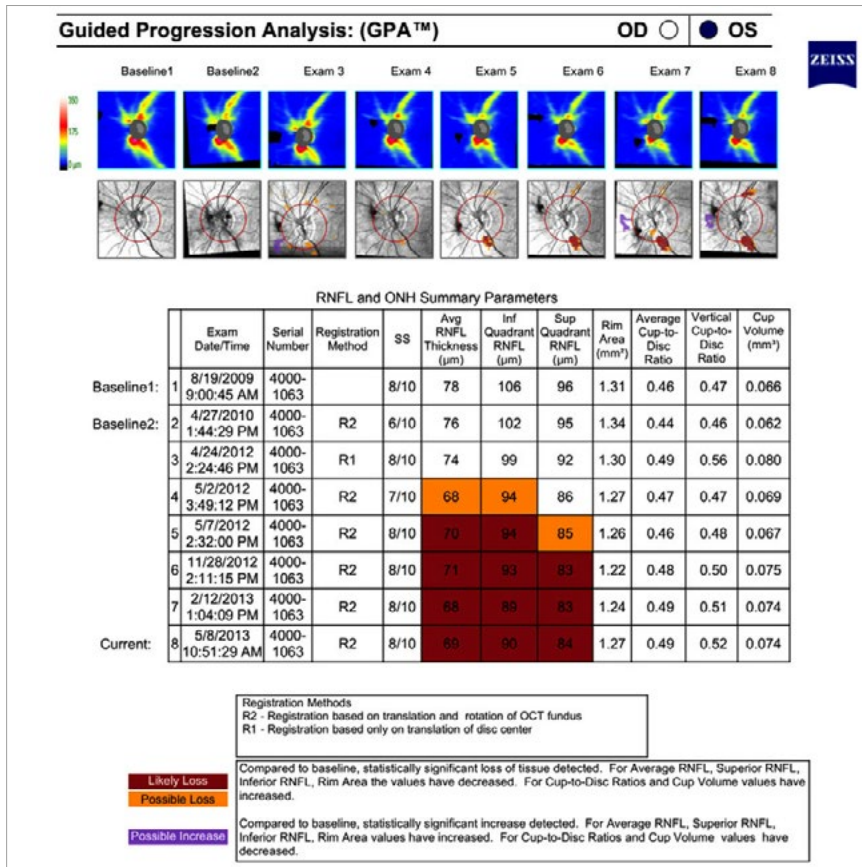


Figura 17. OCT de la CNO Y CFNR del OI. Análisis guiada de progresión (programa GPA) que permite la detección de posibles cambios en el seguimiento en el mismo ojo de un mismo paciente (en este caso OI), mediante análisis de tendencia.

» Y también cabe la posibilidad de realizar un análisis conjunto de estructura (OCT) y función (CV) de la CFNR y ANR, mediante programas comparativos (Figura 18).

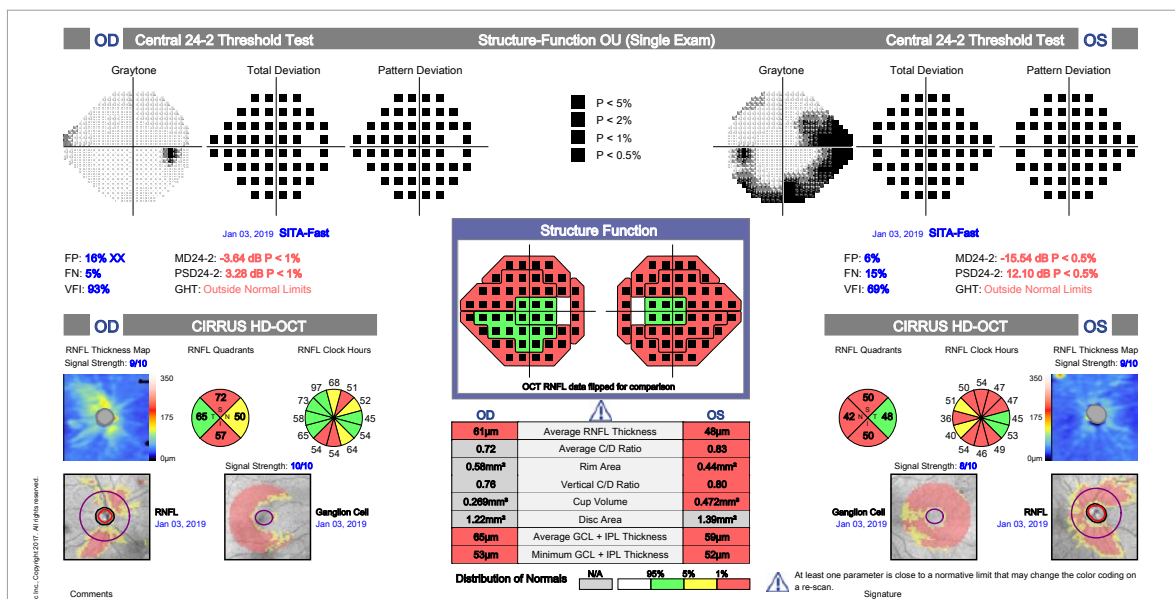


Figura 18. Examen único que relaciona pruebas complementarias de estructura/función como estudio de diagnóstico y progresión de glaucoma en un mismo paciente.

- » También es conocido que puede existir una falta de sincronización en cuanto al tiempo transcurrido entre la detección de lesión mediante OCT antes incluso que el desarrollo de defectos en el CV (KuangT el al, 2015) (Figura 19).

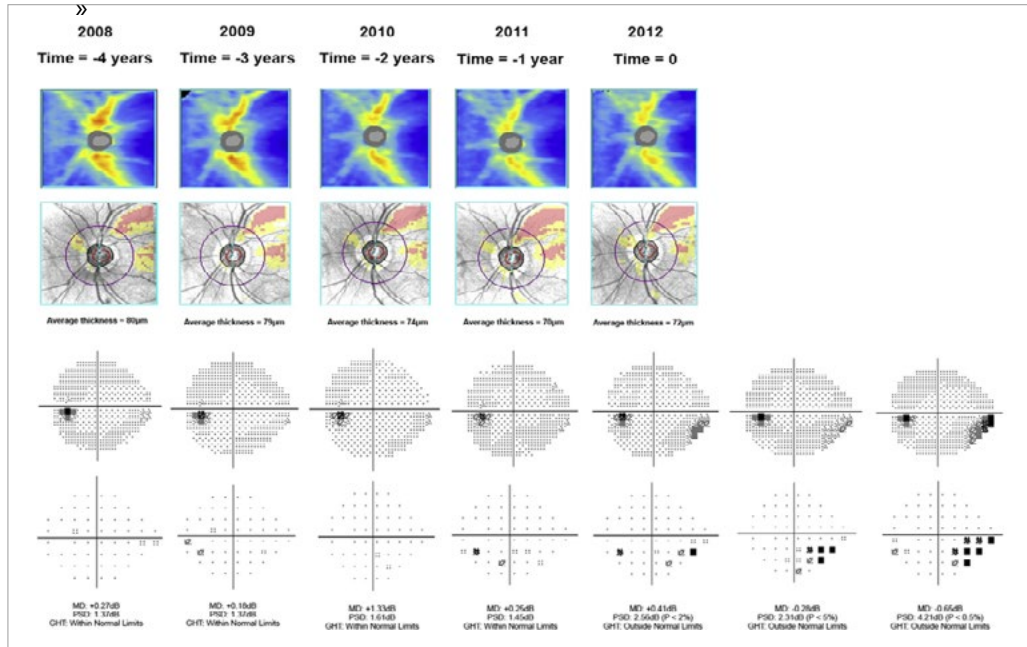


Figura 19. Estimación en el tiempo de lesiones campimétricas, con falta de sincronización respecto a las estructurales. Análisis de progresión guiada (GPA) en el estudio secuencial estructural, mediante OCT de CFNR y CNO.

- » Una vez realizado el examen completo según el esquema propuesto, deberíamos centrarnos en tres pilares diagnósticos como son la medida de la PIO, el estudio de la CNO y CFNR tanto morfológico como estructural (OCT), así como el estudio de función (mediante CV).

3.3. Repercusiones funcionales del glaucoma

El glaucoma suele ser una enfermedad asintomática, incluso en fases avanzadas de la enfermedad, lo que incrementa la morbilidad y, puede condicionar grandes cambios a nivel de la calidad de vida de los pacientes, en todos los estadios de la enfermedad, incluso en los más tempranos. Las actividades diarias como leer, pasear, conducir, pueden verse afectadas por el impacto funcional de la enfermedad, y en fases más avanzadas, la dependencia para realizar las actividades cotidianas puede llegar a ser una necesidad imperiosa por parte del paciente afecto de glaucoma. Si además, tenemos en consideración que se estima que hay más de 61 millones de personas con glaucoma en el mundo, aproximadamente 45 millones con GCA y otros 16 con GPAA (Quigley HA and Broman AT, 2006), que

la prevalencia de la enfermedad aumenta con la edad, y que hay una creciente tendencia a aumentar las expectativas de vida, se estima que en el 2020 la prevalencia global del glaucoma puede llegar a ser de 80 millones de personas y de 112 millones en 2040 (Tham YC et al, 2014). De ello se deduce que la carga que esta enfermedad comporta, tanto a nivel individual como social y económico, tiene ya una gran importancia actualmente y, va a adquirir una enorme complejidad asistencial en un futuro próximo (Varma R et al, 2011). Una vez iniciado el daño estructural en la CNO y en la CFNR, así como el daño funcional, no puede revertirse, ni a pesar de haber iniciado la terapia antiglaucomatosa necesaria para el control de la enfermedad, por lo tanto hay que considerar la lesión producida ya como irreversible. Hay estudios que apuntan el daño estructural como previo al funcional, que suele aparecer a posteriori (Harwerth RS et al, 2007).

La alteración de la función visual es el principal aspecto que influye en la calidad de vida de los pacientes. Suele iniciarse con la alteración de la visión periférica, compensada por el ojo menos afectado. Al tratarse de una enfermedad que habitualmente debuta con una presentación unilateral, asimétrica y, asintomática en la mayoría de los casos, puede suponer un retraso en el momento del diagnóstico sin que la persona afectada se dé cuenta de esta reducción en su CV, hasta que la mayoría de las fibras nerviosas están dañadas. El daño en el CV suele progresar hasta comprometer la visión central, pudiendo llegar a la pérdida total de la visión en caso de no realizar un diagnóstico y tratamiento que puedan modificar la evolución natural de la enfermedad.

Resulta fundamental establecer un *screening* poblacional centrado básicamente en la medida de la PIO, el estudio de la CNO y de la CFNR (mediante análisis clínico funduscópico y complementado con un examen tomográfico, OCT, en cuanto pueda objetivarse y poder ser comparable en visitas sucesivas) así como un examen funcional como sería el CV (Leske MC et al, 1999; Leske MC et al, 2003). La ceguera provoca cambios drásticos en el entorno personal, social y laboral de los individuos afectos. Y un dato muy relevante, es el que aproximadamente la mitad de los pacientes que padecen glaucoma permanecen aún sin diagnosticar en el mundo occidental (EGS, 2014).

3.4. Opciones terapéuticas del glaucoma

Conocedores del carácter irreversible de la lesión glaucomatosa, sabemos que el tratamiento no puede recuperar la visión perdida, pero puede prevenir el avance de la enfermedad si se instaura de forma prematura y eficaz. De ello deriva la importancia de una detección precoz y un tratamiento temprano.

El objetivo del tratamiento del glaucoma es mantener la función visual del paciente, y su calidad de vida a expensas de un coste aceptable, tanto en términos de inconvenientes como

son el exhaustivo cumplimiento terapéutico, así como los posibles efectos secundarios que puedan derivarse. Actualmente el único enfoque terapéutico que se ha demostrado eficaz para preservar la función visual es descender la PIO (Figura 20) (EGS, 2014) y reducir la tasa de deterioro sobre la CNO y, consecuentemente la reducción progresiva del CV y agudeza visual. A nivel clínico se suele determinar una PIO objetivo, entendiendo como el nivel más alto de PIO en el que se estima que la tasa de progresión es lo suficientemente baja para mantener la calidad de vida, relacionada con la visión, durante el tiempo de esperanza de vida del paciente (EGS, 2014). Suele ser un valor revisable en el transcurso del seguimiento del paciente, y a su vez de carácter unipersonal e incluso monocular.

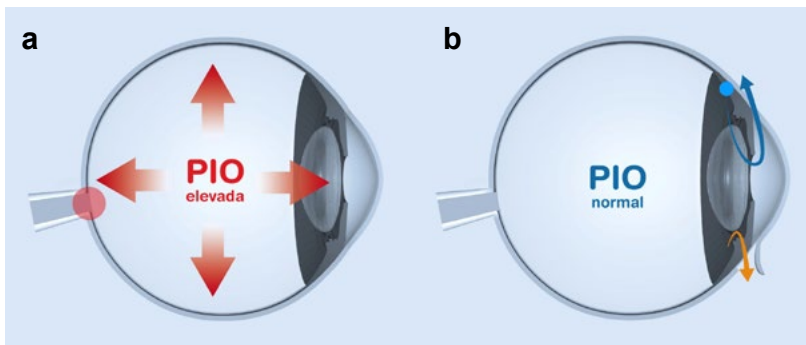


Figura 20. (a) La PIO aumentada genera daño en la CNO y CFNR. El objetivo primordial del tratamiento del glaucoma, es preservar la función visual, y el más eficaz que se conoce es, el control de la PIO, ya sea disminuyendo la producción del humor acuoso o bien aumentando el drenaje del mismo (b).

Ante la pregunta de ¿cuándo y a quien tratar?, es importante estimar el riesgo probable de progresión (RoP) para establecer la pauta terapéutica del paciente con glaucoma, tanto en determinar la PIO objetivo, como en la intensidad del tratamiento a instaurar. De ello se deduce que el tratamiento debe ser individualizado según las necesidades y el riesgo de progresión de cada paciente (Figuras 21 y 22) (EGS, 2014).

Existen tres pilares terapéuticos para el abordaje del GPAA así como de la HTO cuando se estime necesaria ser tratada para evitar la conversión a glaucoma y son, el tratamiento médico, láser y quirúrgico (WGA, 2004; EGS, 2014; PPP, 2016; Conlon R et al, 2017).

3.4.1. Tratamiento médico

El tratamiento médico o farmacológico suele ser el primer eslabón en el tratamiento del glaucoma, ya sea con uno o más principios activos, aunque se recomienda empezar con monoterapia, para valorar la eficacia de cada fármaco administrado por separado, a través de la respuesta hipotensora observada en cada individuo, teniendo en cuenta que suele tener un patrón individual de respuesta. Hablamos de eficacia farmacológica cuando la reducción de la PIO obtenida con la terapia iniciada, es similar al rango medio de eficacia hipotensora demostrado para este fármaco en una población similar (EGS, 2014).

Es conocida la respuesta esperada para cada principio activo en la población adulta (Tabla 2) y, solo cuando se consigue un descenso tensional dentro de los porcentajes esperados, podemos hablar de que el fármaco prescrito es eficaz para la persona a quien se adminis-

tra y para el momento evolutivo actual de la enfermedad. Este punto es de gran importancia no solo en el inicio del tratamiento farmacológico de la HTO o de glaucoma, sino en la necesidad de modificar pautas terapéuticas a lo largo del seguimiento. Otro aspecto que debe considerarse antes de iniciar el tratamiento médico, es conocer la PIO basal, entendida como tal aquella presión en la que no existe influencia farmacológica externa. A su vez, el efecto del tratamiento depende de la PIO basal, de tal forma que la reducción suele ser mayor porcentualmente, en los pacientes con niveles de PIO mayores antes de iniciar el tratamiento.

Para la selección de la terapia médica, además de tener claro los objetivos del tratamiento farmacológico, hay que conocer los mecanismos de acción de cada grupo farmacológico, los posibles efectos secundarios así como sus contraindicaciones (Tabla 2).

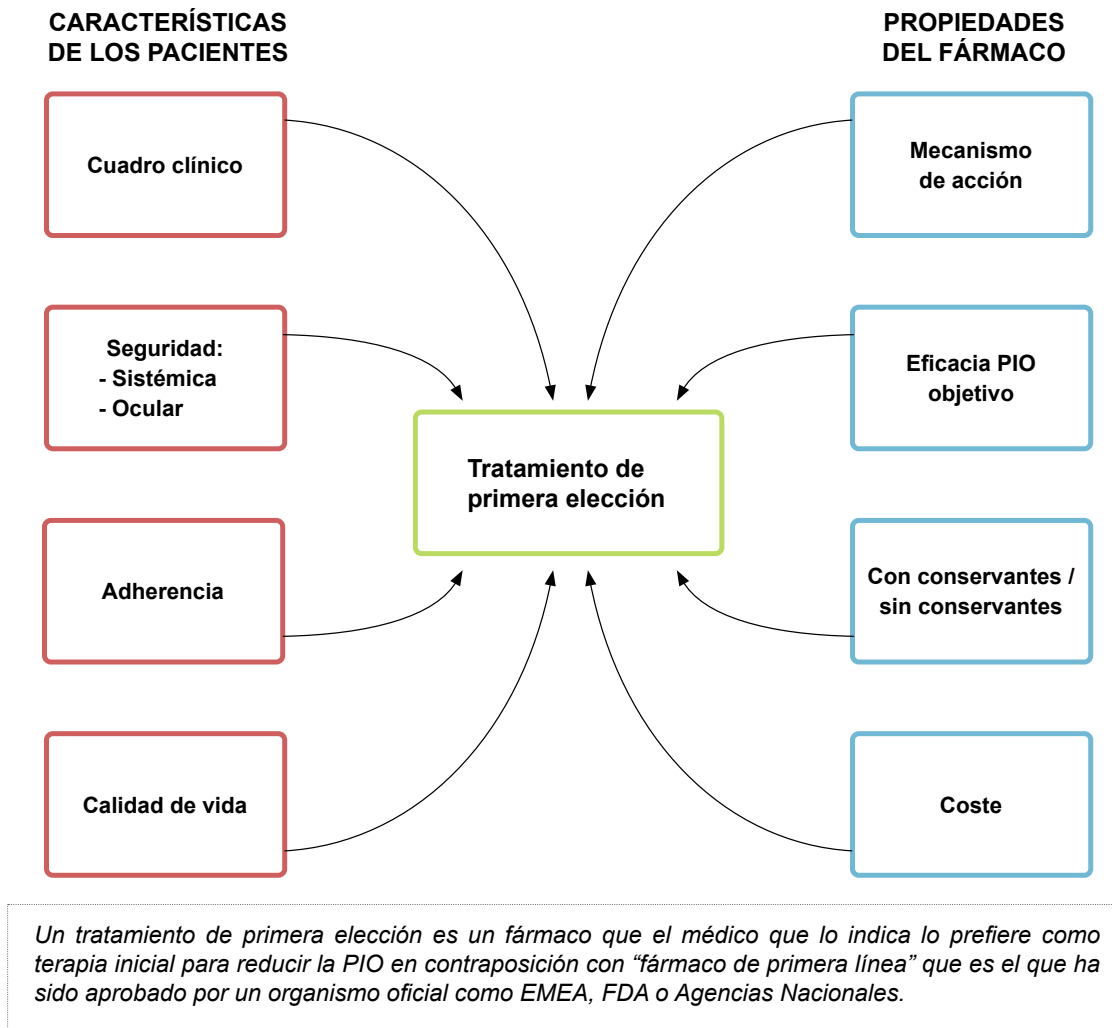


Figura 21. Principios generales del tratamiento del glaucoma (EGS, 2014).

Gráfico de a quien tratar (Figura 22). La tasa de pérdida de células ganglionares y la consiguiente disminución funcional es muy diferente entre los distintos ojos glaucomatosos. La calidad de vida está claramente disminuida cuando los defectos de campo visual son severos, con una discapacidad funcional severa. Es necesario recordar que es la extensión del campo visual binocular o el campo visual del mejor ojo el que determina la calidad de vida del paciente, mientras que la tasa de progresión de cada ojo por separado es necesaria para determinar el tratamiento.

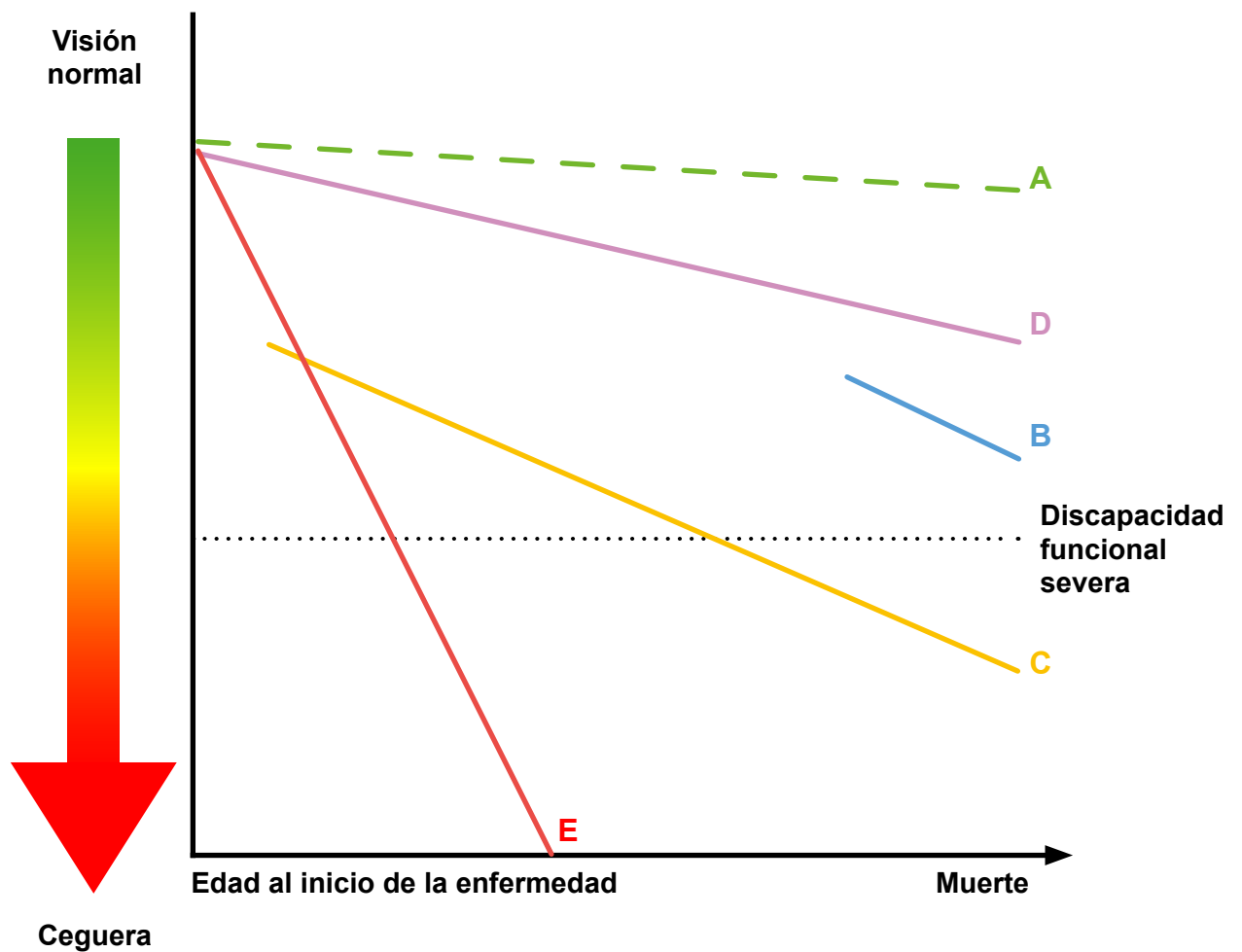


Figura 22. Principios generales del tratamiento del glaucoma. La línea A representa los efectos del envejecimiento aislado. La pérdida visual funcional por glaucoma es a menudo más rápida. Un paciente anciano, diagnosticado en una etapa avanzada de su vida, con una tasa de progresión moderada (B) tiene mucho menos riesgo de desarrollar una discapacidad funcional severa que un paciente más joven con la misma pérdida de campo visual al diagnóstico y tasa de progresión (C). Una tasa de progresión muy pequeña puede ser tolerada por el paciente y mantener el tratamiento igual (D), mientras que una tasa de progresión rápida (E) necesita una disminución mayor de la presión objetivo (EGS, 2014).

Tabla 2. Tratamiento farmacológico del glaucoma y la HTO. Principales características, eficacia, coste, frecuencia de instilación, efectos adversos locales y sistémicos de las familias de fármacos antiglaucomatosos utilizados en la terapia del glaucoma (EGS, 2003).

	Beta-bloqueantes	Agonistas adrenérgicos selectivos alfa-2 adrenérgicos (Brimonidina)	Análogos de las prostaglandinas Protamidas	IAC tópicos	Pilocarpina	Dipivefrina Epinefrina
Eficacia en la reducción de la PIO	+++ 20-25 %	++ a +++ 20-25 %	++++ (*) 25-30 %	+ a ++ 15-20 %	+++ 20-25 %	+a+++ 15-20 %
Coste	+	++	+++	++	+	+
Frecuencia de instilación	1-2 veces al día	2-3 veces al día	Una vez al día (*)	2-3 veces al día	3-4 veces al día	2-3 veces al día
Tolerancia tópica	+++	++	++ a +++	+ a +++	++ a +++	+++
Alergias tópicas	+/-	++	+/-	+/-	+/-	++
Preparaciones libres de conservantes	Sí	No	No	No	Sí	No
Hiperemia conjuntival	+/-	+ a ++	+ a ++	-	-	-
Hipertriosis	-	-	+ a +++	+/-	+/-	++ a +++
Oscurecimiento iridiano	+/-	-	++ a +++	-	-	-
Uveítis	-	-	+ a +++	-	-	-
EMC	-	-	+ a +++	-	-	-
Edema Corneal	-	-	-	+/-	-	-
Recurrencia queratitis HSV	-	-	+/-	-	-	++
Miosis, dolor frontal	-	-	-	+/-	+++	-
Efectos sistémicos						
Bradycardia/Hipotensión	+	-	-	-	-	-
Taquicardia/Hipertensión	-	-	-	-	-	+
Broncoconstricción	+++	-	-	-	++	-
Hiperlipemia	+++	-	-	-	-	-
Aumento caídas en la vejez	++	-	-	-	-	-
Apnea en infancia	-	++	-	-	-	-
Somnolencia/Fatiga	++	+++	-	-	-	-
Sequedad de la boca	+/-	+ a +++	-	-	-	-

IAC = inhibidores de la anhidrasa carbónica. EMC = Edema macular quístico. (*) Unoprostone: 2 veces al día, 20 % de reducción de PIO. Cuando no se emplean figuras, se usa la escala de 0 (mínimo) a ++++ (máximo).

Selección de la terapia médica antiglaucomatosa

Tres son los aspectos a considerar en el manejo de la terapia farmacológica: la eficacia, la tolerancia y el cumplimiento (Figura 21). Cada uno de los tres resulta imprescindible para seguir confiando en el tratamiento médico del glaucoma. Así, por ejemplo, si un fármaco es eficaz, lo hemos comprobado, pero al paciente le produce unos efectos indeseables ya sea tópicos y/o sistémicos que le incomodan en cuanto a un uso continuado, de poco nos servirá su eficacia, y, al contrario, si la tolerancia es buena, pero no constatamos una eficacia hipotensora dentro del rango esperado para cada fármaco, tampoco habremos conseguido un esquema terapéutico útil (Schwartz GF and Quigley HA, 2008). Entendemos como tolerancia, la buena respuesta individual al fármaco, ya sea a nivel tópico y/o sistémico. Cada uno de los principios activos tiene unos potenciales efectos adversos conocidos, que pueden manifestarse en grado variable de intensidad así como de gravedad, y que deben ser conocidos por el facultativo antes de prescribir el fármaco, y por el propio individuo a quien se le administra, para proceder a un diagnóstico precoz en el que caso de que aparezcan. En la (Tabla 2), se detallan los efectos adversos más importantes de cada grupo farmacológico. Pero a su vez, hay que considerar que se desconoce el potencial de efectos adversos de forma individual para cada paciente (Figura 23). El cumplimiento, es decir, la adherencia del paciente al tratamiento prescrito, resulta fundamental para un buen control de la enfermedad, y va relacionado no solo con la predisposición individual a seguir la pauta marcada, sino también con el grado de dificultad en términos de dosis, así como de los posibles efectos adversos que pueda apreciar el paciente.

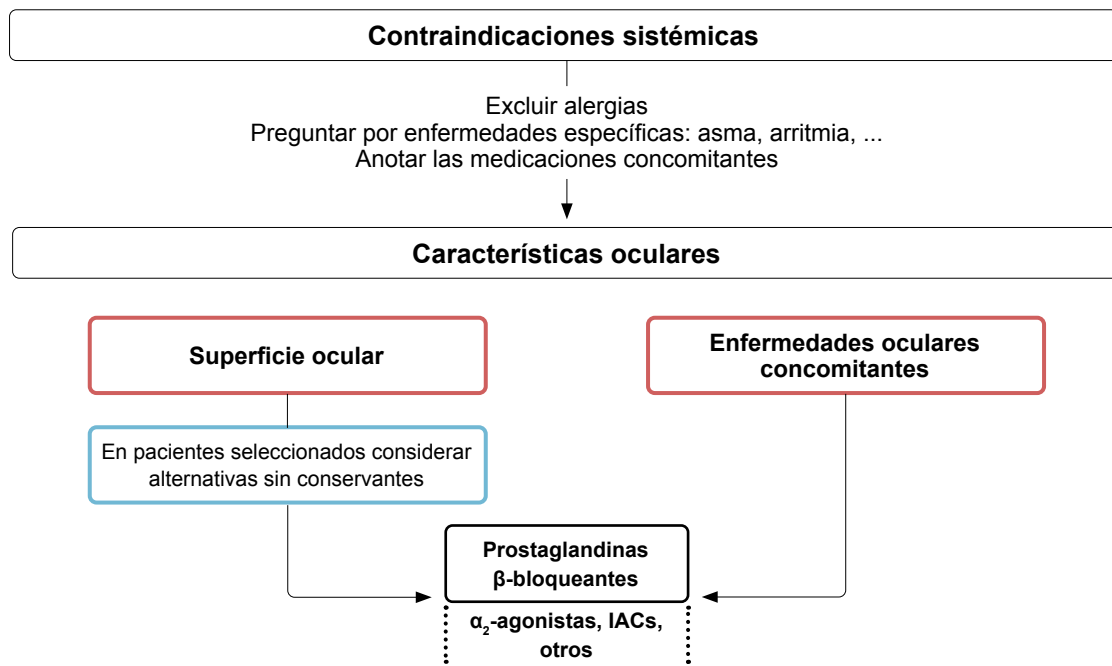


Figura 23. Principios generales del tratamiento del glaucoma (EGS, 2014).

Principales fármacos antiglaucomatosos utilizados en el tratamiento médico del glaucoma

Los fármacos antiglaucomatosos utilizados en el tratamiento médico del glaucoma, se encuentran distribuidos en los grupos siguientes: a) Análogos de las prostaglandinas y prostamidas; b) Antagonistas adrenérgicos (antagonistas de los receptores beta o betabloqueantes); c) Agonistas adrenérgicos; d) Inhibidores de la anhidrasa carbónica; e) Parasimpaticomiméticos (colinérgicos); y f) Osmóticos.

Los fármacos considerados de **primera línea** (EGS, 2014, 2017b) atendiendo al efecto hipotensor conseguido en relación al nivel porcentual de reducción de la PIO basal que determinará el grado de su eficacia, son los análogos de las prostaglandinas/prostamidas y los betabloqueantes tópicos.

- **Análogos de las prostaglandinas/prostamidas:** Latanoprost 0,005 %; Tafluprost 0,0015 %; Travoprost 0,003 % y 0,004 %; Bimatoprost 0,03 % y 0,01 %.
 - Mecanismo de acción: aumento del flujo uveoscleral.
 - Reducción de la PIO: es del 25-35 %. Empieza en torno a las 2-4 horas de la primera administración y su pico se alcanza en torno a las 8-12 horas. El máximo descenso de la PIO se alcanza a las 3-5 semanas del comienzo del tratamiento.
 - Periodo de lavado (*wash-out*): 4-6 semanas

- **Betabloqueantes (antagonistas de los receptores beta) no selectivos:** Timolol 0,1 %, 0,25 % y 0,5 %; Levobunolol 0,25 %; Metipranolol 0,1 % y 0,3 %; Carteolol 0,5 % y 2 %; Befunolol 0,5 %.
 - Mecanismo de acción: disminución de la producción del humor acuoso.
 - Reducción de la PIO: es del 20-25 %. El efecto máximo se alcanza a las 2 horas del comienzo del tratamiento.
 - Periodo de lavado (*wash-out*): 2-5 semanas

- **Betabloqueantes (antagonistas de los receptores beta) selectivos:** Betaxolol 0,5 %.
 - Mecanismo de acción: disminución de la producción del humor acuoso.
 - Reducción de la PIO: es del ± 20 %. El máximo descenso de la PIO se alcanza a las 3-5 semanas del comienzo del tratamiento.
 - Periodo de lavado (*wash-out*): 2-5 semanas

En cada grupo terapéutico existe un nivel de repuesta hipotensora esperada, siendo del 20-25 % en el grupo de los betabloqueantes tópicos (Raber S et al, 2015) y del 25-35 % en el grupo de las prostaglandinas/prostamidas (Camras CB and Hedman K, 2003; Magacho L et al, 2006; Denis P et al, 2007). En la selección de la terapia médica en el glaucoma, debe valorarse la eficacia de cada uno de los principios activos, además de la forma de administración del fármaco, la dosis necesaria, y los potenciales efectos adversos, tanto tópicos como sistémicos (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Tratamiento farmacológico del glaucoma y la HTO: Análogos de las prostaglandinas. (EGS, 2014, 2017b).

	Principio activo	Mecanismo de acción	Reducción de PIO	Contraindicaciones	Efectos secundarios
Análogos de las prostaglandinas	Latanoprost 0,005 %	Aumento flujo uveoescleral	25-25 %	Lentes de contacto (salvo que se coloquen 15 minutos después de la instilación de la gota)	<p>Locales: Hiperemia conjuntival, sensación de quemazón, picor y cuerpo extraño, hiperpigmentación cutánea periocular, atrofia grasa periorbitaria, cambios en las pestañas. Hiperpigmentación iridiana (en iris verde-marrón, gris-marrón y amarillo-marrón). Edema macular quístico (pacientes afáquicos/pseudofáquicos) con ruptura cápsula posterior del cristalino en ojos con factores de riesgo conocidos para edema macular, reactivación queratitis herpética y uveítis</p> <p>Sistémicos: Disnea, dolor torácico/angor, dolor lumbar, exacerbación del asma</p>
	Tafluprost 0,0015 %				
	Travoprost 0,003 % y 0,004 %				
Prostamida	Bimatoprost 0,03 %	Aumento flujo uveoescleral	25-25 %		
	Bimatoprost 0,01 %				

Tabla 4. Tratamiento farmacológico del glaucoma y la HTO: Antagonistas de los receptores beta. (EGS, 2014, 2017b).

	Principio activo	Mecanismo de acción	Reducción de PIO	Contraindicaciones	Efectos secundarios
No selectivos	Timolol 0,1 %, 0,25 % y 0,5 %	Disminución de la producción de humor acuoso	20-25 %	Asma, historia de EPOC, braquicardia sinusal (< 60 pulsaciones/min), bloqueo cardiaco o fallo cardiaco	<p>Locales: hiperemia conjuntival, queratopatía punteada, ojo seco, anestesia corneal, blefaroconjuntivitis alérgica</p> <p>Sistémicos: Braquicardia, arritmia, fallo cardiaco, síncope, broncoespasmo, obstrucción vía aérea, edema distal, hipotensión, hipoglucemia puede ser enmascarada en pacientes diabéticos, hipotensión arterial nocturna, depresión, disfunción sexual</p>
	Levobunolol 0,25 %				
	Carteolol 0,5 % y 2,0 %				
	Befunolol 0,5 %				
β1-selectivos	Betaxolol 0,5 %	Disminución de la producción de humor acuoso	±20 %	Asma, historia de EPOC, braquicardia sinusal (< 60 pulsaciones/min), bloqueo cardiaco o fallo cardiaco-coronario	<p>Local: escozor, quemazón más pronunciados que con los fármacos no selectivos</p> <p>Sistémicos: Efectos adversos respiratorios y cardiacos menos pronunciados que son los betabloqueantes no selectivos, depresión, disfunción sexual</p>

Fármacos de primera línea en el tratamiento médico del glaucoma. Efectos secundarios

Históricamente han sido los betabloqueantes tópicos los fármacos más prescritos desde su disponibilidad comercial en la década de los 80, en el que apareció el maleato de timolol como principio activo con efecto hipotensor demostrado en el tratamiento del glaucoma. Su uso ha sido muy amplio en cuanto a todo tipo de glaucoma e incluso en todas las franjas de edad, incluido el glaucoma congénito. El mecanismo de acción es a través de la vía convencional también conocida como vía trabecular y, se les atribuye un descenso en la producción del humor acuoso como mecanismo hipotensor. Siempre hay que descartar la no existencia previa de patología broncopulmonar y/o cardíaca como broncoespasmo, EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), hipotensión arterial, bradicardia, arritmia y fallo cardíaco por la posibilidad de agravarse bajo el efecto del betabloqueante (Cramer JA, 2002; Korte JM et al 2002). Otros efectos adversos descritos son la depresión, disfunción sexual y enmascaramiento de hipoglucemia en diabéticos insulino dependientes. A nivel local, la hiperemia conjuntival y reacción papilar (Figura 24), queratopatía punteada corneal y ojo seco (Figuras 25 y 26), anestesia corneal y blefaroconjuntivitis alérgica (Figura 26a) figuran como posibles efectos secundarios al uso continuado de betabloqueantes tópicos (Dunn FG and Frohlich ED, 1981) (Tablas 2 y 4).

Los betabloqueantes tópicos tienen asociados un potencial de efectos secundarios locales (Figuras 24, 25 y 26) bien conocidos al igual que sistémicos (alteraciones cardiorrespiratorias, hipoglucemia, hipotensión arterial, depresión y somnolencia como más relevantes) que en algunas ocasiones pueden comportar un alto grado de compromiso vital (Tabla 2 y 4). Al no conocer el potencial de respuesta en cuanto a efectos secundarios tras la instilación de colirios hipotensores, se debe hacer un seguimiento muy exhaustivo posterior al inicio del tratamiento.

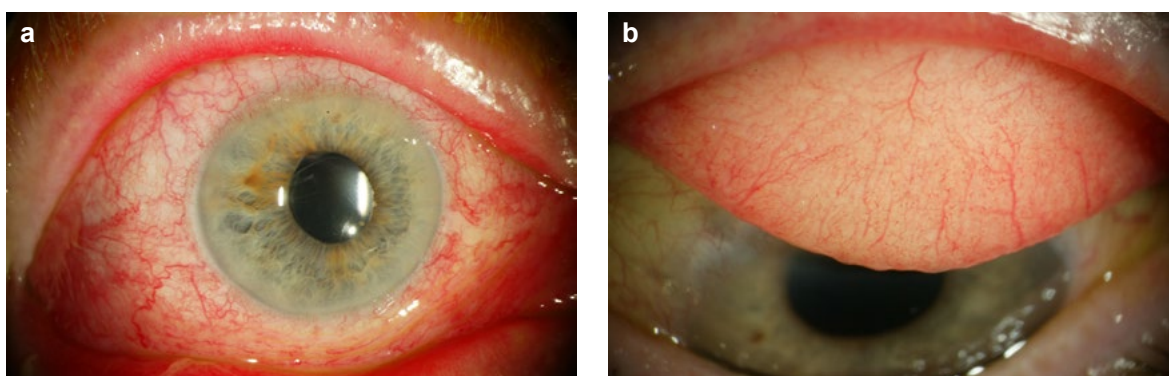


Figura 24. Efectos adversos locales secundarios a tratamientos tópicos en terapia glaucomatosa. (a) Hiperemia conjuntival; (b) Reacción papilar en conjuntiva tarsal, al evertir el párpado.

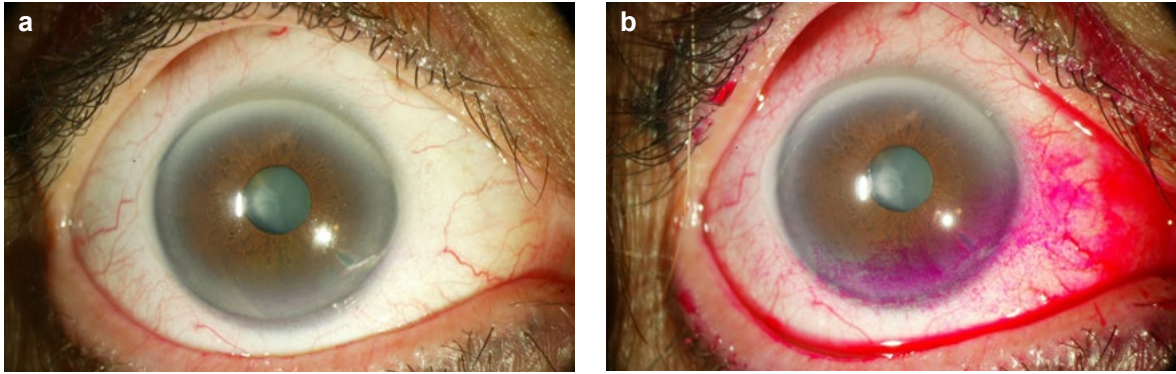


Figura 25. Efectos adversos locales secundarios a tratamientos tópicos en terapia glaucomatosa. **(a)** Ojo aparentemente sano; **(b)** defectos epiteliales evidentes bajo tinción, compatibles con ojo seco.

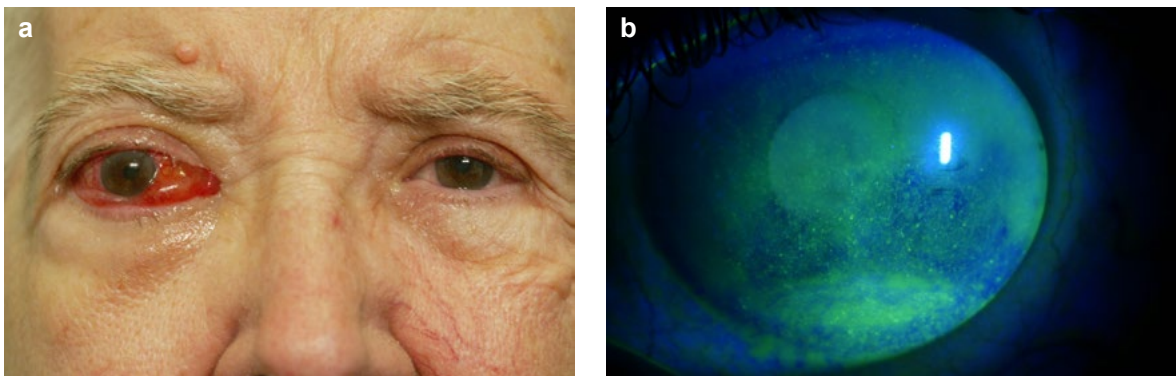


Figura 26. Efectos adversos locales secundarios a tratamientos tópicos en terapia antiglaucomatosa. **(a)** Blefaroconjuntivitis unilateral alérgica; **(b)** defectos epiteliales evidentes bajo tinción, compatibles con ojo seco.



Figura 27. Efectos adversos locales secundarios a tratamientos tópicos en terapia antiglaucomatosa. Blefaroconjuntivitis bilateral alérgica con dermatitis atópica palpebro-malar.

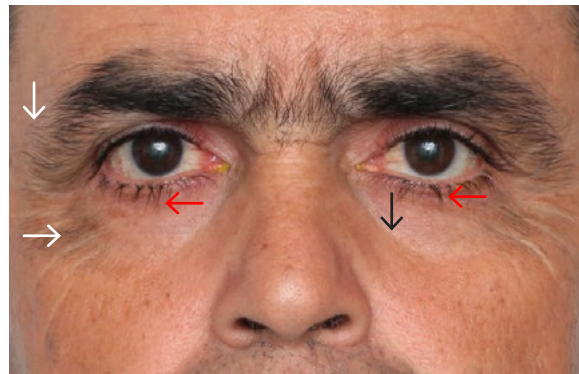


Figura 28. Efectos adversos locales secundarios a tratamientos tópicos en terapia antiglaucomatosa. Hipertricosis (flechas blancas), atrofia de la grasa periorbitaria (flecha negra), cambios en el crecimiento de las pestañas (flecha roja).

En relación a los análogos de las prostaglandinas, han demostrado una superioridad hipotensora *versus* el resto de principios activos tópicos disponibles, (EGS, 2014. 2017b) así como una dosificación más llevadera (cada 24 h *versus* las 12 h de los betabloqueantes tópicos) y, un menor potencial de efectos adversos sistémicos en relación al resto de fármacos hipotensores. Ello ha supuesto que en la actualidad ocupen la primera línea de acción terapéutica en el tratamiento del glaucoma. Su mecanismo de acción, difiere del resto de fármacos hipotensores al actuar sobre la vía uveoscleral como mecanismo de acción principal, permitiendo aumentar el flujo de salida del humor acuoso a través de esta vía no convencional.

Los efectos indeseables descritos son mayoritariamente a nivel local ocular, siendo los más frecuentes: hiperemia conjuntival (Figuras 26a, 27 y 30a), hipertriosis (Figura 28), oscurecimiento irreversible iridiano con una incidencia media del 33 %, pudiendo ser de hasta el 85 % en iris de coloración mixta (Figura 29), atrofia de la grasa periorbitaria, cambios en el crecimiento de las pestañas y uveítis (Figura 28). También se ha visto una mayor incidencia de edema macular quístico, con severos cambios estructurales en la zona de máximo potencial visual de la retina, como es la mácula, y que pueden mejorar espontáneamente al interrumpir el uso del fármaco, aunque en algunos casos se requiera tratamiento coadyuvante paliativo de la sintomatología, como antiinflamatorios tópicos (Figura 30b), (Tablas 2 y 3).

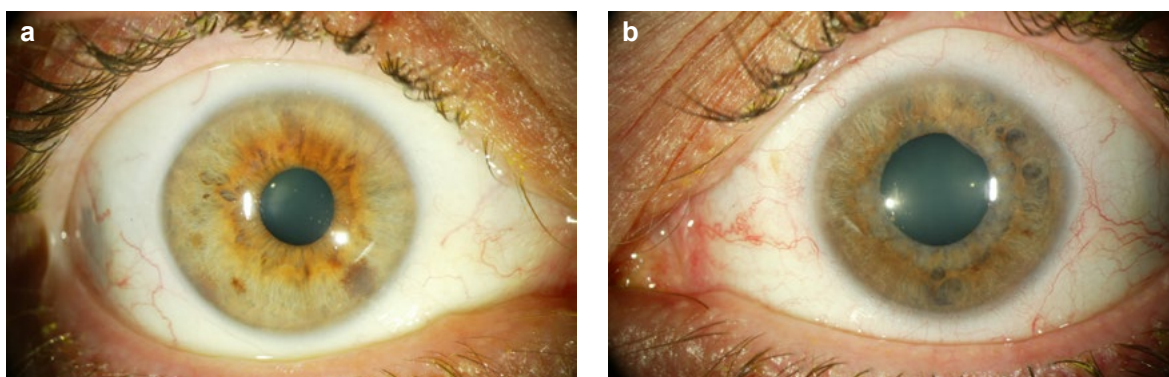


Figura 29. Heterocromía iridiana adquirida en el examen biomicroscópico del mismo paciente. **(a)** Ojo derecho normal comparativamente con el ojo izquierdo **(b)** donde se constata una hiperpigmentación iridiana e hiperemia conjuntival leve, atribuida al uso de análogos de las prostaglandinas tópicas (latanoprost 0,005 % monodosis/24 horas) en el ojo izquierdo del mismo paciente. La hiperpigmentación es un efecto secundario irreversible, no en cambio la hiperemia conjuntival que suele remitir tras la retirada del fármaco.

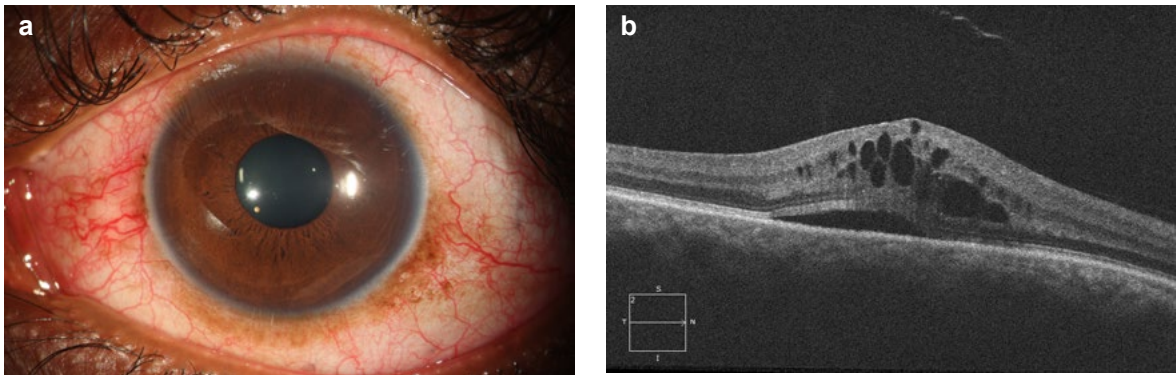


Figura 30. (a) Hiperemia conjuntival moderada e hiperpigmentación melanótica limbar, así como edema macular quístico, en el examen de OCT de segmento posterior **(b)** atribuida al uso de análogos de las prostaglandinas tópicas (latanoprost 0,005 % monodosis/24 horas) en el ojo izquierdo del mismo paciente. Todos estos efectos adversos suelen remitir tras la retirada del fármaco excepto la hiperpigmentación iridiana.

Importante remarcar como en la terapia antiglaucomatosa tópica, a los análogos de las prostaglandinas utilizados se les atribuyó en la primera década de su uso un alto potencial de efectos indeseables locales y muy bajo a nivel sistémico (Tabla 2) (EGS, 2003), aunque actualmente ya se han descrito efectos adversos de compromiso general como disnea, dolor torácico/angor, dolor lumbar, y exacerbación del asma (Tabla 3) (EGS, 2014, 2017b).

Respondedores *versus* no respondedores en la terapia médica del glaucoma

Otro aspecto importante es el concepto de *respondedores* y *no respondedores* a la terapia farmacológica instaurada. A nivel de los fármacos hipotensores, hay estudios que se basan en el porcentaje de respuesta observada tras la instilación del fármaco, en relación a la esperada según los estudios de farmacocinética y farmacodinámica de cada principio activo (Tabla 1) (EGS, 2014), o también en una reducción absoluta (por ejemplo de < a 3 o 5 mm Hg de la PIO basal).

Hay menos de un 10 % de no respondedores a los análogos de las prostaglandinas tópicas (reducción de la PIO inferior al 10-15 % con respecto a la basal) (Camras et al 2003; Rosseti L et al, 2006; EGS, 2014).

Hay muy pocos estudios sobre no respondedores a betabloqueantes tópicos, clásicamente se les relacionaba con taquifilaxia (pérdida de efecto terapéutico con el paso del tiempo) (Camras et al, 2003).

Generalmente, los principios activos utilizados para el tratamiento de la HTO y GPAA suelen tener una administración tópica, y una vez el fármaco penetra en el ojo, los mecanismos farmacológicos requieren de proteínas transportadoras, receptores celulares y enzimas metabólicos para conseguir el efecto terapéutico deseado (Dunn FG and Frohlich ED, 1981). En el caso de latanoprost, se ha descrito un receptor agonista selectivo de prostaglandina F2 α (*PTGFR*), que activa el *PTGFR* y, conduce a un aumento posterior

de las concentraciones de calcio intracelular y facilita el depósito de matriz de metaloproteinasas (Hinz B et al, 2005). Estas, a su vez, aumentan la salida uveoescleral del humor acuoso al degradar la matriz extracelular en el músculo ciliar, lo que reduce la PIO. Por otro lado, los betabloqueantes tópicos, reducen la PIO mediante el bloqueo de las terminaciones nerviosas simpáticas en el epitelio ciliar de los procesos ciliares, lo que provoca una disminución en la producción de humor acuoso (Brooks AM and Gillies WE, 1992). Los betabloqueantes tópicos no selectivos (Timolol), que bloquean los receptores 1 (ADRB1) y 2-adrenérgicos (ADRB2) difieren de los betabloqueadores cardiosselectivos (Betaxolol), que actúan solo en los receptores ADRB1.

3.4.2. Tratamiento láser

Existen diferentes tipos de láseres y diversas indicaciones para el tratamiento de glaucoma/HTO. En cuanto a los tipos de láseres disponibles, pueden ser en función de su longitud de onda de emisión, tales como el de argón, el Nd-YAG (del inglés, *neodymium-doped yttrium aluminium garnet*) o bien el de diodo, como los de mayor utilidad en el tratamiento del glaucoma/HTO. El láser de argón emite en longitud de onda azul-verde (488-514 nm) de forma continua y es absorbido por la melanina, por lo que se utiliza solo en tejidos pigmentados. El láser Nd:YAG emite en longitud de onda cerca del infrarrojo (1064 nm) y más comúnmente se utiliza la forma pulsada, como el Q-switched Nd-YAG de doble frecuencia (532 nm). El láser de emisión de infrarrojos de diodo (810 nm) es capaz de producir longitudes de onda monocromáticas, con un alto poder a través de un rango del espectro visible amplio (Shields MB, 1992; Latina MA et al, 1998; GLT, 1990).

En relación a los diferentes procedimientos en los que se recurre a la utilización del láser como terapia antiglaucomatosa, más frecuentemente empleados, suelen ser: a) Iridotomía láser (mediante la modalidad argón o Nd:YAG); b) Trabeculoplastia láser (mediante la modalidad argón (TLA), o bien selectiva (TLS) mediante Nd:YAG; c) Iridoplastia láser (láser argón); y d) Ciclofotocoagulación láser (láser diodo).

Las indicaciones varían, y en cada una de ellas se puede aplicar uno o varios tipos de láser. Así, la iridotomía láser (de las dos modalidades de láser es el Nd:YAG la más usada por su efecto disruptor más limpio), puede utilizarse mayoritariamente como prevención de un cierre angular (Figura 31) o bien en caso de ataque agudo de glaucoma. La iridoplastia láser argón se utiliza para ampliar el espacio angular y evitar posibles contactos iridocorneales que pudiesen provocar un CAP. En cuanto a la trabeculoplastia láser (en la modalidad argón conocida como TLA, o bien la de Nd:YAG conocida como trabeculoplastia láser selectiva, TLS), se aplica a nivel de la malla trabecular y actúa ampliando la vía de drenaje. Los procedimientos ciclodestructivos como el láser diodo, suelen reservarse para glaucomas en fase avanzada o bien cuando no existan otro tipo de procedimientos quirúrgicos a aplicar atendiendo a condiciones oculares, generalmente unas condiciones conjuntivales y/o angulares precarias para poder realizar cirugía angular o bien filtrante (Kumar H et al, 2018).

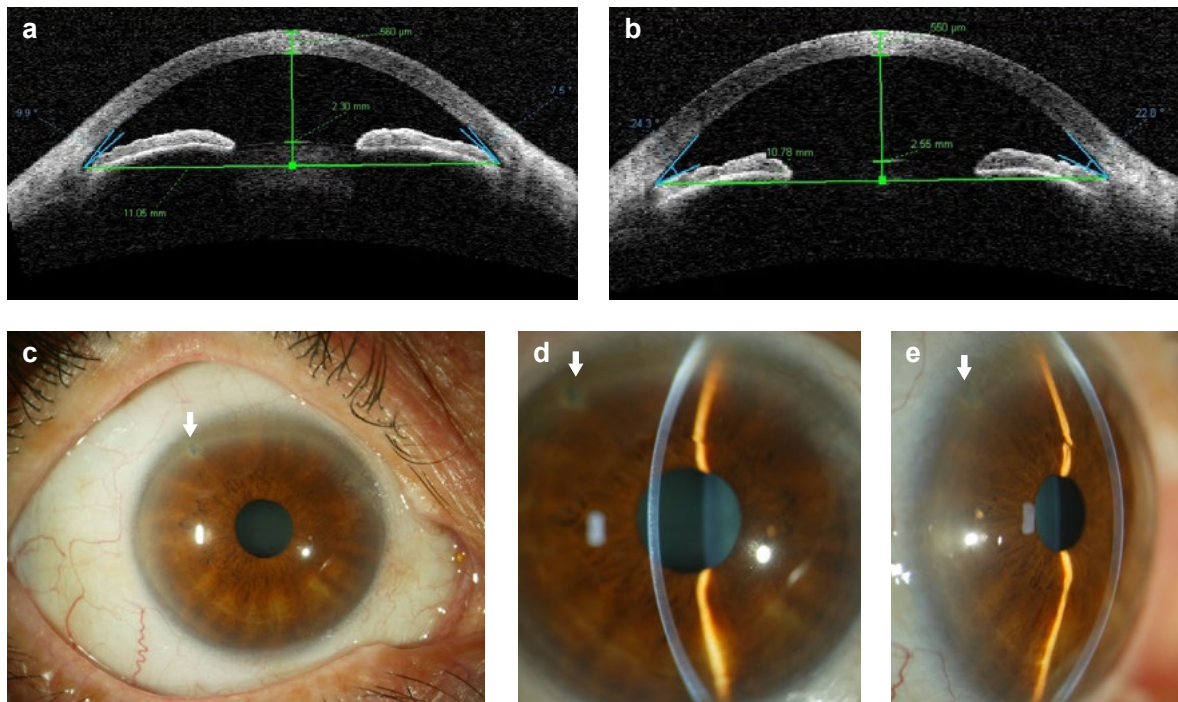


Figura 31. (a) OCT de SA visualizando el ángulo ocluíble (líneas azules) en el eje a 180°, con posibilidad de medirse; (b) Ampliación angular postiridotomía láser del mismo ojo de la figura a; Imágenes biomicroscópicas en plano frontal (c y d), y hendidura (e) donde se aprecia la iridotomía Nd: YAG láser realizada (flecha).

3.4.3. Tratamiento quirúrgico

Generalmente se recurre a él, cuando la terapia médica y/o láser resulten insuficientes para el control de la enfermedad glaucomatosa. La indicación de una cirugía de glaucoma suele realizarse valorando muchos factores, los más importantes serían la edad, el estado general del paciente, el grado de cumplimiento y/o posibles intolerancias a la terapia médica, el estadio del glaucoma, y las condiciones oculares que puedan condicionar la propia intervención quirúrgica a realizar, así como la viabilidad futura de la misma. Resulta de gran importancia valorar el estado de la conjuntiva, la existencia de cirugías previas, así como la coexistencia con otras patologías oculares, para definir las posibilidades técnicas que puedan aplicarse, conociendo siempre el potencial de riesgo inherente a la técnica, según lo expuesto por los ensayos clínicos más relevantes (Mattox C and Tsai JC, 2013). El objetivo es alcanzar la PIO objetivo sin adición de fármacos hipotensores, valorando además la tasa de éxitos y complicaciones, así como el resultado funcional final (EGS, 2014).

Técnicas quirúrgicas en la cirugía del glaucoma

Existen diferentes técnicas y a su vez, distintas formas de clasificarlas. Una de las más utilizadas sería la de cirugía filtrante (trabeculectomía, esclerectomía profunda no penetrante), técnicas con dispositivos de drenaje de tubo largo (válvula de Molteno, Krupin, Baerveldt, Ahmed, como las más frecuentemente utilizadas).

Las cirugías filtrantes a su vez pueden clasificarse en cirugías penetrantes y no penetrantes. En las primeras la fístula subconjuntival creada desde la cámara anterior hacia el espacio subconjuntival, el humor acuoso fluye libremente sin restricciones de paso, mientras que en las no penetrantes se mantiene mecanismos restrictivos al flujo. Dentro de las penetrantes están la trabeculectomía, que constituye la técnica más practicada en glaucoma desde la década de los 60 y la técnica de referencia para comparar posibles técnicas futuras en cuanto a su eficacia. Otra menos utilizada es la trabeculotomía que aislada o bien combinada con la trabeculectomía, se emplea generalmente en el tratamiento del glaucoma congénito e infantil, y resulta menos efectiva en los adultos.

En cuanto a las cirugías no penetrantes del glaucoma cabe destacar como más indicada por su mayor potencial hipotensor, la esclerectomía profunda no perforante en la que el mecanismo de restricción consiste en mantener una fina capa de la córnea (como es la membrana trabeculodescemética) para evitar descompresiones bruscas del globo ocular, además de realizar una apertura a nivel del canal de Schlemm, resecaando el tejido yuxtacanalicular (Figura 32) y consiguiendo un lago escleral donde se suele asociar la colocación de un implante para mejorar la eficacia de la técnica (EGS, 2017c).



Figura 32. Cirugía filtrante, esclerectomía profunda no perforante, se establece un mecanismo de restricción que consiste en mantener una fina capa de la córnea (como es la membrana trabeculodescemética) para evitar descompresiones bruscas del globo ocular, además de realizar una apertura a nivel del canal de Schlemm, resecaando el tejido yuxtacanalicular para facilitar el drenaje del humor acuoso, como técnica hipotensora.

En la última década se han incorporado dentro del algoritmo terapéutico quirúrgico del glaucoma, las técnicas MIGS (*Minimal Invasive Glaucoma Surgery*), se refiere a un grupo de procedimientos quirúrgicos que comparten cinco puntos preferenciales: abordaje ab interno a través de una incisión corneal clara que preserve la conjuntiva en términos incisionales; procedimiento mínimamente traumático para el tejido diana; eficacia en términos de disminución de la PIO que justifica el enfoque; alto perfil de seguridad que evite complicaciones mayores en comparación con otras cirugías de glaucoma; recuperación rápida con un impacto mínimo en la calidad de vida del paciente de vida (Saheb H and Ahmed II, 2012).

A su vez, ha dado paso a otra clasificación atendiendo al grado invasivo de la propia técnica, y se habla de cirugías invasivas o microinvasivas atendiendo al tipo de abordaje y que el procedimiento resulte mínimamente traumático para el tejido diana (Saheb Het al, 2012) y se subclasifica según el abordaje sea ab externo *versus* ab interno, y a su vez según la vía predominante de actuación, subconjuntival, canal de Schlemm o cuerpo ciliar (Figura 33).

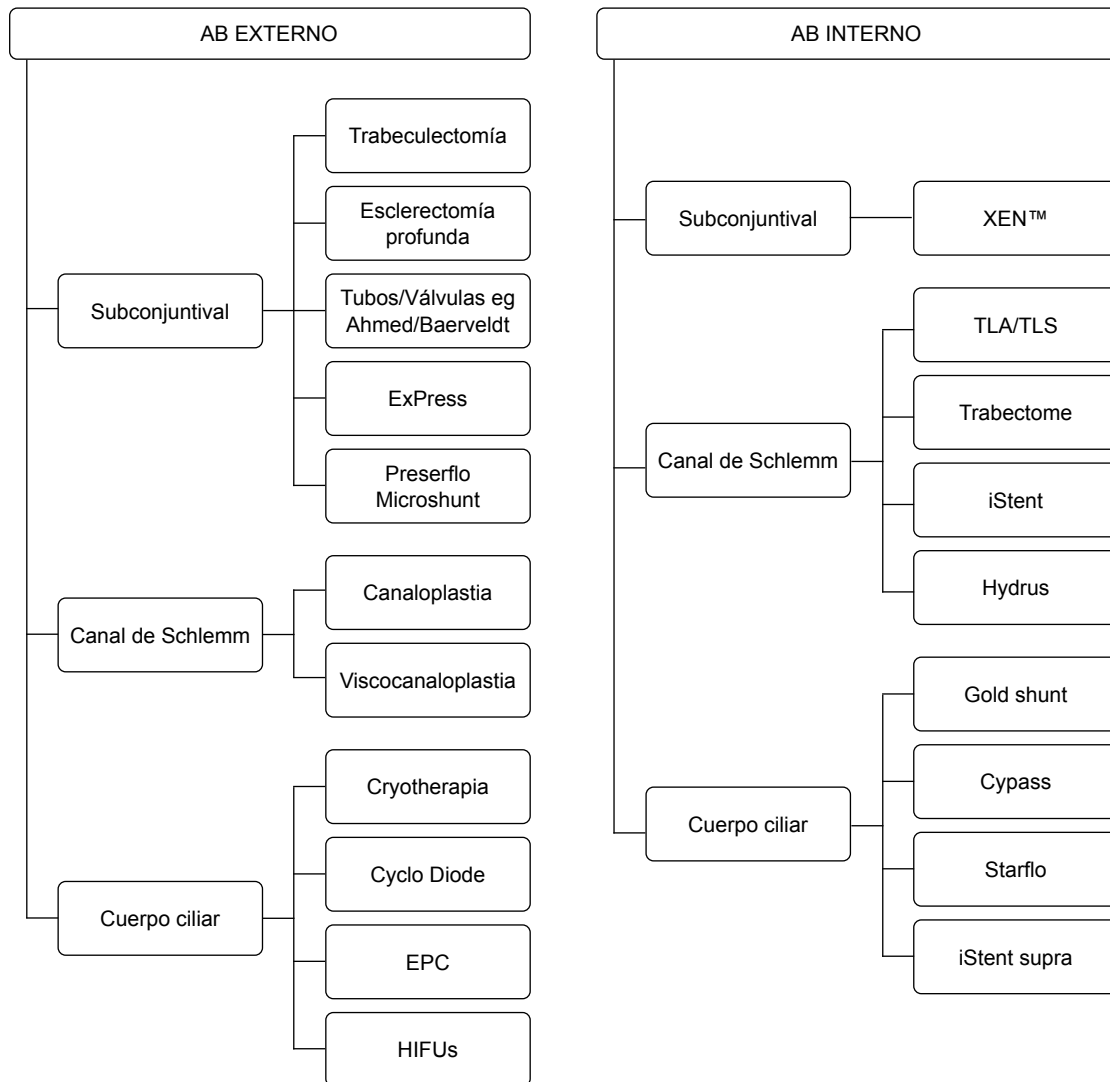


Figura 33. Opciones quirúrgicas actuales la cirugía de glaucoma, según la vía de abordaje y las estructuras comprometidas (Saheb H and Ahmed II, 2012).

3.5. Farmacogenética y farmacogenómica en el glaucoma

El tratamiento médico del glaucoma constituye un pilar terapéutico de primera línea, pero no siempre podemos saber el grado de respuesta esperada pese constatar un buen cumplimiento por parte del paciente. Las variaciones individuales en la respuesta al fármaco prescrito así como las posibles reacciones adversas que puedan derivarse, supone un problema sanitario conocido en relación al seguimiento y control de la enfermedad, así como en el incremento asistencial que pueda suponer. Solo en EEUU se estima que los efectos indeseables de los fármacos pueden suponer más de 2 millones de casos/año (Lazarou J et al, 1998), y un 6 % de reacciones adversas graves son causa de ingreso hospitalario en Alemania (Shastry BS, 2010).

Es conocido como determinantes genéticos pueden modular la respuesta farmacológica en diferentes patologías, entre ellas el glaucoma. La variabilidad genética de un individuo en la respuesta esperada a un fármaco constituye la base de estudio de la farmacogenética, en donde la detección de modificaciones individuales permite avanzar en poder conocer los diferentes niveles de respuesta para cada persona en la línea de medicina personalizada a la que se tiende actualmente, y más recientemente hay estudios en que los que se relaciona con nuevas vías en la codificación de proteínas que influyen tanto en la farmacocinética (factores que influyen en la concentración de un fármaco para alcanzar su objetivo) como en la farmacodinámica (el objetivo del fármaco en si).

Mientras que la farmacogenómica tiene una visión más integradora de todo el genoma, estudiando las bases moleculares y genéticas de diferentes enfermedades para poder desarrollar nuevas vías terapéuticas y, actualmente, parece que se está moviendo más hacia una fase traslacional hacia la clínica, incorporándose en el proceso de desarrollo y regulación de fármacos (Weinshilboum RM et al, 2006).

Ambas disciplinas permiten avanzar en el conocimiento del genotipo individual del individuo, en relación a la efectividad esperada de un tratamiento farmacológico así como el conocimiento de los posibles efectos adversos que puedan presentarse. La implementación clínica de la farmacogenómica conduce a la medicina personalizada, lo que mejora la eficacia, seguridad y rentabilidad de los tratamientos (Klein ME et al, 2017). De ello se deduce la gran aplicabilidad que supone, especialmente en enfermedades crónicas que requieran largos periodos de tratamiento y, en las que la terapia inadecuada pueda tener consecuencias irreversibles (Whirl-Carrillo M et al, 2012) (Figura 34).

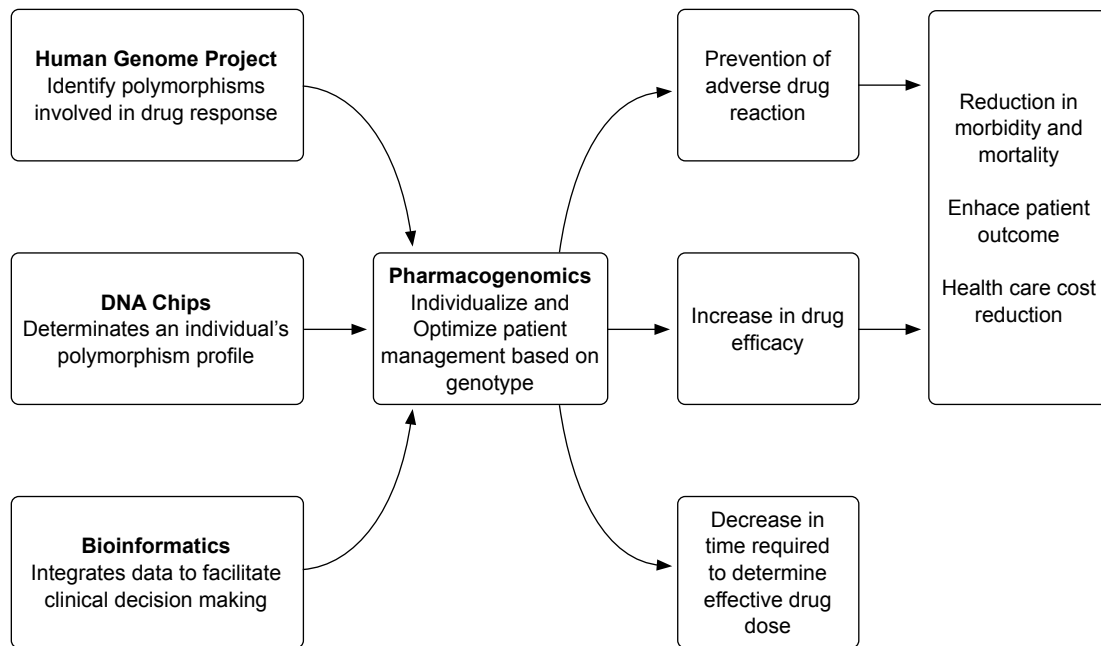


Figura 34. Aplicabilidad de la farmacogenómica (Tsai YJ and Hoyme HE, 2002).

La farmacogenética, a través del análisis del ADN, nos permite conocer no solo la predisposición genética a padecer determinadas enfermedades, sino también a identificar posibles mutaciones, que a su vez puedan explicar las diferentes respuestas observadas en personas distintas bajo tratamientos idénticos para una misma enfermedad. La mayoría de las respuestas farmacológicas involucran una gran cantidad de genes, que a su vez, tienen varios polimorfismos. La variabilidad en la respuesta de los pacientes ante un determinado fármaco se debe a un polimorfismo genético, por la variación en la secuencia de ADN, siendo una característica mendeliana y, en la que la sustitución de una sola base da lugar a un polimorfismo de un solo nucleótido conocido como polimorfismo de nucleótido simple (SNP). En base a ello, se han empezado a valorar SNP y haplotipos de los genes diana del fármaco a estudiar, ya que uno de los polimorfismos más característicos se ven en los SNP. (McLaren NC and Moroi SE, 2003). Así, la farmacogenética requiere de una metodología analítica que permita identificar los polimorfismos genéticos de la persona a tratar y, se recurre a *microarrays* que puedan definir perfiles de expresión genética, pudiendo obtener mapas de alta densidad de SNP, que permiten correlacionar las SNP con diferentes situaciones clínicas tanto en la eficacia observada del fármaco como en la tolerancia y posibles efectos adversos al mismo, pudiendo llegar a indicar un tratamiento personalizado, tanto en la elección del fármaco, dosis y duración del tratamiento.

A través de la farmacogenómica, una de las ventajas del estudio genotípico del individuo es el permitir un análisis principal acerca de las posibles variaciones genéticas, y poder actuar de forma directa, sin mediar posibles interacciones de otros fármacos, cambios hormonales u otras causas que puedan suponer una influencia en el resultado del fármaco utilizado. A su vez, pueden obviarse posibles efectos secundarios a la terapia.

Otro aspecto importante es el proceso de metabolización del fármaco que ocurre tras la administración del mismo, en el que el organismo procede a su eliminación y, en donde se ven involucradas diferentes familias de enzimas metabolizadoras, en donde a su vez, el polimorfismo genético pueden suponer cambios funcionales en la proteína codificada, y por tanto ir acompañadas de variaciones en la respuesta esperada. Una de estas familias es el enzima citocromo P450 (CYP450) y, un miembro de esta familia es el 2D6 (conocido como CYP2D6) que metaboliza in vivo el maleato de timolol, como se ha visto anteriormente, un fármaco betabloqueante tópico usado en la terapia antiglaucomatosa. También se ha demostrado que los polimorfismos del gen *CYP2D6* (*GenBank AY545216*) están relacionados con el nivel de respuesta del timolol (Edeki TI et al, 1995). Los polimorfismos genéticos en las enzimas metabolizadoras permiten establecer diferentes fenotipos de respuesta, como son los metabolizadores lentos (ML), metabolizadores normales (MN), metabolizadores rápidos (MR) y metabolizadores ultrarápidos (MUR) (Owen RP et al, 2009), estableciendo una relación con el potencial hipotensor del fármaco (McCarty CA et al, 2008). Ello tiene una gran importancia clínica, ya que permite ajustar la dosis del fármaco en función del nivel individual de metabolización.

Otro pilar en los mecanismos de acción terapéutica son los receptores de los fármacos, que permiten interactuar como elementos diana en el proceso de metabolización del mismo. Polimorfismos en los receptores también determinan diferencias individuales en la respuesta farmacológica (Tsai YJ and Hoyme HE, 2002).

Los betabloqueantes tópicos tienen efectos sistémicos además de locales, y los resultados relacionados con la absorción sistémica del timolol están relacionados con el genotipo *CYP2D6* (Nieminen T et al, 2005). Existen estudios que determinan si los polimorfismos genéticos farmacodinámicos (como el receptor adrenérgico) y farmacocinéticos (*CYP2D6*) están asociados a la respuesta de la PIO a los bloqueadores tópicos, y se vio como un SNP en *ADRB2* está asociado con una mayor probabilidad de una respuesta de la PIO clínicamente significativa a los betabloqueantes tópicos (McCarty CA et al, 2008). Asimismo, se puede tener información sobre el efecto adverso atribuible al uso de betabloqueantes como es la bradicardia, a través del estudio genético en el que se ha demostrado como la presencia del SNP rs16947 en *CYP2D6* puede suponer una susceptibilidad aumentada a una bradicardia inducida por el timolol (Yuan H et al, 2010). Otros estudios correlacionan un SNP en el *ADRB1* con la eficacia encontrada en la respuesta del betaxolol en la terapia glaucomatosa (Schwartz SG et al, 2005). Otros observaron una relación entre el efecto hipotensor del maleato de timolol y un SNP en el *ADRB2*, en relación con la PIO, y lo atribuyen a variables interpersonales (Fuchsjager-Mayrl G et al, 2005).

De forma similar, en varios estudios de SNP - rs3753380 y rs3766355 - en el gen del receptor F de las prostaglandinas (FPr)-alpha 2, se ha correlacionado con un buen efecto hipotensor del uso tópico ocular del latanoprost (Sakurai M et al, 2007). Recientemente se ha registrado una asociación entre SNP en los genes *PTGFR* y *SLCO2A1* con cambios en la respuesta al latanoprost en una cohorte de pacientes chinos afectados de glaucoma. El

estudio concluyó que las SNP rs4241366 en *SLCO2A1* y el rs3766355 en *PTGFR*, se correlacionaban con una buena respuesta al latanoprost, a corto y largo plazo (Zhang P et al, 2016). Más recientemente, en la genotipificación de un grupo de pacientes mediterráneos con GAA, se identificaron 5 SNP relacionados con la respuesta de latanoprost. Los SNP del gen *PTGFR* se asociaron con respuestas buenas (rs6686438, rs10786455) y negativas (rs3753380, rs6672484, rs11578155). Además, el gen *MMP-1* también estaba relacionado con la refractariedad para la respuesta para este fármaco (Ussa F et al, 2015). Curiosamente, rs3753380 en *PTGFR*, ha sido asociada con una pobre respuesta al latanoprost en una cohorte japonesa (Sakurai M et al, 2007; Sakurai M et al, 2014).

Mediante aproximaciones de análisis de tipo GWA, ha tenido éxito la identificación de *loci* que contribuyen a enfermedades complejas (McCarthy MI et al, 2008; Hindorff LA et al, 2009; Hirschhorn JN, 2009). Una de las limitaciones encontradas en los estudios de GWA, es el alto coste económico que pueden suponer. Para enfermedades con biología desconocida o participación genética, un agrupamiento genómico representa una estrategia útil y económica para probar las asociaciones con odds ratios moderados (Castro-Giner F et al, 2009; Earp MA et al, 2011; Forstbauer LM et al, 2012).

De todo ello se deduce la importancia que puede suponer el conocimiento de estos factores para poder establecer una terapia individualizada buscando la máxima eficacia terapéutica desde el mismo momento de iniciar el tratamiento reemplazando el clásico esquema terapéutico basado en el método ensayo/error, por un tratamiento personalizado atendiendo al perfil genético de respuesta farmacológica del paciente. La posibilidad de disponer de una información previa a través de la farmacocinética y farmacogenómica del glaucoma, dentro de un contexto complejo de variaciones intra e interpersonales, para cada individuo, nos abre unas posibilidades terapéuticas más eficaces y a su vez más seguras, obviando fármacos sin un potencial efecto hipotensor y a su vez con toda la carga de posibles efectos adversos, además de la reducción de costes que pueda suponer al sistema sanitario de salud (Weinshilboum RM and Wang L, 2006). Es poco probable que un solo gen, o variante genética, dicte la respuesta al fármaco, por lo que un enfoque poligénico, un análisis del SNP del genoma completo y una comprensión molecular de la enfermedad en sí, pueden proporcionar una mejor perspectiva futura para el tratamiento farmacológico del glaucoma.



4. Hipótesis de trabajo

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Con base a lo expuesto anteriormente, nuestra hipótesis de trabajo se basa en los siguientes puntos:

1. La respuesta farmacológica en la terapia del glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) y/o hipertensión ocular (HTO) con drogas hipotensoras es individualizada y personal. Dicha respuesta, depende de las diferencias etiopatogénicas y evolutivas de la enfermedad, con respuestas clínicamente satisfactorias o no, según los consensos encontrados en las guías clínicas terapéuticas consultadas y referenciadas previamente.
2. Los principales fármacos hipotensores tópicos de primera línea, para el tratamiento del GPAA y la HTO, con referencia a su eficacia demostrada para el descenso de la presión intraocular (PIO), son los betabloqueantes (maleato de timolol) y los análogos de las prostaglandinas (latanoprost). El perfil de respuesta para ambos, no es el mismo para cada paciente.
3. Es conocido que tanto los betabloqueantes como los análogos de las prostaglandinas de administración tópica, pueden inducir efectos colaterales locales y sistémicos de severidad diversa, algunos incluso irreversibles.
4. La eficacia y la tolerancia son esenciales para una terapia farmacológica exitosa tanto para el GPAA como para la HTO, lo que contribuye a mitigar y evitar las consecuencias de la elevación de la PIO sobre el nervio óptico y la retina neurosensorial que, en caso de no ser tratada puede conllevar a la ceguera. Asimismo, la HTO es considerada el principal factor de riesgo descrito para el glaucoma.
5. Hay evidencias fehacientes que los SNPs (polimorfismos de nucleótidos simple) en los receptores celulares para ambos grupos de fármacos, pueden condicionar la eficacia en términos de respuesta hipotensora.
6. La determinación de un perfil de respuesta personalizada e individualizada para el paciente, antes del inicio del tratamiento farmacológico del GPAA o de la HTO, puede contribuir a un mejor control evolutivo de ambas patologías, evitando la demora clínica que supone actualmente la reevaluación de la respuesta terapéutica para ambos fármacos.
7. El poder evitar posibles efectos adversos en aquellos pacientes con escasa eficacia de respuesta terapéutica al fármaco, en base a su perfil genético previo a la administración, puede contribuir a evitar posibles reacciones indeseables tópicas y sistémicas, y así mejorar el control de la enfermedad y la calidad de vida.



5. Objetivos


5. OBJETIVOS

A fin de dar respuesta a nuestras hipótesis de trabajo, el presente proyecto tiene como **objetivo principal** el de definir perfiles de respuesta terapéutica para los fármacos más frecuentemente utilizados en el tratamiento médico del glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) e hipertensión ocular (HTO) - los betabloqueantes y los análogos de las prostaglandinas tópicas - mediante aproximaciones de farmacogenética y con base a una aproximación personalizada, con la finalidad de poder predecir su eficacia.

Como **objetivos secundarios** será el de:

- Analizar el porcentual de reducción de la presión intraocular diurna, en términos de eficacia definida, para cada uno de los fármacos - los betabloqueantes y los análogos de las prostaglandinas tópicas - en los pacientes candidatos a tratamiento médico del GPAA y la HTO con base a una orientación personalizada de precisión.
- Identificar variantes de número de copias (CNV, *Copy Number Variants*) asociadas a las diferencias de eficacia de respuesta farmacológica, a fin de establecer un biomarcador farmacogenético para los individuos respondedores y no respondedores, a los dos grupos de fármacos estudiados.

Todo ello, supondría una mejoría en la eficacia terapéutica de primera intención y, además, contribuir para evitar efectos indeseables tópicos y sistémicos de intensidad y gravedad variable, en caso de los pacientes que presenten un perfil de respuesta inicial no satisfactoria o de no respuesta.



6. Material y métodos

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Aspectos éticos

El presente estudio se realizó cumpliendo los preceptos éticos que determina la Declaración de Helsinki (Fortaleza, Brasil, octubre de 2013) y obtuvo la aprobación del Comité de Ética local (CEIC, Centro de Oftalmología Barraquer; Ref. COB033). Las muestras humanas fueron obtenidas, procesadas y analizadas de acuerdo con la normativa vigente de la UE (2004/23/CE y 2006/17/CE), en relación con la recolección y conservación de tejidos y muestras humanas, y de acuerdo con el protocolo y los requisitos legales (Ley 14/2007 y RD 1716/2011), que regula el uso de muestras biológicas para la investigación biomédica en España. La información clínica y el consentimiento informado para participar en el estudio, se obtuvieron de forma diligente. El uso y la protección de los datos personales de todos los sujetos/donantes participantes, su comunicación y transferencia, cumplieron con las regulaciones locales (Ley LO 3/2018).

6.2. Estructura y diseño del estudio

Con el objetivo de poder conocer, previo a su administración, el potencial de respuesta personalizado a los fármacos de primera línea más utilizados en el tratamiento tópico del glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) e hipertensión ocular (HTO), como son los betabloqueantes tópicos (BL) y los análogos de las prostaglandinas tópicas (PG), se diseñó el presente estudio.

Se incluyeron pacientes de ambos sexos y mayores de 18 años, diagnosticados de GPAA o HTO, en uno o ambos ojos, y que requirieron tratamiento farmacológico atendiendo a la cifra de presión intraocular (PIO) encontrada, y los criterios clínicos indicativos de instaurar tratamiento. La PIO se midió siempre por el mismo investigador (MIC) utilizando un tonómetro de aplanamiento Goldmann (Carl Zeiss, Inc., Jena, Alemania) montado en un biomicroscopio con lámpara de hendidura, siempre el mismo, y debidamente calibrado según los protocolos del centro (Centro de oftalmología Barraquer, Barcelona, España) y, en la misma franja horaria (9 hora de la mañana \pm 1 hora), en todas las medidas realizadas, ya sea previo a la instauración del tratamiento, como post terapia. Se consideró como criterio de diagnóstico de GPAA, una PIO superior a 21 mmHg y, mediante pruebas funcionales y/o estructurales, defectos reproducibles en la capa de fibras neuroretinianas (CFNR) y cabeza del nervio óptico (CNO) que puedan ser sospechosas de glaucoma. Como criterio para HTO, se consideró una PIO superior a 21 mmHg sin constatar ni clínicamente ni mediante pruebas funcionales y/o estructurales, defectos reproducibles en la CFNR y CNO que puedan ser sospechosas de glaucoma (EGS, 2014).

Se diseñó un estudio prospectivo observacional, aleatorizado con intervención en el cual se han incluido pacientes diagnosticados de GPAA o HTO, que requirieron tratamiento hipotensor ocular con betabloqueantes tópicos o bien mediante análogos de las prostaglandinas tópicas para el control de la PIO. Los criterios de inclusión y exclusión fueron los siguientes (Tabla 5):

6.2.1. Criterios de inclusión

1. Hombre o mujer, ≥ 18 años de edad, con capacidad legal para firmar el consentimiento informado.
2. Disponer del consentimiento informado debidamente cumplimentado, respetando a su vez la normativa legal vigente en cuanto a privacidad de datos.
3. Pacientes diagnosticados de GPAA que requerían ser tratados, y que a su vez cumplían criterios de recibir tratamiento hipotensor ocular, como el de registrar una PIO > 21 mmHg, el constatar un ángulo camerular abierto, evidenciar alteraciones en CFNR y/o CNO, alteraciones reproducibles en el campo visual (CV), y todos estos criterios oculares debían cumplirse uni o bilateralmente.
4. Pacientes diagnosticados de HTO que requerían ser tratados, y que a su vez cumplían criterios de recibir tratamiento hipotensor ocular, como el de registrar una PIO > 21 mmHg, el constatar un ángulo camerular abierto, sin evidenciar alteraciones en la CFNR y/o CNO, alteraciones reproducibles en el CV, y todos estos criterios oculares debían cumplirse uni o bilateralmente.
5. Paciente que se comprometía a un buen cumplimiento farmacológico.

6.2.2. Criterios de exclusión

1. Pacientes que no cumplían los criterios anteriormente expuestos.
2. Pacientes diagnosticados de glaucoma secundario (GS) (consideramos el glaucoma pseudoexfoliativo o el glaucoma pigmentario como GS).
3. Glaucoma primario por cierre angular (GPCA).
4. Contraindicación al tratamiento tópico hipotensor mediante análogos de las prostaglandinas o bien betabloqueantes tópicos, ya sea por intolerancia local o bien sistémica a dichos principios activos.
5. Uso de corticoesteroides intravenosos, intramusculares o tópicos, 21 días previos al examen de la PIO basal.
6. Alteraciones corneales que podían falsear el resultado tonométrico mediante tonometría de aplanación Goldmann.
7. Paquimetría fuera del rango de 500-600 μm .
8. Enfermedad ocular activa o recurrente: uveítis, infección ocular.
9. Pacientes que requerían más de un principio activo simultáneamente para el control de la PIO.

10. Antecedentes de cirugía y/o láser ocular previo, excepto cirugía de cataratas sin complicaciones referidas y con un tiempo previo no inferior a 6 meses. Y también capsulotomía láser con un tiempo previo no inferior a 6 meses sin evidenciar vítreo en cámara anterior ni otras complicaciones asociadas.

TABLA 5. Criterios de elegibilidad de la cohorte a estudio

Hombre o mujer \geq 18 años de edad
Pacientes diagnosticados de GPAA que requieran ser tratados farmacológicamente, que cumplan los siguientes criterios:
<ul style="list-style-type: none"> PIO > 21 mmHg, uni o bilateralmente Ángulo camerular abierto Alteración en la CFNR y/o CNO Alteraciones reproducibles en el CV
Pacientes diagnosticados de HTO que requieran ser tratados farmacológicamente, que cumplan los siguientes criterios:
<ul style="list-style-type: none"> PIO > 21 mmHg, uni o bilateralmente Ángulo camerular abierto No alteración en la CFNR y/o CNO No alteraciones en el CV
No glaucomas secundarios (glaucoma pigmentario, pseudoexfoliativo entre otros)
No alteraciones corneales que puedan comprometer el registro tonométrico
Paquimetría entre 500 y 600 μm
No enfermedad ocular activa o recurrente: uveítis, infección ocular
No pacientes que requieran más de un principio activo simultáneamente para el control de la PIO
No antecedentes de cirugía y/o láser ocular previo, excepto
<ul style="list-style-type: none"> Cirugía de cataratas sin complicaciones referidas, y con un tiempo previo no inferior a 6 meses Capsulotomía láser con un tiempo previo no inferior a 6 meses sin evidenciar vítreo en cámara anterior ni otras complicaciones asociadas
No tratamiento con corticosteroides 6 meses antes del periodo de inclusión al estudio

6.2.3. Grupos de estudio

La primera medición tonométrica de la PIO, se asignó como PIO basal y se realizó antes de empezar el tratamiento. En un plazo no inferior a las 6 semanas (± 3 días) se llevó a cabo una segunda medición de la PIO, para evaluar la respuesta terapéutica. Se definió eficacia terapéutica a los dos fármacos estudiados (PG y BL), como una reducción de la PIO en relación de la PIO basal entre un 25 % hasta un 35 % para los análogos de las prostaglandinas (PG) (latanoprost 50 mg/mL una vez al día, por la noche) y entre un 20 % hasta un 25 %, para los betabloqueantes tópicos (BL) (maleato de timolol 5 mg/mL cada 12 horas) según los criterios de consenso de respuesta

hipotensora esperada para cada uno de ellos (EGS, 2014, 2017c; Raber S et al, 2015). El estudio fue aleatorizado en unidades agrupadas relacionadas con el tratamiento tópico inicial establecido. Para ello se definieron dos grupos de tratamiento y de estudio:

Grupo I: pacientes que fueron sometidos a tratamiento ocular hipotensor, con análogos de las prostaglandinas tópicas (PG) y específicamente latanoprost 50 mg/mL (Xalatan® colirio 0,005 %, Pfizer, New York, NY, USA), administrado una vez al día, por la noche, según posología recomendada para este grupo farmacológico (EGS, 2014).

Y, a su vez, definimos dos subgrupos en términos de eficacia hipotensora, basándonos en los criterios de respuesta de los análogos de las prostaglandinas tópicas expuestos en las Guías de la EGS, a los que se les atribuye de un 25 % hasta 35 % de reducción de la PIO (EGS, 2014).

Subgrupos de estudio de análogos de prostaglandinas tópicas:

- I.A. Respondedores (RPG): reducción de la PIO \geq 30 % con relación a la PIO basal previa al tratamiento tópico instaurado, según los niveles de eficacia esperados tras la instilación del fármaco, valorado al control de las 6 semanas (\pm 3 días) después de la instauración del tratamiento.
- I.B. No respondedores (NRPG): reducción de la PIO $<$ 25 % en relación a la PIO basal previa al tratamiento tópico instaurado, según los niveles de eficacia esperados tras la instilación del fármaco, valorado al control de las 6 semanas (\pm 3 días) después de la instauración del tratamiento.

Grupo II: pacientes que fueron sometidos a tratamiento hipotensor tópico con betabloqueantes tópicos (BL) y específicamente Maleato de timolol 5 mg/mL (Timofтол® colirio en solución 5 mg/mL, Santen Pharmaceutical. Grand Front Osaka Tower A, 4-20 Ofuka-cho, Kita-ku, Osaka 530-8552, Japan), administrado cada 12 horas, según posología recomendada para este grupo farmacológico (EGS, 2014).

Y, a su vez, hemos definido dos subgrupos en términos de eficacia hipotensora, basándonos en los criterios de respuesta de los betabloqueantes tópicos expuestos en las Guías de la EGS, a los que se les atribuye de un 20 hasta 25 % de reducción de la PIO (EGS, 2014).

Subgrupos de estudio de los betabloqueantes tópicos:

- II.A. Respondedores (RBL): reducción de la PIO \geq 25 % en relación a la PIO basal previa al tratamiento tópico instaurado, según los niveles de eficacia esperados tras la instilación del fármaco, valorado al control de las 6 semanas (\pm 3 días) después de la instauración del tratamiento.
- II.B. No respondedores (NRBL): reducción de la PIO $<$ 20 % en relación a la PIO basal previa al tratamiento tópico instaurado, según los niveles de eficacia es-

perados tras la instilación del fármaco, valorado al control de las 6 semanas (± 3 días) después de la instauración del tratamiento.

Después de la segunda medición tonométrica, para los no respondedores (NR) según los criterios establecidos, se aplicó un periodo de lavado de 6 semanas (± 3 días), y los pacientes fueron retratados de forma cruzada: maleato de timolol (BL) para los no respondedores a latanoprost (NRPG) y latanoprost (PG) para los no respondedores a maleato de timolol (NRBL); luego fueron reasignados a cada uno de los grupos acorde con la respuesta hipotensora encontrada (Figura 35).

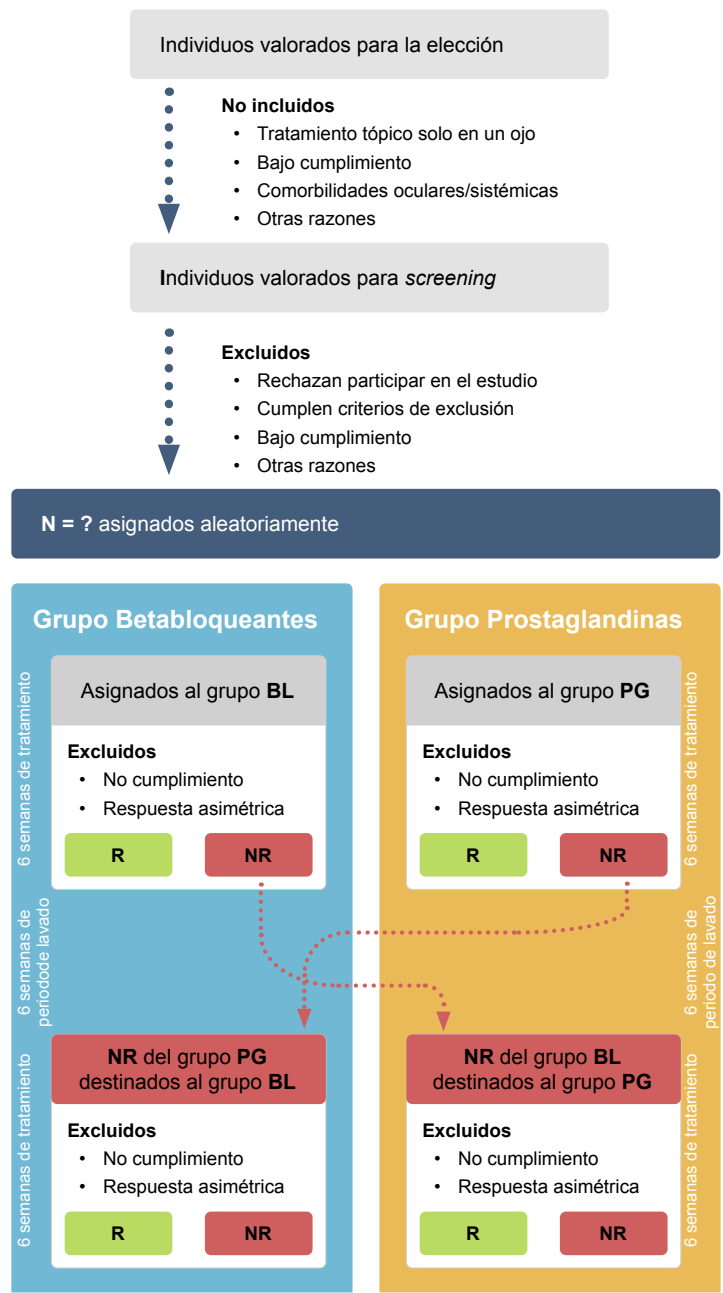


Figura 35. Diagrama de flujo: Diseño y Cohorte del estudio. Esquema de retratamiento cruzado de los pacientes no respondedores en los grupos de PG y BL según los criterios de eficacia definidos (EGS, 2014). **R:** Respondedores; **NR:** No respondedores; **PG:** Prostaglandinas; **BL:** Betabloqueantes tópicos.

6.3. Estudio farmacogenético

6.3.1. Aproximación para la identificación de variantes genéticas de número de copia

La base de la aproximación para el descubrimiento de variantes de número de copia (CNV, *Copy Number Variants*) asociadas a un fenotipo, ha sido previamente descrita en la literatura (De Cid R et al, 2009) y combina una fase de descubrimiento de *loci* asociados a fenotipos extremos en un número reducido de individuos en forma de 'pool de ADN' en el que se analiza todo el genoma, seguida de una fase de validación en un número mayor de individuos en la que se pretende distinguir cuales de los *loci* identificados en la etapa previa están realmente asociados al fenotipo y cuáles se identificaron por azar (Figura 36).

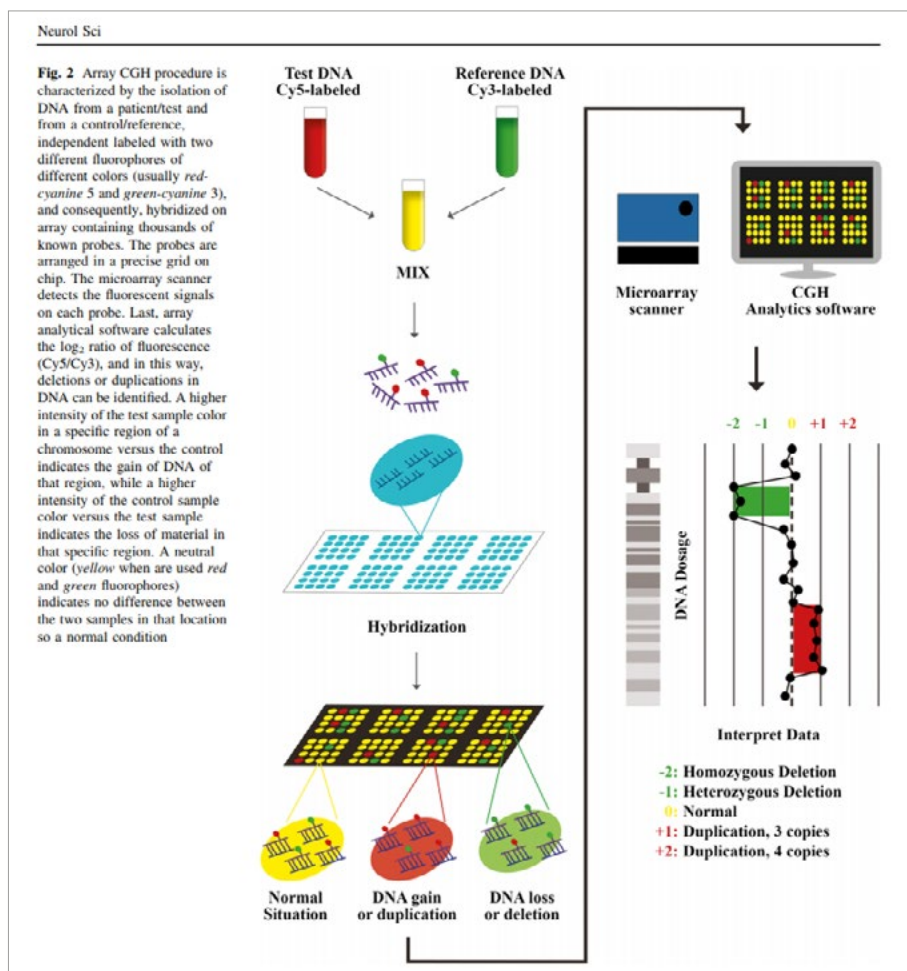


Figura 36. Esquema de trabajo: utilización de *microarray* de CGH de alta resolución. El ADN de referencia y el ADN problema se marcan con fluorocromos distintos (Cy3 y Cy5, respectivamente, en la figura) y se mezclan. Esta mezcla de ADNs marcados se deposita sobre la superficie del *microarray* que contiene sondas específicas de regiones conocidas del genoma humano. En las condiciones de reacción y temperatura adecuadas, y gracias a las propiedades físicoquímicas del ADN, sobre cada sonda del *microarray* se unirá la misma cantidad de ADN de referencia y problema, salvo que exista un desbalance en la cantidad de ADN de origen (duplicación o delección). Gracias a la ayuda de un láser es posible medir la cantidad de señal de cada fluorocromo Cy3 y Cy5 depositado sobre cada sonda del *microarray* y, por lo tanto, inferir su número de copia en el ADN de origen (Colaiani V et al, 2016).

En nuestro caso, en la fase inicial del estudio, se empleó una aproximación basada en *arrays* de alta densidad para el análisis de CNV en grupos de pacientes respondedores (R) y no respondedores (NR), que fueron exhaustivamente caracterizados según los criterios clínicos previamente expuestos. Las metodologías de alto rendimiento (*high-throughput*) como los *microarrays*, es sabido que permiten la realización de un estudio de genes a nivel global del genoma, son fiables y, además, económicamente viables (Sobek J et al, 2006; Colaianni V et al, 2016).

Este objetivo era inalcanzable hasta hace muy poco tiempo por las limitaciones técnicas de los análisis de número de copia dirigidos, previamente existentes (PCR: *Polymerase Chain Reaction*; o MLPA: *Multiplex Ligation Probe Amplification*), entre otros. En los últimos años, la tecnología de *microarray* (*CGH arrays: Comparative Genome Hybridization*) se ha convertido en una de las principales plataformas tecnológicas para el análisis de sistemas biológicos mediante técnicas de alto rendimiento (*high-throughput*).

Existen diferentes formas de variación genética en el genoma humano (Figura 37). En el presente trabajo hemos abordado el estudio de la contribución de las CNVs a la respuesta farmacológica encontrada en el tratamiento del GPAA y de la HTO.

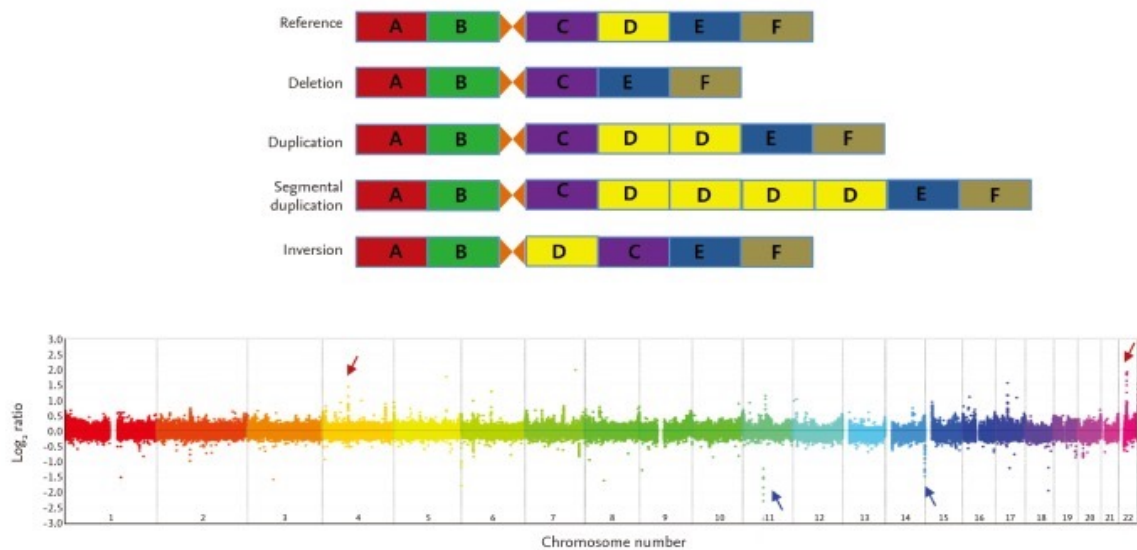


Figura 37. Diferentes tipos de variaciones en el número de copias (CNVs) y un ejemplo de detección de genoma completo de CNVs. El gráfico superior ilustra la delección, duplicación y duplicación segmental múltiple del *locus* “D” en comparación con el genoma de referencia, así como la inversión de “C” y “D”. El gráfico inferior muestra un ejemplo de detección de genoma completo de CNVs utilizando la hibridación genómica comparada por *arrays* (aCGH). Las flechas roja y azul representan el incremento y la disminución del número de copias en los CNVs, respectivamente (Yim SH et al, 2015).

6.3.2. Recogida de muestras y análisis genético de la cohorte

Se recogió saliva de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio, a partir de la que se obtuvo el ADN para realizar los análisis genéticos, y que nos permitió conocer si están presentes determinadas mutaciones (nuevas o previamente conocidas) para los receptores sensibles a los dos grupos farmacológicos estudiados (BL y PG) previa a la instauración terapéutica de los mismos. Las muestras de saliva fueron recogidas mediante el sistema ORAGENE-DNA (Self-Collection Kit OG-500; DNA Genotek Inc, Ottawa, Canada), que permite la obtención de la muestra de forma no invasiva, rápida y con un alto índice de rendimiento para la obtención del ADN genómico.

La estrategia de *pooling* de pacientes con un “fenotipo estricto” de R y de NR, pretende reducir la variabilidad individual de alteraciones y de variación de CNVs (Figura 38) que no estén relacionadas con la patología. Con este propósito, las muestras de ADN obtenidas de cada individuo para cada grupo fenotípicamente caracterizado, se mezclaron de manera equimolar para crear un *pool*. La mezcla de ADN del grupo de R se hibridó contra una mezcla de ADNs obtenidos de muestras de pacientes NR sobre un *array* de oligonucleótidos de muy alta densidad (Agilent 1M, que contiene alrededor de un millón de sondas genómicas, con una cobertura aproximada de una sonda cada 3 Kb). De este modo, se pretendió identificar las regiones de número de copia comunes que estaban alteradas en las muestras de cada uno de los grupos del estudio.

Para la detección de CNVs que pudieran modular la respuesta obtenida al tratamiento farmacológico, se crearon dos grupos de muestras para cada fenotipo: respondedores *versus* no respondedores para pacientes afectados de GPAA y HTO, tratados con BL y PG respectivamente (Figura 38), cumpliendo los criterios de inclusión (Tabla 5). El ADN genómico de los pacientes se aisló a partir de una muestra de 2 mL de saliva recogida usando el colector de Oragene ya referenciado previamente. Para la extracción del ADN se siguió el protocolo recomendado por el mismo fabricante, empleando el reactivo PrepIT-L2P y precipitación con etanoles (ref. <https://www.dnagenotek.com/ROW/pdf/PD-PR-006.pdf>). La concentración y la pureza del ADN extraído se calcularon a partir de los valores de las ratios de densidad óptica 260/280 y 260/230, que fueron proporcionados por una lectura continua de longitud de onda, con un dispositivo Denovix DS-11 (Wilmington, DE, USA). Para la confección de los *pools* o agrupaciones, se mezclaron cantidades equimolares (100 ng) de muestras de ADN. Se utilizaron 21 y 14 muestras de ADN para preparar los grupos de respondedores a las PG (RPG) y no respondedores (NRPG), respectivamente. Los grupos de BL se componían por 20 y 13 muestras de ADN de respondedores (RBL) y no respondedores (NRBL), respectivamente. Se usó un *microarray* de CGH de alta resolución (Agilent 1M, AMADID 021529) para hibridar el grupo de ADN respondedor marcado con Cy3 contra el grupo de ADN no respondedor marcado con Cy5. La identificación y determinación de CNVs se llevó a cabo utilizando el algoritmo ADM-2, con los siguientes parámetros: umbral = 6,3 sondas consecutivas con un valor de \log_2 ratio absoluto > 0,25, logrando así una resolución promedio aproximada de 9-12 Kb para la detección de CNVs.

En la fase de validación de los hallazgos, se optó por utilizar la técnica del MLPA, con la que se analizaron una cohorte extendida de pacientes R y NR a cada uno de los tratamientos. Para todas las regiones candidatas que mostraron valores de \log_2 ratio por encima o por debajo del umbral, se diseñó al menos una sonda específica de MLPA. A continuación, se desarrolló un ensayo específico de MLPA para determinar el número de copias de cada uno de los *loci* (genotipación) en una cohorte de mayor número de individuos, siguiendo los procedimientos estándar (Schouten JP et al, 2002; Marcinkowska-Swojak M et al, 2013).

Se preparó una mezcla personalizada de sondas de MLPA que contiene 4 sondas de regiones control, más las siete sondas dirigidas a regiones variables identificadas. En todas las carreras de MLPA se incluyeron muestras de ADN de control (ADNs de referencia procedentes de población general) para la normalización de los valores de intensidad de cada sonda. Se analizaron individualmente 189 muestras con la mezcla MLPA personalizada, de un total de 151 individuos. El número de copias se estimó a partir de la distribución multimodal de alturas de sonda normalizadas, que recapitulaban la combinación diferente de genotipos de números de copias.

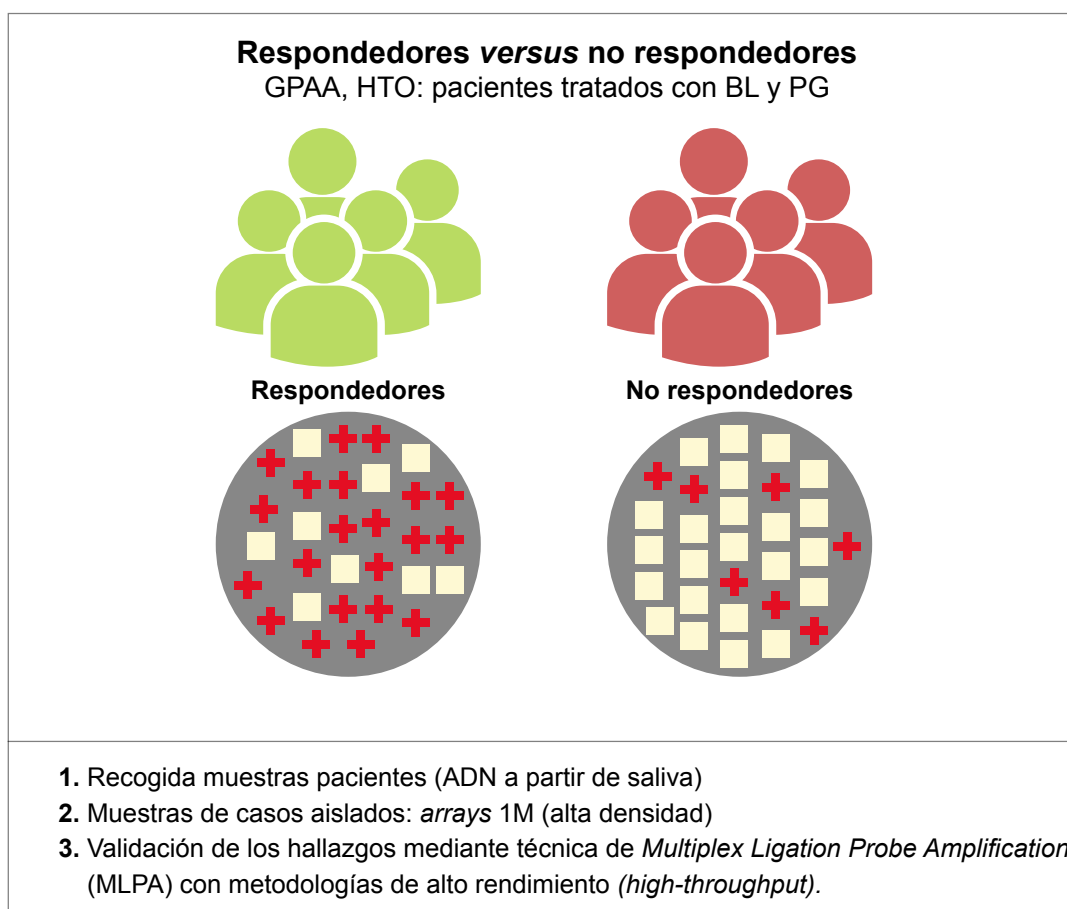


Figura 38. Esquema de trabajo para detectar las diferencias en el número de copias en los dos grupos de muestras de pacientes respondedores y no respondedores a los betabloqueantes tópicos (**BL**, maaleato de timolol) y a los análogos de prostaglandinas tópicos (**PG**, latanoprost).

6.4. Tratamiento estadístico

Las variables que se consideraron en el presente estudio fueron: demográficas (edad, sexo), la mejor agudeza visual corregida (BCVA), PIO basal (antes del tratamiento) y a las 6 semanas (3 días) post terapia. Las variables cuantitativas se expresaron por medio de su media \pm desviación estándar (MD \pm DE). Las variables cualitativas se expresaron mediante distribución de frecuencias. Se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la distribución normal de las variables medidas. Se realizó una prueba t de Student para la comparación de las variables. Las diferencias con un valor de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas. Para esta parte del estudio el análisis se realizó utilizando SPSS® (Paquete Estadístico para Ciencias Sociales, v18.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

La comparación de la distribución de genotipos de número de copias entre respondedores y no respondedores se realizó mediante una prueba exacta de Fisher, en tablas de contingencia 3x2 construidas a partir de la frecuencia de los diferentes genotipos (A/A, A/B y B/B). Se rechazó la hipótesis nula de que las distribuciones de frecuencia de alelos no eran diferentes entre los dos grupos si el valor de p era < 0.05 . Los análisis de asociación entre el número de copias de los diferentes *loci* y el estado de respuesta a los diferentes tratamientos farmacológicos, se llevaron a cabo utilizando el paquete SNPassoc R (González JR et al, 2007) mediante la evaluación de la interacción entre la CNV y el tratamiento estudiado. La corrección múltiple utilizando el enfoque de Bonferroni se utilizó para determinar aquellos CNV que presentaron una asociación significativa con la respuesta al tratamiento. Se usó un modelo lineal generalizado (glm) para calcular la probabilidad de respuesta de la interacción entre el número de copias de la CNV y el tratamiento.



7. Resultados

7. RESULTADOS

Se realizó una preselección de 353 individuos que, según los criterios de inclusión establecidos, podían ser candidatos a ser valorados para el estudio (Figura 39). De estos, 128 fueron excluidos por varios motivos, ya sea por ya estar en tratamiento previo (n = 53); por constatar un bajo cumplimiento por parte del paciente (n = 21); detectar comorbilidades oculares que podrían interferir en el resultado de la PIO obtenida (n = 37); así como una PIO basal muy elevada (≥ 30 mmHg) que podría hacer necesario más de un principio activo para conseguir el objetivo terapéutico deseado (n = 17). Entonces, el número de individuos que podían ser valorados para la visita inicial se reducía a 225, de los que tuvieron que ser excluidos otros 60 candidatos, por diferentes causas, como el rechazo a participar en el estudio (n = 24); constatar criterios de exclusión (n = 18); percibir un bajo cumplimiento por parte del paciente (n = 13), así como otras razones (domicilio habitual lejano al lugar de seguimiento, entre otras) (n = 5) que desaconsejó su inclusión. Se pudo incluir y aleatorizar 165 pacientes (Figura 39).

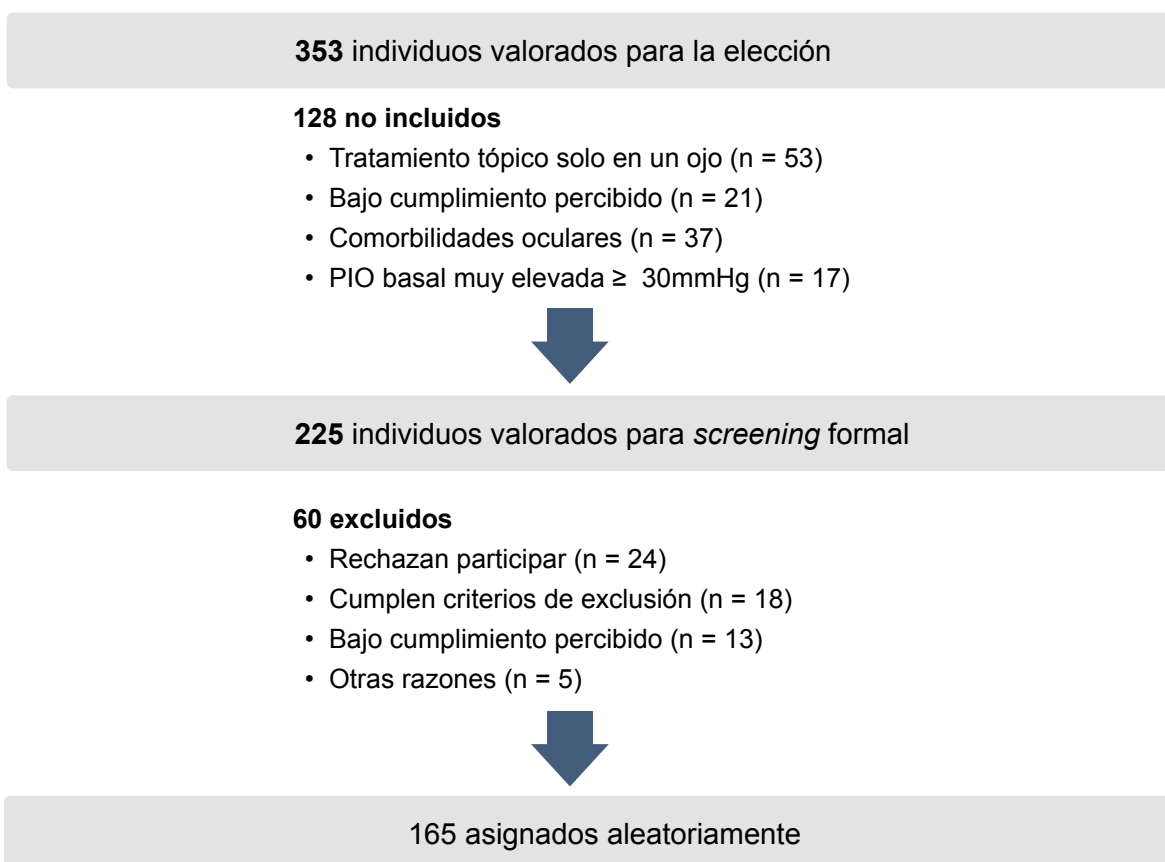


Figura 39. Diagrama de flujo: 353 individuos valorados para la elección, 225 individuos valorados para *screening* formal y 165 individuos asignados aleatoriamente.

De los 165 individuos que fueron asignados aleatoriamente, 14 tuvieron que ser excluidos, 6 en el grupo de BL (5 por falta de cumplimiento y 1 por constatar respuesta terapéutica asimétrica) y, 8 en el grupo de PG (6 por falta de cumplimiento y 2 por respuesta terapéutica asimétrica). Entendemos por respuesta terapéutica asimétrica, cuando se constatan diferencias clínicamente significativas en la PIO registrada en ambos ojos, a las 6 semanas (± 3 días) de iniciar el tratamiento hipotensor, con un rango superior a 4 mmHg de diferencia entre ambos ojos en relación a la PIO basal registrada. De los 151 individuos restantes, se asignó 70 en el grupo de BL, y 81 en el grupo de PG (Figura 40).

A las 6 semanas (± 3 días) después de la instauración del tratamiento, se valoró de nuevo la PIO y, según el porcentaje de respuesta hipotensora constatada, se etiquetaron en respondedores (R) o no respondedores (NR). Los R encontrados fueron 44 y 46 en el grupo de BL y PG, respectivamente. Mientras que los NR constatados fueron de 26 y 35 en el grupo de BL y PG, respectivamente. Estos pacientes NR se sometieron a un periodo de lavado de 6 semanas (± 3 días), y fueron retratados de forma cruzada y posteriormente reasignados en los grupos correspondientes. La PIO basal de la que partíamos y las características funcionales y estructurales de la patología estudiada (glaucoma) y sobretodo el estadio evolutivo de la misma, así como el principal factor de riesgo de desarrollar glaucoma (HTO), no requerían desde el punto de vista clínico asociar una medicación coadyuvante durante este periodo de lavado, dado que la PIO basal > 30 mmHg fue considerado criterio de exclusión (Figura 40).

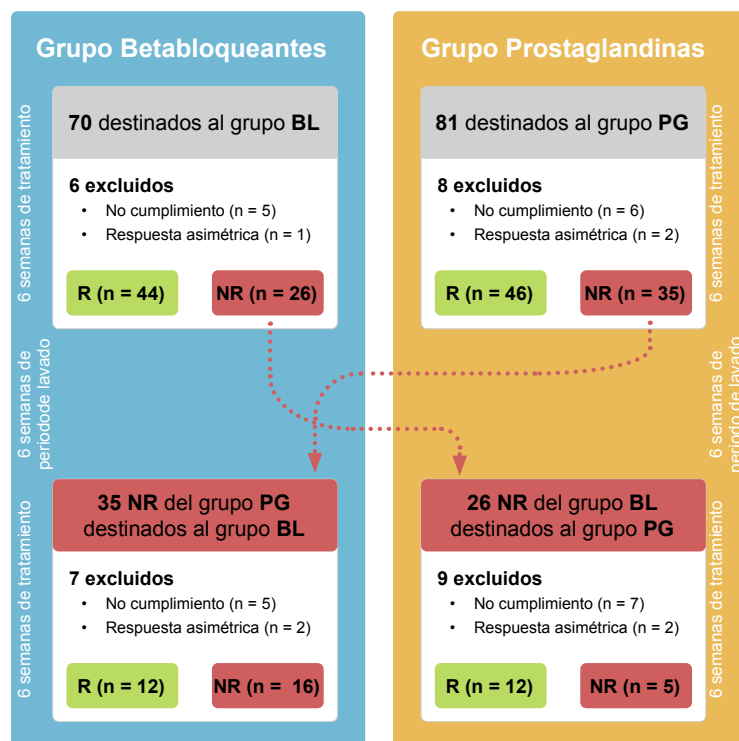


Figura 40. Diagrama de flujo: Diseño y Cohorte del estudio. Distribución de los pacientes en cada uno de los grupos R y NR de los BL y PG. Esquema de retratamiento cruzado de los pacientes no respondedores en los grupos de PG y BL según los criterios de eficacia definidos (EGS, 2014). R: Respondedores; NR: No respondedores; PG: Análogos de las prostaglandinas tópicos: latanoprost/24 horas; BL: Betabloqueantes tópicos: maleato de timolol/12 horas

Con el retratamiento cruzado, se logró que 26 individuos NRBL (no respondedores a los betabloqueantes), se incluyeran en el grupo de las PG recibiendo este fármaco (latanoprost) y, de la misma forma 35 NRPG (no respondedores a los análogos de las prostaglandinas) pasaron a ser tratados como grupo BL (maleato de timolol). Igualmente, se excluyeron 15 individuos de todos los pacientes reasignados: 7 de los que pasaron para el grupo de BL, por falta de cumplimiento (n = 5) y por respuesta terapéutica asimétrica (n = 2); y 9 de los que se reasignaron en el grupo PG, debido a falta de cumplimiento (n = 7) y por respuesta terapéutica asimétrica (n = 2). De total de individuos retratados, se reasignó 28 pacientes en el grupo de BL (12 R y 16 NR) y, 17 en el grupo de PG (12 R y 5 NR). Al final del periodo de estudio, de los 151 pacientes evaluados, 56 (44 + 12) fueron respondedores a BL (RBL) y 58 (46 + 12) a las PG (RPG). Hemos constatado que 21 pacientes no respondieron satisfactoriamente a ninguno de los dos principios activos administrados en monoterapia (Figura 41).

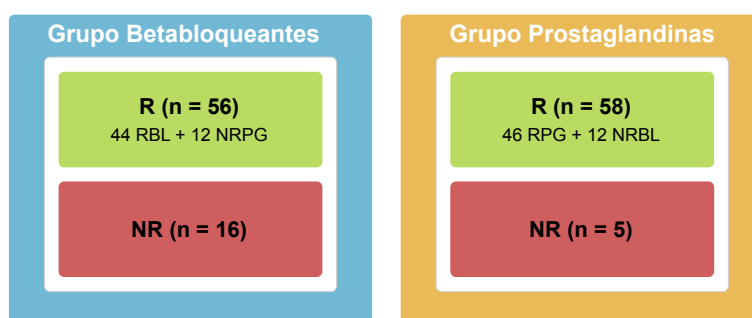


Figura 41. Diagrama de flujo: Diseño y Cohorte del estudio con el total de pacientes asignados en cada grupo, así como la suma de **R** y **NR** tras la reasignación de **BL** y **PG**. Existe un grupo de **NR** a ninguno de los dos grupos **BL** y **PG**. **R**: Respondedores; **NR**: No respondedores; **PG**: Análogos de las prostaglandinas tópicas: latanoprost/24 horas; **BL**: Betabloqueantes tópicos: maleato de timolol/12 horas

7.1. Respuesta al tratamiento

Se estudiaron un total de 151 pacientes. De estos, 70 recibieron tratamiento con betabloqueantes tópicos (maleato de timolol; grupo BL) y 81 con análogos de las prostaglandinas tópicas (latanoprost; grupo PG). Todos los pacientes fueron tratados durante 6 semanas (± 3 días). En el grupo BL, 44 (62,8 %) respondieron y 26 (37,2 %) no respondieron, mientras que en el grupo PG, 46 (56,7 %) respondieron y 35 (43,3 %) no respondieron. En el grupo BL, la PIO basal fue de $24,3 \pm 2,9$ mmHg que disminuyó a $19,0 \pm 3,1$ mmHg después de recibir el tratamiento de maleato de timolol. En el grupo PG, la PIO basal fue de $24,4 \pm 2,2$ mmHg, y disminuyó a $18,9 \pm 3,3$ mmHg después de recibir tratamiento de latanoprost (Tabla 6). La edad, el sexo y la BCVA, no se relacionaron con la respuesta terapéutica en los grupos BL o PG (Tabla 6).

TABLA 6. Características demográficas, distribución de la cohorte de pacientes y los dos grupos estudiados, y la respuesta promedio de la PIO basal y postratamiento.

	Total	R	NR	<i>p</i>
BL	70	44 (62,8 %)	26 (37,2 %)	
Edad (MD ± DE)	50,0 ± 15,3	58,2 ± 14,3	52,5 ± 16,5	0.126
Mujer (%)	38 (54,2 %)	26 (59,1 %)	12 (46,2 %)	0.293
Hombre (%)	32 (45,8 %)	18 (40,9 %)	14 (53,8 %)	
PIO1 (MD ± DE)	24,3 ± 2,9	24,8 ± 3,2	23,4 ± 2,1	0.063
PIO2 (MD ± DE)	19,0 ± 3,1	17,2 ± 2,3	21,6 ± 2,4	0.0001
BCVA (MD ± DE)	0,88 ± 0,25	0,92 ± 0,24	0,83 ± 0,26	0.161
PG	81	46 (56,7 %)	35 (43,3 %)	
Edad (MD ± DE)	57,8 ± 13,4	57,6 ± 13,6	57,9 ± 13,4	0.914
Mujer (%)	43 (53 %)	23 (50 %)	20 (57 %)	0.447
Hombre (%)	38 (47 %)	23 (50 %)	15 (43 %)	
PIO1 (MD ± DE)	24,4 ± 2,2	24,6 ± 3,7	24,3 ± 3,1	0.701
PIO2 (MD ± DE)	18,9 ± 3,3	16,8 ± 2,5	21,3 ± 3,1	0.0001
BCVA (MD ± DE)	0,90 ± 0,29	0,99 ± 0,21	0,80 ± 0,34	0.006
Total pacientes	151	90	61	

BL: Grupo de tratamiento con betabloqueantes tópicos: timolol/12 horas; **PG:** Grupo de tratamiento con análogos de prostaglandinas tópicas: latanoprost/24 horas; **R:** Respondedores; **NR:** No Respondedores; **PIO1:** PIO basal, pretratamiento; **PIO2:** PIO postratamiento; **BCVA:** Mejor agudeza visual corregida; **MD ± DE:** Media ± Desviación estándar; **p:** Valor de significancia estadística de los respondedores *versus* los no respondedores

Para las personas que no respondieron al tratamiento después de un mínimo de 6 semanas (± 3 días) de su instauración, se sometieron a un período de lavado durante 6 semanas (± 3 días) y se procedió a realizar un enfoque cruzado (fármaco alternativo) (Figuras 40 y 41): maleato de timolol (BL) para los que no respondieron al latanoprost y latanoprost (PG) para los que no respondieron al maleato de timolol, respectivamente.

Después del cambio terapéutico, los individuos fueron reevaluados a las 6 semanas (± 3 días) y reasignados de acuerdo con la respuesta terapéutica obtenida. Así, 35 pacientes no respondedores al latanoprost (NRPG) fueron retratados con maleato de timolol (BL), de los cuales 12 de ellos fueron reasignados al grupo de RBL, 16 fueron reasignados como NRBL, y 7 fueron excluidos (por falta de cumplimiento o bien respuesta terapéutica asimétrica). De la misma forma, 26 no respondedores al maleato de timolol (NRBL) fueron retratados con latanoprost (PG), de los cuales 12 se reasignaron al grupo de RPG, 5 fueron reclasificados como NRPG y, 9 fueron excluidos (por falta de cumplimiento o bien respuesta terapéutica asimétrica). Del total de los 165 individuos randomizados asignados, 14 fueron excluidos

por respuesta terapéutica asimétrica y falta de cumplimiento (Figuras 40 y 41).

El promedio de disminución de la PIO de los respondedores en el grupo BL (tratados con maleato de timolol), fue de un 29,5 % de media en relación a la PIO basal, lo que se constató en 56 individuos. En el grupo PG (tratados con latanoprost) el promedio de disminución de la PIO en el grupo de respondedores fue del 31,7 % en relación a la PIO basal, lo que se confirmó en 58 individuos. En los 21 individuos que no respondieron a ambos fármacos en monoterapia, el promedio de disminución de la PIO en relación a PIO inicial fue de apenas un 9,0 %.

7.2. Identificación de *loci* candidatos para la respuesta terapéutica

7.2.1 Fase de identificación

En una primera fase se procede a realizar un análisis farmacogenético para analizar posibles variantes en el número de copias (CNVs) entre los R y los NR de los dos grupos estudiados (BL y PG), utilizando técnicas de *arrays* disponibles.

El análisis inicialmente realizado de la variación global del número de copias utilizando un *microarray* de alta resolución (Figura 42), nos permitió identificar 7 regiones genómicas (entre 3,8 y 46 Kb), identificadas en las regiones correspondientes a *13q21*, *GSTT1*, *LCE1D*, *PHACTR1*, *MLIP*, *1p31* y *2q22*, que mostraron diferencias en el número de copias al compararse los grupos de R y NR.

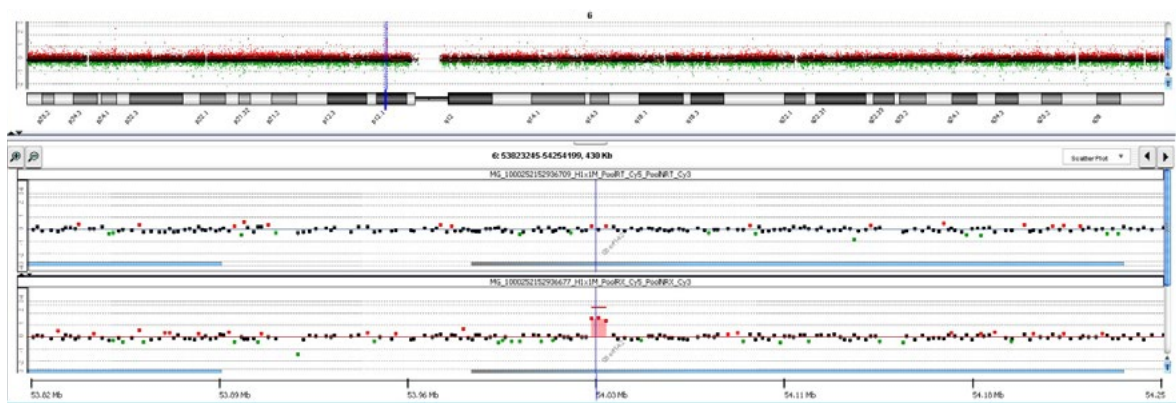


Figura 42. Análisis de la variación global del número de copias utilizando un *microarray* de alta resolución. En la parte superior de la figura se muestra el contexto genómico del gen *MLIP*, ubicado en la región pericentromérica del brazo corto del cromosoma 6. Justo debajo, se muestra una ampliación de la región con los valores de \log_2 ratio de las sondas del *microarray* que cubren esta región. En el panel central se observan los valores de \log_2 ratio de las sondas en una hibridación entre dos mezclas de ADN procedentes de individuos control. En el panel inferior de la imagen se muestra el resultado de la hibridación de las mezclas de ADN de pacientes respondedores y no respondedores a latanoprost (PG). Se observa como 3 sondas de una región intrónica del gen *MLIP* (previamente llamado C6orf142) tienen un valor de \log_2 ratio superior al normal, lo que indica la presencia de una alteración de número de copias.

Considerando que de todos los *loci* genéticos tenemos 2 copias (1 alelo paterno y 1 alelo materno), cuando se hace un estudio de *arrays* de CGH, se estima el número de copias relativo a la muestra A *versus* la muestra B, que en nuestro estudio se trata de la muestra de R *versus* NR tanto para el grupo BL como para el grupo PG. Lo habitual (y por ende considerado “normal”), es que tanto la muestra A (R), como la B (NR) de ambos grupos de individuos estudiados (BL y PG) tengan dos copias en todos los *loci*, de forma que si hacemos la ratio de las copias de la muestra A (R), dividido entre las copias de la muestra B (NR), el resultado sea 1 (2 copias A / 2 copias B = 1). Habitualmente no se mide la ratio sino el logaritmo en base 2 de la ratio ($\log_2 \text{ratio A/B}$); el \log_2 de 1 vale 0.

Cuando en un estudio se constata que en una de las mezclas el número de copias promedio de los *loci* genéticos estudiados es mayor en relación al otro grupo, en términos de promedio, se recurre al uso del término *gain* (ganancia), y en sentido opuesto hablamos de *loss* (pérdida) cuando el número de copias promedio es menor *versus* al otro grupo analizado. La relevancia está en que pone de manifiesto una diferencia en las CNVs que puede a su vez correlacionarse o no con diferencias de los grupos analizados. En nuestro estudio, que el resultado sea un *gain* a uno de los grupos estudiados, significa que en el *array* comparativo del grupo de BL en el que se analizó la mezcla de respondedores y no respondedores a maleato de timolol (RBL *versus* NRBL), en términos de promedio, el número de copias de los respondedores fue superior al de los no respondedores, y este hallazgo se constató en los *locus* 13q21, y *GSTT1* para el grupo de BL. De la misma forma que el resultado para las PG sea un *gain* RPG en el *locus* *MLIP*, significa que el número de copias promedio de los respondedores *versus* los no respondedores al tratamiento con latanoprost, fue superior en los respondedores RPG (RPG *versus* NRPG) (Tabla 7).

TABLA 7. Regiones genómicas que muestran diferencias de número de copia identificadas mediante la utilización del *microarray* de alta densidad entre los grupos de respondedores y no respondedores (Genome assembly GRCh37/hg19)

Locus	Chromosome	Cytoband	Start	End	Size	p	Type & Group
13q21	13	13q21.1	57759370	57788921	29 Kb	2,001E-23	Gain RBL
<i>GSTT1</i>	22	22q11.23	24349305	24395353	46 Kb	8,545E-18	Gain RBL
<i>LCE1D</i>	1	1q21.3	152762076	152769870	7,7 Kb	4,322E-07	Loss NRPG
<i>PHACTR1</i>	6	6p24.1	13156200	13159684	3,8 Kb	1,543E-07	Loss NRPG
<i>MLIP</i>	6	6p12.1	53929240	53934834	5,5 Kb	4,883E-10	Gain RPG
1p31	1	1p31.1	72766555	72801950	35 Kb	3,764E-31	Loss RPG
2q22	2	2q22.3	146865725	146876364	10 Kb	2,630E-12	Loss NRPG

Chr: chromosome; ***GSTT1*:** glutathione S-transferase theta 1; ***LCE1D*:** late cornified envelope 1D; ***PHACTR1*:** phosphatase and actin regulator 1; ***MLIP*:** muscular LMNA interacting protein; **BL:** Betabloqueantes tópicos: maleato de timolol/12 horas; **PG:** Análogos de las prostaglandinas tópicas: latanoprost/24 horas; **NRBL:** No respondedores a los betabloqueantes tópicos: maleato de timolol/12 horas; **NRPG:** No respondedores a los análogos de las prostaglandinas tópicas: latanoprost/24 horas; **p:** Valor de significancia estadística entre los grupos de respondedores y no respondedores

Con base al análisis de las CNVs y al algoritmo utilizado (ADM-2 https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/g3800-90028_cgh_interactive.pdf) la probabilidad que la alteración de las CNVs identificadas, sea una región comúnmente alterada, está relacionada con el tamaño de la CNV, los valores de las sondas individuales que lo forman, y entre otras cosas, se tiene en cuenta el algoritmo que detecta las CNVs.

7.2.2 Fase de validación

Tras la fase de identificación de los posibles *loci* candidatos en un grupo seleccionado de pacientes, el número de copias alélicas para cada uno de los candidatos se evaluó adicionalmente en una cohorte de mayor tamaño usando un ensayo MLPA personalizado, que contiene sondas para los diferentes *loci*. Entre estos, dos exhibieron diferencias significativas en las CNVs entre R y NR a los diferentes tratamientos, concretamente *1p31* y *MLIP*, mientras que los otros 5 *loci*, no pudimos constatar diferencias significativas entre R y NR.

En relación al grupo BL, encontramos mayor variación en el número de copias entre los que no respondieron a los BL en relación a los que si respondieron a este tratamiento (prueba exacta de Fisher; $p = 0.0039$). Asimismo, se investigó más a fondo la naturaleza de la asociación y se encontró que cada copia del alelo *1p31* confiere un efecto negativo en la respuesta a los BL en términos de capacidad promedio de disminución de la PIO, mediante un modelo aditivo ($OR = 0.37$; $p = 0.0009$).

El estudio semicuantitativo del *locus 1p31* mediante MLPA, nos permitió constatar una distribución de respuesta de las muestras estudiadas a partir de la que se infiere que hay 3 estados, que se corresponden con el número de copia de los *loci* (0 copias B/B, 1 copia A/B, y 2 copias A/A) (Figura 43).

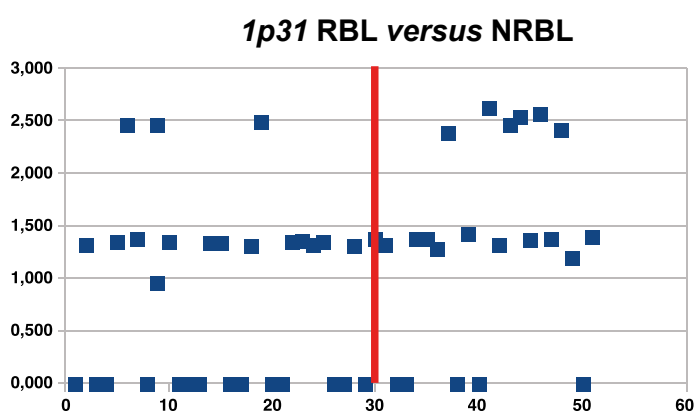


Figura 43. Estados de respuesta al uso de betabloqueantes tópicos (BL) en relación a la variación en los CNVs del *locus 1p31*. En la parte izquierda se localizan las muestras de respondedores (BLR), mientras que, en la derecha, separados por la línea roja vertical, se muestran los valores de las muestras de los individuos no respondedores (BLNR). Se puede observar que los valores se pueden agrupar en tres categorías, que corresponden con el número de copia de este *loci* (0 copias B/B –muestras en la parte inferior de la gráfica–, 1 copia A/B –zona intermedia–, y 2 copias A/A –zona superior–) **RBL**: Respondedor a betabloqueantes tópicos: maleato de timolol/12 horas ; **NRBL**: No respondedor a betabloqueantes tópicos: maleato de timolol/12 horas

El *locus 1p31* coincide con una región intergénica, es decir, esta CNV no afecta a ningún gen o a ningún elemento funcional del genoma. El hecho de que no sea una región conservada a nivel evolutivo, ello nos lleva a pensar inicialmente que pueda carecer de un efecto relevante sobre la función del organismo.

Por otro lado, hemos evidenciado que el gen más próximo al *locus 1p31* es *NEGR1* (*Neuronal Growth Regulator 1*) que está a unas 20 Kb (Figura 44). *NEGR1* es un gen codificante y se ha relacionado con enfermedades como la de Niemann-Pick. Se ha sugerido que puede estar involucrado en procesos de adhesión celular y, en base a su semejanza estructural, funcionaría como un factor promotor del crecimiento axonal en el cerebro de los mamíferos (Kumar P and Mahalingam K, 2018).

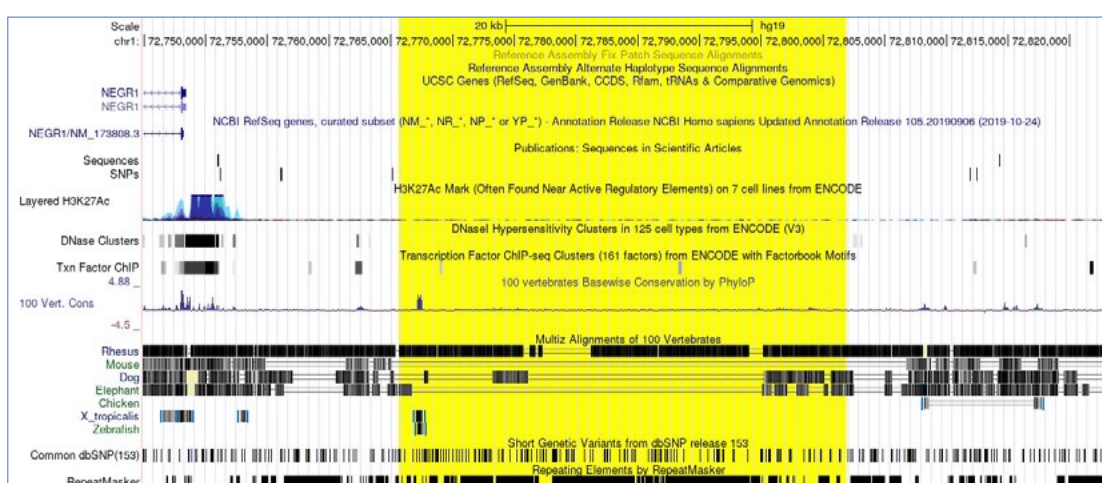


Figura 44. Localización del *locus 1p31* en relación al gen *NEGR1*. El gen más próximo al *locus 1p31* es el gen *NEGR1*, que está situado aproximadamente a unas 20 Kb.

El *locus MLIP* se encuentra en una región intrónica del gen *MLIP* (*Muscular LMNA-Interacting Protein; Muscular-Enriched A-Type Laminin-Interacting Protein*; Proteína de Interacción con Laminina-A enriquecida en los Músculos; NCBI Entrez Gene: 90523; OMIM: 614106) descrito en distintas bases de datos (NCBI Reference Sequence Database: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3965057/, University of California, Santa Cruz, CA, USA) (Figura 45).

Con relación al número de copias para *MLIP*, se encontró diferencias significativas en la distribución del genotipo entre R y NR (prueba exacta de Fisher, $p = 0.0094$). En relación al grupo BL constatamos que cuanto mayor fue el número de copias de la variante *MLIP*, menor era la capacidad de los BL para disminuir la PIO (OR = 0.40, $p = 0.0057$). Y, en relación al grupo PG, la distribución de alelos de *MLIP* también determinó diferencias muy significativas entre los R y los NR para la respuesta al tratamiento con latanoprost (prueba exacta de Fisher, $p = 0.03814$). De forma que los resultados obtenidos muestran como la presencia de copias adicionales de la variante *MLIP* confiere una disminución significativamente mayor de la PIO tras el tratamiento (OR = 2.34, $p = 0.01057$) (Figura 46).

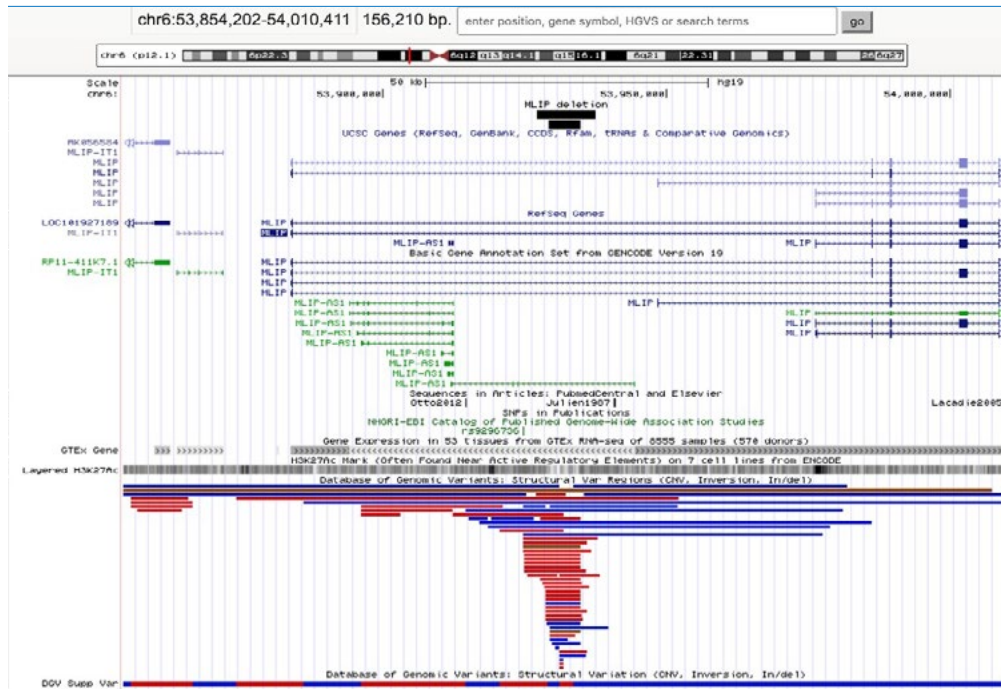


Figura 45. Contexto genómico de la CNV de *MLIP* analizada (secuencia superior, bloques sólidos negros). Se encuentra en una región intrónica del gen *MLIP* descrito en distintas bases de datos (www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3965057/UCSC) y que se corresponde con una CNV ya descrita con anterioridad en la *Database of Genomic Variants*.

***MLIP* RPG versus NRPG**

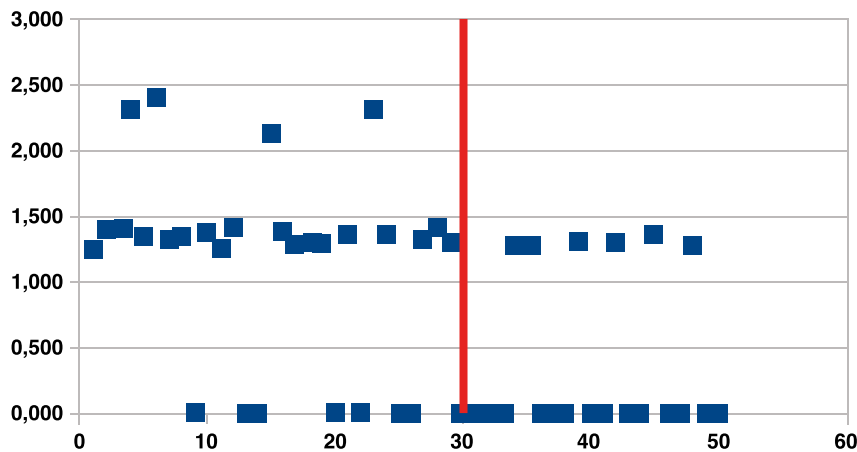


Figura 46. Estados de respuesta al uso de análogos de las prostaglandinas tóxicas (PG) en relación a la variación en los CNVs del *loci MLIP*. En la parte izquierda se localizan las muestras de respondedores (RPG), mientras que, en la derecha, separados por la línea roja vertical, se muestran los valores de las muestras de los individuos no respondedores (PNR). Se puede observar que los valores se pueden agrupar en tres categorías, que corresponden con el número de copia de este *loci* (0 copias B/B –muestras en la parte inferior de la gráfica–, 1 copia A/B –zona intermedia–, y 2 copias A/A –zona superior–). **RPG:** Respondedor a los análogos de las prostaglandinas tóxicas: latanoprost/24 horas; **NRPG:** No respondedor a los análogos de las prostaglandinas tóxicas: latanoprost/24 horas

En el análisis de la distribución del genotipo *MLIP* con relación a la eficacia de la respuesta hipotensora a los fármacos - promedio de disminución de la PIO con relación a la PIO basal - se constató que la presencia de 2 copias (A/A) en los grupos de respondedores a BL y PG fue de aproximadamente el 23,3 % (n = 2) y 33,8 % (n = 9) respectivamente, mientras que en los no respondedores a ambos fármacos en monoterapia, no se observó cualquier disminución de la PIO (n= 1). Para la presencia de 1 copia del alelo *MLIP* (A/B), se observó una disminución promedio de aproximadamente el 30,5 % (n = 21) y 30,2 % (n = 29) para el grupo de respondedores a los BL y a los PG respectivamente, y de aproximadamente un 10,2 % (n = 13) en los no respondedores a ambos fármacos en monoterapia. Los pacientes con cero copias para *MLIP* (B/B), se observó una disminución promedio de aproximadamente el 29,3 % (n = 33) y el 32,8 % (n = 20) para el grupo de respondedores a los BL y a los PG, respectivamente. Los no respondedores a ambos fármacos, con cero copias (B/B) presentaron en media una disminución de la PIO alrededor del 7,9 % (n = 7) (Tabla 8). Así, 21 pacientes (14 %) de la cohorte fueron no respondedores a ambos fármacos en monoterapia: 13 genotipo AB (1 copia), 7 genotipo BB (0 copias), y 1 genotipo AA (2 copias).

TABLA 8. Porcentaje de respuesta promedio en el descenso de la PIO entre respondedores y no respondedores en los grupos de tratamiento **BL** y **PG**, en función del genotipo para el número de copias *MLIP*.

<i>MLIP</i>	Grupo BL	Grupo PG	NR
Total n (%)	29,5 % (n = 56)	31,7 % (n = 58)	9,0 % (n = 21)
A/A	23,3 % (n = 2)	33,8 % (n = 9)	0,0 % (n = 1)
A/B	30,5 % (n = 21)	30,2 % (n = 29)	10,2 % (n = 13)
B/B	29,3 % (n = 33)	32,8 % (n = 20)	7,9 % (n = 7)

MLIP: Muscular LMNA interacting protein; **A:** 1 copia; **B:** sin copias

BL: Grupo de tratamiento con betabloqueantes tópicos: maleato de timolol

PG: Grupo de tratamiento con análogos de las prostaglandinas tópicos: latanoprost

NR: No Respondedores a ningún tratamiento en monoterapia

(%): Media de reducción de la PIO en porcentaje

n: Número de individuos

Así, la disminución de la PIO en respuesta al tratamiento mediante betabloqueantes tópicos (BL, maleato de timolol) varía en función del número de copias de *MLIP*, de forma que los individuos con números de copia más altos (genotipo A/A: 2 copias para el gen) tienden a tener una disminución porcentual menor de la PIO, mientras que la respuesta media es mayor entre los individuos con una (A/B) o cero copias (B/B) de *MLIP*. En relación a la respuesta hipotensora de los individuos tratados con análogos de las prostaglandinas tópicos (PG), se observó una respuesta promedio más baja en términos de disminución relativa de la PIO, en individuos con menor número de copias (A/B y B/B) (Figura 47).

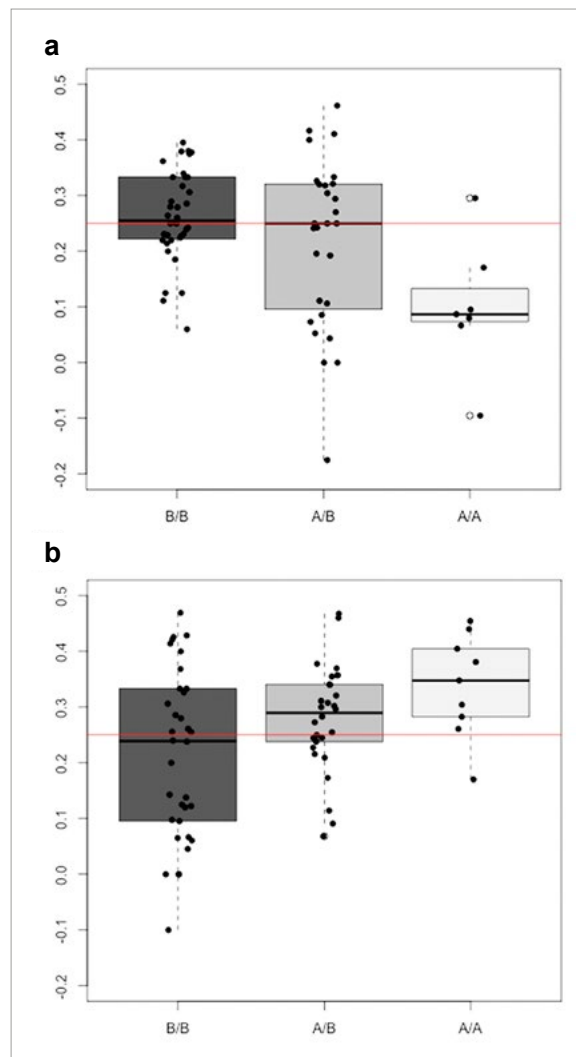


Figura 47. Correlación entre el número de copias del *locus MLIP* y la respuesta en cuanto a disminución de la PIO al maleato de timolol **(a)** y al latanoprost **(b)**. Los diagramas de caja en cada panel muestran la distribución porcentual de disminución de la PIO para individuos (puntos negros) agrupados de acuerdo con su genotipo *MLIP* (B: sin copia; A: 1 copia). La línea roja horizontal marca un descenso del 25 % en la PIO que diferencia los respondedores de los que no responden a un tratamiento específico.

7.2.3 Estudio de probabilidad de respuesta en relación al *locus* estudiado (MLIP)

Se procedió a realizar un estudio de probabilidad de respuesta relacionada al CNV de *MLIP*, en los dos grupos estudiados (BL y PG), e intentar establecer una estimación de eficacia de respuesta en cada grupo.

Para ello se calcularon los valores globales de respuesta pronosticados para ambos grupos terapéuticos sin tener en cuenta el genotipo (Figura 48) y relacionados con el número de copias para el gen *MLIP* (Figura 48). Se observa claramente que los genotipos AA (presencia de 2 copias) determinan una probabilidad de mejor respuesta al latanoprost (grupo PG) de casi el 90 % (y sólo un 25% en los tratados con maleato de timolol, grupo BL), mientras que un genotipo BB (ausencia de copias) se asocia a una probabilidad de una mejor respuesta al maleato de timolol (grupo BL), de casi el 70 % (siendo inferior al 50% a los tratados con latanoprost, grupo PG) (Figura 48).

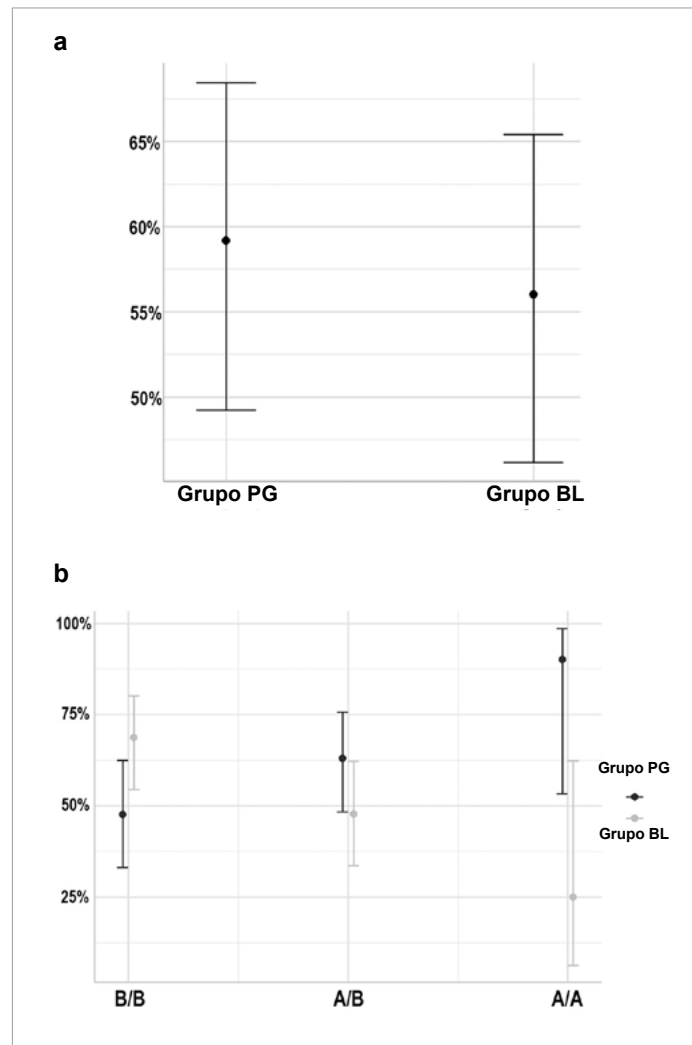


Figura 48. Probabilidad de respuesta: **(a)** Probabilidad general de respuesta para ambos grupos terapéuticos PG (latanoprost) y BL (maleato de timolol). **(b)** Probabilidad de respuesta relacionada con el número de copias (CNV), genotipando B/B (no copias), A/B (1 copia alelo) y AA (2 copias alelo), para el *locus* *MLIP* y los grupos terapéuticos.

7.3. Aproximación práctica de los resultados

Con el objetivo de incrementar la probabilidad de respuesta terapéutica en términos de eficacia, basándonos en los resultados obtenidos en nuestro estudio, si establecemos un cálculo *a priori* sobre la eficacia mediante dicha estrategia, se ha visto que si aplicásemos una estrategia al azar en nuestra cohorte basándonos en los resultados obtenidos, la probabilidad de respuesta terapéutica en términos de eficacia puede ser del 50 % si no tuviésemos en cuenta el genotipo y, en caso de tenerlo en cuenta, en base a una estrategia guiada podría acercarse al 70 % (Tabla 9).

TABLA 9. Probabilidad de eficacia terapéutica guiada por el genotipo estudiado del individuo candidato a ser tratado, previo al inicio del tratamiento hipotensor mediante análogos de prostaglandinas tópicas (latanoprost), y con betabloqueantes tópicos (maleato de timolol), atendiendo al número de copias del alelo *MLIP*.

Genotipo		Frecuencia población	
AA	12	8,9 %	
AB	63	46,7 %	
BB	60	44,4 %	
Total		100,0 %	
Estrategia azar (n = 1000)			
PG (n = 500)		Eficacia según Figura 48a	Individuos Respondedores
AA	44	59,0 %	295
AB	233		
BB	222		
BL (n = 500)		Eficacia según Figura 48a	Individuos Respondedores
AA	44	56,0 %	280
AB	233		
BB	222		
		Eficacia	57,5 %
Estrategia guiada (n = 1000)			
Genotipo - Tratamiento		Eficacia según Figura 48b	Individuos Respondedores
AA - PG	88	90,0 %	79
AB - PG	466	62,5 %	291
BB - BL	444	70,0 %	311
			681
		Eficacia	68,1 %



8. Discusión

8. DISCUSIÓN

El tratamiento médico actual de enfermedades crónicas como son el glaucoma y la hipertensión ocular, requiere de un abordaje tanto a nivel individual, como socio-sanitario, con unas características especiales. Cada uno de los fármacos utilizados debe cumplir tres requisitos fundamentales tales como, que sea eficaz en cuanto al control de la presión intraocular, que tenga una buena tolerancia tópica y/o sistémica y, a su vez, que pueda permitir un buen cumplimiento por parte del paciente en la aplicación de la terapia prescrita (EGS, 2014, 2017b). Cuando se consigue esta asociación, podemos decir que la respuesta terapéutica está bien orientada, y que las posibilidades de una buena evolución clínica del glaucoma o de la hipertensión ocular son altas y, por tanto, con escasas previsiones de deterioro o bien de pérdida de agudeza visual y de campo visual de forma irreversible. Un paciente que cumpla bien con la dosificación prescrita de la terapia crónica para el glaucoma o bien hipertensión ocular, y no presente efectos adversos, podemos considerar que la eficacia terapéutica se basará mayoritariamente al efecto hipotensor conseguido. Pero desafortunadamente, tenemos la evidencia clínica, que no todos los individuos tienen la misma respuesta hipotensora ante un mismo principio activo, por lo que no puede confiarse el control evolutivo del glaucoma o bien de la hipertensión ocular de forma uniforme a todos los pacientes y, siempre debe estar sujeto a un control tensional que confirme o no el efecto hipotensor deseado.

La importancia en la respuesta terapéutica en el glaucoma y también en la hipertensión ocular deriva de sus posibles consecuencias en el caso de no conseguirse, dado que la mayor implicación reside en la alteración de la función visual, pudiendo debutar con una pérdida de campo visual que resulte asintomática para el paciente y, progresar hasta comprometer la visión central, pudiendo llegar a la pérdida total de la visión en caso de no realizarse un diagnóstico y tratamiento que puedan modificar la evolución natural de la enfermedad (Leske MC et al, 2003; Harwerth RS et al, 2007; Varma R et al, 2011).

La terapia médica, constituye uno de los pilares fundamentales del tratamiento del glaucoma y de la hipertensión ocular, siendo los betabloqueantes tópicos y los análogos de las prostaglandinas tópicos los de primera línea en cuanto al efecto hipotensor que se les atribuye y, a su vez, son bien conocidos los efectos colaterales de los mismos (Zhang W et al, 2001; EGS, 2014, 2017b). Pero además, la comercialización de ambos productos, desde hace varias décadas, ha permitido definir efectos adversos post comercialización, con una información más detallada en cuanto a incidencia de presentación en relación con individuos afectados por población, y han podido ser clasificados en muy frecuentes (≥ 1 en 10 casos), frecuentes ($\geq 1/100$ y $< 1/10$), poco frecuentes ($\geq 1/1.000$ y $< 1/100$), raros ($\geq 1/10.000$ y $< 1/1000$), muy raros ($< 1/10.000$) y no conocidos. Se han notificado casos de trastornos

que, aunque poco frecuentes, su afectación sobre órganos vitales, así como los trastornos asociados, les confiere una atención especial (AEMPS, www.aemps.gob.es)(EMA, www.ema.europa.eu).

Es conocido que el uso de análogos de las prostaglandinas tópicas como el latanoprost, puede comportar un cambio gradual del color de los ojos al aumentar la cantidad de pigmento en el iris, debido a un aumento del contenido de melanina en los melanocitos del estroma iridiano y no a un aumento en el número de melanocitos (Linden C and Alm A, 1999). En el supuesto de un tratamiento monocular, puede resultar una heterocromía permanente e irreversible. Este cambio en el color de los ojos se ha observado fundamentalmente en pacientes con iris de coloración mixta (azul-marrón, gris-marrón o verde-marrón) y suele presentarse en los primeros meses del tratamiento con una incidencia del 33 %, pudiendo ser de hasta el 85 % en iris de coloración mixta (Aptel F et al, 2008). También se ha observado una hipercoloración de la piel periorbitaria, pudiendo no ser permanente tras la suspensión del fármaco (Inoue K et al, 2012). El ojo en ocasiones adquiere un aspecto enoftálmico debido a la pérdida de tejido graso periorbitario atribuible al uso de análogos de las prostaglandinas tópicas (Eyawo O et al, 2009).

En caso de antecedentes de infección herpética ocular, el uso de análogos de las prostaglandinas tópicas, puede provocar una recidiva de la misma (AEMPS, www.aemps.gob.es) (EMA, www.ema.europa.eu). También se ha visto una mayor incidencia de edema macular quístico, con severos cambios estructurales en la zona de máximo potencial visual de la retina, como es la mácula, y que puede mejorar espontáneamente al interrumpir el uso del fármaco, aunque en algunos casos se requiera un tratamiento coadyuvante (Hu J et al 2020). También se ha descrito como los análogos de las prostaglandinas tópicas pueden cambiar gradualmente el crecimiento de las pestañas, el vello del párpado del ojo tratado y zonas circundantes en la zona malar; estos cambios incluyen el incremento de la longitud, del grosor, de la pigmentación y de la cantidad de pestañas y del vello palpebral, así como un crecimiento desviado de las mismas que puede suponer un discomfort al paciente. Los cambios en las pestañas son reversibles una vez se interrumpe el tratamiento (Honrubia F et al, 2009). En los ensayos de producto previos a su comercialización, se atribuía a los análogos de las prostaglandinas un mayor potencial de efectos adversos locales, y muy escasos sistémicos (Watson PG, 1998). Pero en la experiencia clínica post comercialización, se han notificado casos de trastornos que, aunque poco frecuentes, su implicación en órganos vitales, les confiere una atención especial. Trastornos cardíacos como palpitaciones, angina inestable (Mitra M et al, 2001), y respiratorios tales como exacerbación de asma, disnea, dolor torácico (Hedner J et al, 1999); así como musculoesqueléticos y del tejido conectivo como mialgia y artralgia (https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/55236/55236_ft.pdf).

En relación al uso de betabloqueantes tópicos como el maleato de timolol, es conocida la incidencia de reacciones adversas de índole general después de la administración oftálmica tópica, aunque suele ser más baja que para la administración sistémica (AEMPS, www.aemps.gob.es).

aemps.gob.es)(EMA, www.ema.europa.eu). Así, están descritos trastornos psiquiátricos como depresión, aunque poco frecuentes (Wang SY et al, 2012); trastornos del sistema nervioso como cefalea (frecuentes) y también mareo y síncope (poco frecuentes); trastornos cardíacos, como bradicardia (poco frecuentes) y también dolor torácico y palpitaciones (raras) (Leier CV et al, 1986); trastornos respiratorios, torácicos y mediastínicos, como disnea (poco frecuentes) (Jones FL and Ekberg NL, 1979); trastornos gastrointestinales como náuseas, dispepsia (poco frecuentes); trastornos generales como astenia y fatiga (poco frecuentes) (https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/55236/55236_ft.pdf).

Son ampliamente conocidos los trastornos oculares por el uso continuado de betabloqueantes tópicos con signos y síntomas de irritación ocular, incluyendo blefaritis, queratitis, sensibilidad corneal disminuida, y ojo seco, alteraciones constatadas clínicamente de forma frecuente, mientras que otros trastornos visuales como cambios refractivos son poco frecuentes y, mucho más raros, ptosis y diplopia (AEMPS, www.aemps.gob.es)(EMA, www.ema.europa.eu).

Además, ambos principios activos utilizados en patologías crónicas como es el glaucoma y la hipertensión ocular, están relacionados con alteraciones en la superficie ocular (Leung EW et al, 2008; Rossi GC et al, 2013), que es sabido pueden condicionar futuros tratamientos como las diferentes modalidades quirúrgicas para el control de la enfermedad (Baudouin C, 1996; Baudouin C et al, 1999) pudiendo influir negativamente en los resultados quirúrgicos al aumentar la tasa de fracasos, llegándose incluso a considerar glaucomas refractarios por las malas condiciones conjuntivales previas a la cirugía que se observa tras el uso prolongado de estos fármacos (Saini M et al, 2017). Estudios histopatológicos han confirmado que los efectos tóxicos en la superficie corneo-conjuntival inducidos por fármacos instilados tópicamente, pueden inducir una inflamación crónica, como lo demuestra la presencia de infiltrados inmunes e inflamatorios en ojos politratado. El origen de la inflamación tópica aún no se ha determinado claramente, pero un componente común de los fármacos oftálmicos, el cloruro de benzalconio utilizado como conservante en casi todas las preparaciones hipotensoras tópicas, ha mostrado una fuerte evidencia de toxicidad (Baudouin C et al, 1999; Malvitte L et al, 2007).

Igualmente, no se debe desestimar el compromiso de la calidad de vida y del coste asociado a un tratamiento crónico (Stalmans I et al, 2020).

En cuanto a la eficacia terapéutica, la correlación entre la esperada y la encontrada, no siempre coincide y, en nuestro estudio, se ha encontrado que el perfil genético de cada individuo, puede explicar variaciones de respuesta para un mismo fármaco entre diferentes pacientes que lo aplican. Si además, consideramos los diferentes grados de tolerancia individual del fármaco, tanto a nivel tópico como sistémico, con los potenciales efectos adversos descritos para cada familia farmacológica, y si sumamos el gran esfuerzo que supone un buen cumplimiento diario por parte del paciente, con la consiguiente conciliación enfermedad – vida laboral – coste económico, podemos entrever que deberíamos apartarnos de prescripciones farmacológicas lineales y avanzar hacia una medicina personalizada, con

amplios beneficios tanto en el ámbito individual como social y colectivo (Skalicky SE et al, 2012; Quaranta L et al, 2016).

El concepto actual de medicina personalizada nos lleva a anticipar el perfil de respuesta del paciente antes de iniciar la terapia tópica, así como a evitar reacciones adversas sistémicas y/o locales indeseables posteriores, que pueden llegar a ser desde leves a graves para cada uno de los grupos farmacológicos (Cramer JA, 2002; Korte JM et al, 2002; Schwartz GF and Quigley HA, 2008; Quaranta L et al, 2016).

Análisis genómicos recientes, han revelado genes importantes que están implicados en la fisiopatología del glaucoma. Algunos de ellos están comenzando a definir vías y procesos biológicos relevantes que podrían ser objeto para futuras terapias (Wiggs JL and Pasquale LR, 2017; Shiga Y et al, 2018). Además, se han descrito variantes genéticas que contribuyen a explicar diferencias en cuanto a eficacia del tratamiento, y que podrían mejorar el pronóstico y la progresión de la enfermedad, minimizando los efectos secundarios farmacológicos y, haciendo realidad la tan deseada medicina personalizada en el tratamiento de enfermedades actualmente crónicas como el glaucoma.

Conocedores de la importancia de la aplicabilidad clínica de los recientes hallazgos en cuanto a la búsqueda de biomarcadores genéticos, son muchos los estudios que van apareciendo en diferentes patologías, y que intentan avanzar en poder conocer correlaciones fármaco – respuesta, en función del perfil genético individual. Así, se ha relacionado el enzima citocromo P450-2D6 (CYP2D6) con el potencial de respuesta de hasta un 25 % de los fármacos más comúnmente utilizados, y hay estudios genéticos que han revelado más de 100 alelos distintos permitiendo establecer una Guía de Farmacoterapia según el estatus CYP2D6, en 1-4 fenotipos metabólicos: ultra-rápido, intenso, intermedio, y pobre (Owen RP et al, 2009), que a su vez, se ha podido relacionar con la respuesta esperada, con la consiguiente aplicabilidad translacional en la práctica clínica diaria (McCarty CA et al, 2008).

Como ejemplo, la warfarina, uno de los antagonistas de la vitamina K más prescritos a nivel mundial para el control del riesgo hemorrágico, en el que se han descrito más de 50 citocromos P450, con diferentes enzimas y alelos CYP2C, constatando cómo el CYP2C9 está implicado en la variabilidad interindividual en la dosis warfarina y el consiguiente riesgo hemorrágico (Danese E et al, 2019). Es conocido el gran impacto social que ha tenido el ajuste de dosis de anticoagulantes en base a los diferentes fenotipos metabólicos que pueden constatarse en cada individuo (<https://www.pharmgkb.org/chemical/PA451906>).

Recientemente, varios autores han tratado de dilucidar una base genética de la respuesta farmacológica al tratamiento del glaucoma. Por ejemplo, se ha descrito una asociación entre los SNP de los genes *PTGFR* y *SLCO2A1* y una respuesta diferente al latanoprost en una cohorte de pacientes chinos con glaucoma. El estudio concluyó que dos SNP (rs4241366 en el gen *SLCO2A1*, y rs3766355 en *PTGFR*) se correlacionaron con una buena respuesta al latanoprost, a corto y largo plazo (Zhang P et al, 2016). Más recientemente, el genotipa-

do de una cohorte de pacientes mediterráneos con glaucoma primario de ángulo abierto, ha identificado cinco SNP relacionados con la respuesta al latanoprost. Los SNP del gen *PTGFR* se asociaron con una buena respuesta (rs6686438, rs10786455) mientras que en otros (rs3753380, rs6672484, rs11578155) se constató una respuesta deficiente al mismo fármaco. Curiosamente, el SNP rs3753380 del gen *PTGFR* ya se había relacionado con una respuesta pobre al latanoprost en una población japonesa sana (Sakurai M et al, 2007; Sakurai M et al, 2014). Además, el gen *MMP-1* también se relacionó con una respuesta refractaria para este fármaco (Ussa F et al, 2015).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran un enfoque eficiente para la identificación de posibles biomarcadores de predisposición genética para la respuesta farmacológica en glaucomas primarios de ángulo abierto y en hipertensión ocular. El cribado inicial mediante el estudio de mezclas de ADN, analizados de forma equimolar, de pacientes fenotipados con criterios de inclusión estrictos y, con posterior validación individual en una cohorte más amplia, ha demostrado ser efectivo. En este sentido, para que esta estrategia de estudio tenga éxito, independientemente de los posibles enfoques de secuenciación genética de alto rendimiento, es crucial optimizar rigurosamente los criterios clínicos de los pacientes para optimizar el fenotipado en grupos muy homogéneos, basándose principalmente en una evaluación clínica donde se usen parámetros objetivos y selectivos, a fin de no introducir sesgos en la interpretación de los resultados. Con este fin, se establecieron criterios de consenso para la respuesta al tratamiento tópico de glaucoma primario de ángulo abierto e hipertensión ocular (EGS, 2014), así como criterios de exclusión amplios y específicos, para alcanzar la homogeneidad de la respuesta para los grupos de estudio. Además, la reasignación de pacientes que no respondieron al tratamiento inicial, después del período de lavado adecuado, no solo refleja la práctica clínica habitual, sino que también permitió un aumento en el número de las respuestas clínicas en nuestra cohorte.

Desde el punto de vista metodológico, constatamos que la utilización de un *microarray* de alta resolución para hibridar el grupo de ADN respondedor contrastado con el grupo de ADN no respondedor, facilita la confección de pools o agrupaciones, que permiten la identificación y determinación de posibles CNVs. Asimismo, la técnica del MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*), mediante la preparación de una mezcla personalizada de sondas en la fase de validación de los hallazgos, nos permitió analizar una cohorte extendida de pacientes respondedores y no respondedores para cada uno de los fármacos estudiados. Para ello, partimos de un cribado de 353 posibles candidatos, de los cuales tuvimos que excluir 128 individuos, ajustándonos a los criterios de inclusión del estudio y realizando una minuciosa evaluación clínica para el fenotipado. Ello nos permitió identificar una CNV que afecta una región intrónica del gen *MLIP*, como un posible biomarcador de respuesta al tratamiento del glaucoma. *MLIP* (*Muscular LMNA-Interacting Protein; Muscular-Enriched A-Type Laminin-Interacting Protein*; Proteína de Interacción con Laminina-A enriquecida en los Músculos; NCBI Entrez Gene: 90523; OMIM: 614106) es un gen codificado en el brazo corto del cromosoma 6, el producto del cual interacciona con la laminina-A muscular (codificada por el gen *LMNA*), un componente estructural de la lámina nuclear que es conocido

por su relación con la miocardiopatía dilatada familiar (Ahmady E et al, 2011; Cattin ME et al, 2015; Esslinger U et al, 2017). El gen *MLIP* se ha propuesto como un regulador clave de la miocardiopatía hipertrófica y tiene potencial como objetivo terapéutico para atenuar la progresión de la insuficiencia cardíaca (Cattin ME et al, 2015; Huang ZP et al, 2015). En humanos, *MLIP* se expresa en el corazón, músculo liso y esquelético, con una expresión débil en el hígado y sin expresión en otros tejidos humanos examinados (Huang ZP et al, 2015). Además, hay alguna evidencia sobre su expresión en el cuerpo ciliar del ojo humano (Cattin ME et al, 2015; Cattin ME et al, 2018). La región de 5,6 Kb que identificamos se superpone con una variante conocida de número de copia polimórfica (MacDonald JR et al, 2014) y se encuentra dentro del intrón 1 del gen RefSeq *MLIP* (número de acceso NM_138569). Curiosamente, coincide con un ARN largo no codificante (lncRNA) recientemente descrito, denominado *MLIP-AS1*. Inicialmente se pensaba que los lncRNA podrían tratarse de “ruido transcripcional”. Sin embargo, hay evidencias que demuestran una expresión regulada de los lncRNA en determinados contextos, como por ejemplo durante los eventos de diferenciación de células progenitoras embrionarias y también en tejidos adultos (Beermann J et al, 2016). Asimismo, se ha postulado que los lncRNA podrían estar involucrados en procesos reguladores de la función celular, tales como la modificación de la cromatina, la regulación transcripcional, la regulación postranscripcional, entre otros (Mercer TR et al, 2009). Por lo tanto, no se puede descartar que la ausencia o modificaciones de este posible elemento regulador, pueda conducir a un fallo o alteración de regulación del gen *MLIP*, y con ello, interferir en la respuesta de los fármacos hipotensores a nivel ocular. Además, se ha visto que los patrones de empalme alternativos del ARNm de *MLIP*, pueden definir regiones versátiles y estables de la proteína, que probablemente contribuyen para modular las interacciones y funciones de *MLIP* en los diferentes tejidos (Cattin ME et al, 2018). En la región codificada del intrón de *MLIP*, es donde encontramos las diferencias entre los respondedores y no respondedores a los tratamientos hipotensores estudiados. Esta, podría actuar como un elemento regulador de respuesta, pero no disponemos de estudios funcionales adicionales, que determinen una vinculación con la proteína correspondiente. Una aproximación que consideramos novedosa en nuestro estudio, es el poder comparar el grupo de respondedores *versus* no respondedores dentro de la metodología del estudio.

Nuestros resultados también mostraron que la respuesta al tratamiento farmacológico estuvo influenciada en gran medida por el genotipo encontrado, de forma que los pacientes con un mayor número de copias de *MLIP* exhibieron una mejor respuesta al latanoprost (OR = 2.3) y, al mismo tiempo, presentaron una peor respuesta al maleato de timolol. Por otro lado, los pacientes con menos número de copias, exhibieron una buena respuesta a los betabloqueantes. Este interesante hallazgo nos llevó a plantear la hipótesis de que los dos tipos de drogas actúan en diferentes vías. A su vez, cuando relacionamos la probabilidad de respuesta con el número de copias de *MLIP*, pudimos prever una posibilidad de respuesta de hasta un 90 % en el grupo de los análogos de las prostaglandinas tópicas cuando se dispone de 2 copias de alelo (genotipo AA) y de casi un 70 % de respuesta en el grupo de los betabloqueantes tópicos, en ausencia o en presencia de una sola co-

pia (genotipo B). Estos hallazgos nos permiten interpretar que se puede disponer de una información previa orientativa antes del inicio de un tratamiento hipotensor tópico que se plantea como crónico. Esta aproximación no solamente podría ayudar a optimizar el tiempo de control de la enfermedad, sino que también para evitar los posibles efectos adversos en aquellos individuos que se perfilan como no respondedores. No obstante, hubo 21 pacientes (14 %) que no respondieron a ninguno de los fármacos estudiados, por lo menos bajo un régimen de monoterapia y que mayoritariamente presentaban un genotipo B.

Como se mencionó, evidencias anteriores sugieren que el gen *MLIP* podría estar involucrado en la fisiopatología de determinadas alteraciones a nivel cardíaco. En un modelo experimental murino donde se suprimió el gen *MLIP*, no se pudo observar un impacto significativo en la función o estructura cardíaca, pero sí condujo a anomalías metabólicas específicas del miocardio sobre la vía de señalización clave; se ha observado una sobreactivación específica de Akt que, a su vez, fue inhibida por la sobreexpresión inducida de *MLIP* específica cardíaca (Cattin ME et al, 2015). Curiosamente, la ruta de fosfoinositol-3 quinasa (PI-3 quinasa; PI3K) / Akt, promueve la supervivencia y la neuroprotección en las neuronas al inhibir la Bcl-2 proapoptótica. Se ha demostrado que una variedad de medicamentos neuroprotectores que actúan a través de diferentes mecanismos, reducen la pérdida de células ganglionares de la retina y el daño estructural inducido por un aumento de la PIO, a través de la vía PI3K/Akt, entre ellos, los análogos de las prostaglandinas (Gauthier AC and Liu J, 2017). En este sentido, ya conocemos la acción de los mismos en facilitar el drenaje del humor acuoso a través de la vía uveoescleral, actuando sobre las metaloproteinasas al degradar la matriz extracelular, y así facilitando la salida del humor acuoso por la vía uveoescleral, lo que induce una disminución de la presión intraocular (Denis P et al, 2007). Por lo tanto, no se puede descartar la participación de *MLIP* y la vía de señalización de Akt en la respuesta de la presión intraocular, así como en los mecanismos neuroprotectores sobre el nervio óptico y sobre las diferentes poblaciones de células de la retina. Estudios futuros podrían aclarar la activación de proteínas en la vía de señalización PI3K/Akt y Akt/mTOR (mammalian target of rapamycin) en el músculo ciliar o en la malla trabecular en pacientes con diferentes genotipos de CNV para *MLIP*.

Hasta la fecha, no se conocen genes o elementos reguladores que se vean afectados por la región CNV ubicados en la banda *1p31*. El gen más cercano es *NEGR1* (*Neuronal Growth Regulator 1*; Regulador de Crecimiento Neuronal Humano 1), ubicado a una distancia de varias kb por encima de la CNV en la región intrónica *MLIP*, relacionada con la respuesta a las prostaglandinas. Mediante secuenciación masiva, el gen *NEGR1* se ha asociado con una gran cantidad de fenotipos complejos, tales como el índice de masa corporal/aumento de peso, fenotipo hemostático, inmunidad, retraso del desarrollo, entre muchos otros (Speakman JR, 2013; Singh K et al, 2019). No se ha demostrado un posible efecto fisiológico de estos CNV en la expresión de este gen o de cualquier otro y, por lo tanto, sacar conclusiones para una eventual relación con el fenotipo estudiado podría ser arriesgado en vista de la evidencia existente.

Los avances observados sobre el conocimiento en el ámbito de la farmacogenética y su posible aplicación terapéutica han conducido a una serie de esfuerzos recientes a fin de facilitar su utilización clínica a mayor escala. Dichas intervenciones guiadas por el genotipo ya están incorporadas en varias guías clínicas para una gran cantidad de patologías y fármacos prevalentes. Aunque los tests farmacogenéticos con finalidades clínicas no se adoptan ampliamente en oftalmología, se podrían usar enfoques simples y rápidos para guiar las decisiones terapéuticas. Así, el presente estudio puede ser considerado como un primer paso hacia la mejora de la terapia farmacológica crónica en el glaucoma con medicamentos que, si bien tienen una eficacia reconocida, no están exentos de los efectos colaterales y trastornos que en algunos casos pueden ser graves. Específicamente, nuestros resultados muestran que es posible administrar el fármaco apropiado al paciente, mediante un enfoque guiado por el genotipo. Ello, además de ser una aproximación muy prometedora, contribuye para un mejor resultado clínico y pronóstico de la patología, así como para disminuir los posibles efectos secundarios adversos. Con base a nuestros resultados, se podría sugerir en un primer enfoque terapéutico inicial el tratamiento hipotensor con análogos de las prostaglandinas en aquellos pacientes que presentan al menos 1 copia (genotipo A), e indicar los betabloqueantes para los pacientes con ausencia de copias (genotipo BB) de alelos *MLIP*.

El poder conocer previamente el potencial de respuesta hipotensora de los betabloqueantes tópicos y los análogos de las prostaglandinas tópicos, puede evitar efectos indeseables tópicos y sistémicos de gran repercusión en relación con la salud y calidad de vida del paciente, en caso que no se prevea una eficacia terapéutica atendiendo al número de copias de *MLIP*. La aproximación realizada desde el conocimiento individual de respuesta atendiendo al perfil genético de cada individuo, se muestra como una buena alternativa de cara a una deseada medicina personalizada en patologías crónicas como es el glaucoma y la hipertensión ocular. Nuestros resultados mejoran la comprensión de como los factores genéticos que pueden afectar y contribuir a la respuesta farmacológica del tratamiento del glaucoma y, proporcionan nuevos conocimientos sobre la arquitectura genética y las vías involucradas en patologías como el glaucoma primario de ángulo abierto y en la hipertensión ocular. Sin embargo, todavía estamos lejos de demostrar la utilidad clínica de este hallazgo, y serán necesarios ensayos clínicos sólidos para lograr suficiente evidencia antes de hacer la transición de este conocimiento al entorno clínico.

Se requiere más investigación con cohortes más grandes y bien caracterizadas para definir completamente la contribución genética al glaucoma, un paso necesario antes de que se puedan lograr pruebas farmacogenéticas completas, así como para aclarar la contribución eventual de *MLIP* en la respuesta al tratamiento para pacientes que presenten glaucoma primario de ángulo abierto o bien hipertensión ocular, y sean candidatos a recibir tratamiento.



9. Conclusiones

9. CONCLUSIONES

Con base a nuestros hallazgos podemos concluir que:

1. El gen *MLIP* se perfila como un buen biomarcador genético para prever la respuesta terapéutica farmacológica para los análogos de las prostaglandinas (latanoprost) y los betabloqueantes (maleato de timolol), de uso tópico, en la terapia médica del glaucoma primario de ángulo abierto y de la hipertensión ocular.
2. El número de copias de *MLIP*, está relacionado con la respuesta terapéutica de los análogos de las prostaglandinas (latanoprost) y de los betabloqueantes (maleato de timolol).
3. Los individuos con 2 copias de *MLIP*, presentan una mejor respuesta hipotensora a los análogos de las prostaglandinas (latanoprost), y tienden a tener una mayor disminución de la presión intraocular porcentualmente tras el tratamiento.
4. Los individuos con 1 o ninguna copia de *MLIP*, presentan a su vez, una discreta o pobre respuesta hipotensora a los análogos de las prostaglandinas (latanoprost) con una disminución de la presión intraocular porcentual poco satisfactoria.
5. Los individuos con 1 o ninguna copia de *MLIP*, presentan una mejor respuesta hipotensora a los betabloqueantes (maleato de timolol), y tienden a tener una mayor disminución de la presión intraocular porcentualmente tras el tratamiento.



10. Bibliografía

10. BIBLIOGRAFÍA

A

Ahmady E, Deeke SA, Rabaa S, Kouri L, Kenney L, Stewart AFR, et al. **Identification of a novel muscle A-type lamin-interacting protein (MLIP).** *J Biol Chem.* 2011; 286(22):19702-19713.

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. <http://www.aemps.gob.es/>.

AGIS, The advanced glaucoma intervention study: 7. **The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators.** *Am J Ophthalmol* 2000; 130:429- 440.

Anderson DR. **Introductory comments on blood flow autoregulation in the optic nerve head and vascular risk factors in glaucoma.** *Surv Ophthalmol.* 1999; 43 (Suppl 1):S5-9.

Anderson DR, Drance SM, Schulzer M. **Factors that predict the benefit of lowering intraocular pressure in normal tension glaucoma.** *Am J Ophthalmol.* 2003; 136(5):820-9.

Antón A, Andrada MT, Mujica V, Calle MA, Portela J, Mayo A. **Prevalence of primary open-angle glaucoma in a Spanish population: the Segovia study.** *J Glaucoma.* 2004; 13(5):371-6.

Aptel F, Cucherat M, Denis P. **Efficacy and tolerability of prostaglandin analogs: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials.** *J Glaucoma.* 2008; 17(8):667-73.

B

Baudouin C. **Mechanisms of failure in glaucoma filtering surgery: a consequence of antiglaucomatous drugs?** *Int J Clin Pharmacol Res.* 1996; 16(1):29-41.

Baudouin C, Pisella PJ, Fillacier K, Goldschild M, Becquet F, De Saint Jean M, et al. **Ocular surface inflammatory changes induced by topical antiglaucoma drugs: human and animal studies.** *Ophthalmology.* 1999; 106(3):556-63.

Beermann J, Piccoli MT, Viereck J, Thum T. **Non-coding RNAs in development and disease: background, mechanisms, and therapeutic approaches.** *Physiol Rev.* 2016; 96(4):1297-1325.

Bonomi L, Marchini G, Marraffa M, Bernardi P, De Franco I, Perfetti S, et al. **Prevalence of glaucoma and intraocular pressure distribution in a defined population: the Egna-Neumarkt Study.** *Ophthalmology.* 1998; 105(2):209-15.

Brandt JD, Beiser JA, Kass MA, Gordon MO. **Central corneal thickness in the Ocular Hypertension Treatment Study (OHTS).** *Ophthalmology.* 2001; 108(10):1779-88.

Brooks AM, Gillies WE. **Ocular beta-blockers in glaucoma management. Clinical pharmacological aspects.** *Drugs Aging.* 1992;2(3):208-21.

Burr JM, Mowatt G, Hernandez R, Siddiqui MA, Cook J, Lourenco T, et al. **The clinical effectiveness and cost-effectiveness of screening for open angle glaucoma: a systematic review and economic evaluation.** *Health Technol Assess.* 2007; 11(41):1-190.

C

Camras CB, Hedman K; **US Latanoprost Study Group.** **Rate of response to latanoprost or timolol in patients with ocular hypertension or glaucoma.** *J Glaucoma.* 2003; 12(6):466-9.

Castro-Giner F, Bustamante M, Ramon González J, Kogevinas M, Jarvis D, Heinrich J, et al. **A pooling-based genome-wide analysis identifies new potential candidate genes for atopy in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS).** *BMC Med Genet.* 2009; 10:128.

Cattin ME, Wang J, Weldrick J, Roeske C, Mak E, Thorn S, et al. **Deletion of *MLIP* (muscle-enriched A-type lamin-interacting protein) leads to cardiac hyperactivation of Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) and impaired cardiac adaptation.** *J Biol Chem.* 2015; 44(290):26699-26714.

Cattin ME, Deeke SA, Dick SA, Verret-Borsos ZJA, Tennakoon G, Gupta R, et al. **Expression of murine muscle-enriched A-type lamin-interacting protein (*MLIP*) is regulated by tissue-specific alternative transcription start sites.** *J Biol Chem.* 2018; 293(51):19761-19770.

CNTGS, Collaborative Normal Tension Glaucoma Study. **Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal-tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures.** *Am J Ophthalmol* 1998a; 126(4):487-97.

CNTGS, Collaborative Normal Tension Glaucoma Study. **The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma.** *Am J Ophthalmol* 1998b; 126(4):498-505.

Colaianni V, Mazzei R, Cavallaro S. **Copy number variations and stroke.** *Neurol Sci.* 2016; 37(12):1895-1904.

Conlon R, Saheb H, Ahmed II. **Glaucoma treatment trends: a review.** *Can J Ophthalmol.* 2017; 52(1):114-124.

Cramer JA. **Effect of partial compliance on cardiovascular medication effectiveness.** *Heart.* 2002; 88(2):203-6.

D

Dada T, Sihota R, Gadia R, Aggarwal A, Mandal S, Gupta V. **Comparison of anterior segment optical coherence tomography and ultrasound biomicroscopy for assessment of the anterior segment.** *J Cataract Refract Surg.* 2007; 33(5):837-40.

Danese E, Raimondi S, Montagnana M, Tagetti A, Langaee T, Borgiani P. et al. **The effect of *CYP4F2*, *VKORC1* and *CYP2C9* in influencing coumarin dose. A single patient data meta-analysis in more than 15,000 individuals.** *Clin Pharmacol Ther.* 2019; 105(6):1477-1491.

Davanger M, Ringvold A, Blika S, Elsas T. **Frequency distribution of IOP. Analysis of a material using the gamma distribution.** *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1991; 69(5):561-4.

Denis P, Lafuma a, Khoshnood B, Mimaud V, Berdeaux G. **A meta-analysis of topical prostaglandin analogues intra-ocular pressure lowering in glaucoma therapy.** *Curr Med Res Opin*. 2007; 23(3):601-8.

De Cid R, Riveira-Munoz E, Zeeuwen PL, Robarge J, Liao W, Dannhauser EN, et al. **Deletion of the late cornified envelope LCE3B and LCE3C genes as a susceptibility factor for psoriasis.** *Nature genetics*. 2009; 41(2):211-5.

De Moraes CG, Liebmann JM, Greenfield DS, Gardiner SK, Ritch R, Krupin T; **Low-pressure Glaucoma Treatment Study Group. Risk factors for visual field progression in the low-pressure glaucoma treatment study.** *Am J Ophthalmol*. 2012; 154(4):702-11.

De Moraes CV, Hill V, Tello C, Liebmann JM, Ritch R. **Lower corneal hysteresis is associated with more rapid glaucomatous visual field progression.** *J Glaucoma*. 2012; 21(4):209-13.

Doughty MJ, Zaman ML. **Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: a review and meta-analysis approach.** *Surv Ophthalmol*. 2000; 44(5):367-408.

Dueker DK, Singh K, Lin SC, Fechtner RD, Minckler DS, Samples JR et al. **Corneal thickness measurement in the management of primary open-angle glaucoma: a report by the American Academy of Ophthalmology.** *Ophthalmology*. 2007; 114(9):1779-87.

Dunn FG, Frohlich ED. **Pharmacokinetics, mechanisms of action, indications, and adverse effects of timolol maleate, a nonselective beta-adrenoreceptor blocking agent.** *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther*. 1981; 1(3):188-200.

E

Earp MA, Rahmani M, Chew K, Brooks-Wilson A. **Estimates of array and pool-construction variance for planning efficient DNA-pooling genome wide association studies.** *BMC Med Genomics*. 2011; 4:81.

Edeki TI, He H, Wood AJ. **Pharmacogenetic explanation for excessive betablockade following timolol eye drops: potential for oral-ophthalmic drug interaction.** *JAMA*. 1995; 274(20):1611-3.

Edwards R, Thornton J, Ajit R, Harrison RA, Kelly SP. **Cigarette smoking and primary open angle glaucoma: a systematic review.** *J Glaucoma*. 2008; 17(7):558-66.

Ehlers N, Bramsen T, Sperling S. **Applanation tonometry and central corneal thickness.** *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1975; 53(1):34-43.

Eyawo O, Nachega J, Lefebvre P, Meyer D, Rachlis B, Lee CW, et al. **Efficacy and safety of prostaglandin analogues in patients with predominantly primary open-angle glaucoma or ocular hypertension: a meta-analysis.** *Clin Ophthalmol*. 2009; 3:447-56.

Esslinger U, Garnier S, Korniat A, Proust C, Kararigas G, Müller-Nurasyid M, et al. **Exome-wide association study reveals novel susceptibility genes to sporadic dilated cardiomyopathy.** *PLoS One*. 2017; 12(3):e0172995.

EGS, European Glaucoma Society. **Terminology and guidelines for glaucoma (4th edition) 2014.** http://www.eugs.org/eng/EGS_guidelines.asp

EGS, European Glaucoma Society. Terminology and Guidelines for Glaucoma, 4th Edition-**Chapter 1: British Journal of Ophthalmology. 2017a;** 101:1-72. <http://bjo.bmj.com/content/101/4/1>

EGS, European Glaucoma Society. Terminology and Guidelines for Glaucoma, 4th Edition-**Chapter 2: Classification and terminology.** British Journal of Ophthalmology. 2017b; 101:73-127.<http://bjo.bmj.com/content/101/5/73>.

EGS, European Glaucoma Society. Terminology and Guidelines for Glaucoma, 4th Edition-**Chapter 3: Treatment principles and options.** British Journal of Ophthalmology. 2017c; 101:130-195. <http://bjo.bmj.com/content/101/6/130>.

EMA, European Medicines Agency. www.ema.europa.eu

F

Foster PJ, Johnson GJ. **Glaucoma in China: how big is the problem?** *Br J Ophthalmol.* 2001; 85(11):1277-82.

Forstbauer LM, Brockschmidt FF, Moskvina V, Herold C, Redler S, Herzog A, et al. **Genome-wide pooling approach identifies SPATA5 as a new susceptibility locus for alopecia areata.** *Eur J Hum Genet.* 2012; 20(3):326-32.

Friedman DS, Wolfs RC, O'Colmain BJ, Klein BE, Taylor HR, West S, et al; **Eye Diseases Prevalence Research Group. Prevalence of open-angle glaucoma among adults in the United States.** *Arch Ophthalmol.* 2004; 122(4):532-8.

Fuchsjager-Mayrl G, Markovic O, Losert D, Lucas T, Wachek V, Muller M, et al. **Polymorphism of the beta-2 adrenoreceptor and IOP lowering potency of topical timolol in healthy subjects.** *Mol Vis.* 2005; 11:811-5.

G

Gauthier AC, Liu J. **Epigenetics and signaling pathways in glaucoma.** *Biomed Res Int.* 2017; 2017:5712341.

Gharahkhani P, Burdon KP, Cooke Bailey JN, Hewitt AW, Law MH, Pasquale LR, et al; NEIGHBORHOOD consortium. **Analysis combining correlated glaucoma traits identifies five new risk loci for open-angle glaucoma.** *Sci Rep.* 2018; 8(1):3124.

GLT, The Glaucoma Laser Trial Research Group. **2. Results of argon laser trabeculoplasty versus topical medicines.** *Ophthalmology.* 1990; 97:1403-13.

Goldmann H, Schmidt T. **Applanation tonometry [German].** *Ophthalmologica.* 1957; 134(4):221-42.

González JR, Armengol L, Solé X, Guinó E, Mercader JM, Estivill X et al. **SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies**, *Bioinformatics*. 2007; 23(5):654-655.

Gordon MO, Kass MA. **The Ocular Hypertension Treatment Study: design and baseline description of the participants**. *Arch Ophthalmol*. 1999; 117(5):573-83.

Gordon MO, Beiser JA, Brandt JD, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, et al. **The Ocular Hypertension Treatment Study:baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma**. *Arch Ophthalmol*. 2002; 120(6):714-20; discussion 829-30.

Grieshaber MC, Mozaffarieh M, Flammer J. **What is the link between vascular dysregulation and glaucoma?**. *Surv Ophthalmol*. 2007; 52(Suppl 2):S144-54.

GPC_glaucoma, **Guía de Práctica Clínica sobre Glaucoma de Ángulo Abierto. Guías de práctica clínica en el SNS**. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Generalitat de Catalunya, Departament de Salut. Edición: 2017 Edita: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad y Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya. NIPO:680-15-082-9.

Guyatt GH, Oxman AD, Vist GE, Kunz R, Falck-Ytter Y, Alonso-Coello P, et al; **GRADE Working Group. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations**. *BMJ*. 2008; 336(7650):924-6.

H

Harwerth RS, Vilupuru AS, Rangaswamy NV, Smith EL 3rd. **The relationship between nerve fiber layer and perimetry measurements**. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007; 48(2):763-73.

Hedner J, Everts B, Möller CS. **Latanoprost and respiratory function in asthmatic patients: randomized, double-masked, placebo-controlled crossover evaluation**. *Arch Ophthalmol*. 1999; 117(10):1305-9.

Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, Hyman L, Bengtsson B, Hussein M. **Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial**. *Arch Ophthalmol*. 2002; 120(10):1268-79.

Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, et al. **Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits**. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(23):9362-7.

Hinz B, Rösch S, Ramer R, Tamm ER, Brune K. **Latanoprost induces matrix metalloproteinase-1 expression in human nonpigmented ciliary epithelial cells through a cyclooxygenase-2-dependent mechanism**. *FASEB J*. 2005; 19(13):1929-31.

Hirschhorn JN. **Genomewide association studies-illuminating biologic pathways**. *N Engl J Med*. 2009; 360(17):1699-701.

Hodapp E, Parrish RKL, Anderson DR. **Clinical decisions in glaucoma**. St Louis:The CV Mosby Co, 1993.

Hollands H, Johnson D, Hollands S, Simel DL, Jinapriya D, Sharma S. **Do findings on routine examination identify patients at risk for primary open-angle glaucoma? The rational clinical examination systematic review.** *JAMA.* 2013; 309(19):2035-42.

Honrubia F, García-Sánchez J, Polo V, de la Casa JM, Soto J. **Conjunctival hyperaemia with the use of latanoprost versus other prostaglandin analogues in patients with ocular hypertension or glaucoma: a meta-analysis of randomised clinical trials.** *Br J Ophthalmol.* 2009; 93(3):316-21.

Hu J, Vu JT, Hong B, Gottlieb C. **Uveitis and cystoid macular oedema secondary to topical prostaglandin analogue use in ocular hypertension and open angle glaucoma.** *Br J Ophthalmol.* 2020; 104(8): 1040-1044.

Huang ZP, Kataoka M, Chen J, Wu G, Ding J, Nie M, et al. **Cardiomyocyte-enriched protein CIP protects against pathophysiological stresses and regulates cardiac homeostasis.** *J Clin Invest.* 2015; 125(11):4122-4134.

I

Inoue K, Shiokawa M, Higa R, Sugahara M, Soga T, Wakakura M et al. **Adverse periocular reactions to five types of prostaglandin analogs.** *Eye (Lond)* 2012; 26(11):1465-72.

J

Janz NK, Wren PA, Lichter PR. **The Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study: interim quality of life findings after initial medical or surgical treatment of glaucoma.** *Ophthalmology.* 2001; 108:1954-65.

Jonas JB, Gusek GC, Naumann GO. **Optic disc morphometry in chronic open-angle glaucoma. I. Morphometric intrapapillary characteristic.** *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1988; 226(6):522-530.

Jones FL, Ekberg NL. **Exacerbation of asthma by timolol.** *N Engl J Med.* 1979; 301(5):270.

K

Kale-Landoy M, Day AC, Cordeiro MF, Migdal C. **Optical coherence tomography in anterior segment imaging.** *Acta Ophthalmol Scand.* 2007; 85(4):427-30.

Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, Keltner JL, Miller JP et al. **The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma.** *Arch Ophthalmol.* 2002; 120(6):701-13; discussion 829-30.

Kass MA, Gordon MO, Gao F, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, et al. **Delaying treatment of ocular hypertension: the ocular hypertension treatment study.** *Arch Ophthalmol.* 2010; 128(3):276-87.

Klein BE, Klein R. **Projected prevalences of age-related eye diseases.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54(14):ORSF14-7.

Klein ME, Parvez MM, Shin JG. **Clinical implementation of pharmacogenomics for personalized precision medicine: barriers and solutions.** *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2017; 106(9):2368-79.

Korte JM, Kaila T, Saari KM. **Systemic bioavailability and cardiopulmonary effects of 0.5 % timolol eyedrops.** *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2002; 240(6):430-5.

Krupin T, Liebmann JM, Greenfield DS, Rosenberg LF, Ritch R, Yang JW; **Low-Pressure Glaucoma Study Group. The Low-pressure Glaucoma Treatment Study (LoGTS) study design and baseline characteristics of enrolled patients.** *Ophthalmology.* 2005; 112(3):376-85.

Kuang T, Zhang Ch, Zangwill LM, Weinreb RN, Medeiros FA. **Estimating the Lead Time Gained by Optical Coherence Tomography in Detecting Glaucoma Before Development of Visual Field Defects.** *Ophthalmology.* 2015; 122(10):2002-2009.

Kumar P, Mahalingam K. **In silico approach to identify non-synonymous SNPs with highest predicted deleterious effect on protein function in human obesity related gene, neuronal growth regulator 1 (NEGR1).** *3 Biotech.* 2018; 8(11):466.

Kumar H, Mansoori T, Warjri GB, Somarajan BI, Bandil S, Gupta V. **Lasers in glaucoma.** *Indian J Ophthalmol.* 2018; 66(11):1539-53.

Kuzin AA, Varma R, Reddy HS, Torres M, Azen SP; Los Angeles Latino Eye Study Group. **Ocular biometry and open-angle glaucoma: the Los Angeles Latino Eye Study.** *Ophthalmology.* 2010; 117(9):1713-19.

L

LALES, Los Angeles Latino Eye Study Group. **Intraocular pressure, central corneal thickness, and prevalence of open-angle glaucoma: the Los Angeles Latino Eye Study.** *Am J Ophthalmol* 2008; 146:743.

Landers J, Goldberg I, Graham SL. **Analysis of risk factors that may be associated with progression from ocular hypertension to primary open angle glaucoma.** *Clin Experiment Ophthalmol.* 2002; 30(4):242-7.

Latina MA, Sibayan SA, Shin DH, Noecker RJ, Marcellino G. **Q-switched 532-nm Nd: YAG laser trabeculoplasty (selective laser trabeculoplasty): a multicenter, pilot, clinical study.** *Ophthalmology.* 1998; 105(11):2082-8. discussion 2089-90.

Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. **Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta analysis of prospective studies.** *JAMA.* 1998; 279(15):1200-5.

LeA, Mukesh BN, McCarty CA, Taylor HR. **Risk factors associated with the incidence of open-angle glaucoma: the visual impairment project.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44(9):3783-9.

Leier CV, Baker ND, Weber PA. **Cardiovascular effects of ophthalmic timolol.** *Ann Intern Med.* 1986; 104(2):197-9.

Leske MC, Connell AM, Schachat AP, Hyman L. **The Barbados Eye Study: prevalence of open angle glaucoma.** *Arch Ophthalmol.* 1994; 112(6):821-9.

Leske MC, Heijl A, Hyman L, Bengtsson B. **Early Manifest Glaucoma Trial: design and baseline data.** *Ophthalmology.* 1999; 106(11):2144-53.

Leske MC, Heijl A, Hussein M, Bengtsson B, Hyman L, Komaroff E. **Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial.** *Arch Ophthalmol.* 2003; 121(1):48-56.

Leske MC, Wu SY, Hennis A, Honkanen R, Nemesure B; BESs Study Group. **Risk factors for incident open-angle glaucoma: the Barbados Eye Studies.** *Ophthalmology.* 2008; 115(1):85-93.

Leung EW, Medeiros FA, Weinreb RN. **Prevalence of ocular surface disease in glaucoma patients.** *J Glaucoma.* 2008; 17:350-55.

Lichter PR, Musch DC, Gillespie BW, Guire KE, Janz NK, Wren PA et al. **Interim clinical outcomes in the Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study comparing initial treatment randomized to medications or surgery.** *Ophthalmology.* 2001; 108(11):1943-53.

Li M, Wang M, Guo W, Wang J, Sun X. **The effect of caffeine on intraocular pressure: a systematic review and meta-analysis.** *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2010; 249(3):435-42.

Linden C, Alm A. **Prostaglandin analogues in the treatment of glaucoma.** *Drugs Aging.* 1999; 14:387-98.

Liu J, Roberts CJ. **Influence of corneal biomechanical properties on intraocular pressure measurement: quantitative analysis.** *J Cataract Refract Surg.* 2005; 31(1):146-55.

M

Malvitte L, Montange T, Vejux A, Baudouin C, Bron AM, Creuzot-Garcher C, et al. **Measurement of inflammatory cytokines by multicytokine assay in tears of patients with glaucoma topically treated with chronic drugs.** *Br J Ophthalmol.* 2007; 91(1):29-32.

MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, Feuk L, Scherer SW. **The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome.** *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(Database issue):D986-92.

Magacho L, Reis R, Shetty RK, Santos LC, Ávila MP. **Efficacy of latanoprost or fixed-combination latanoprost-timolol in patients switched from a combination of timolol and a nonprostaglandin medication.** *Ophthalmology.* 2006; 113(3):442-5.

Marcinkowska-Swojak M, Uszczyńska B, Figlerowicz M, Kozłowski P. **An MLPA-based strategy for discrete CNV genotyping: CNV-miRNAs as an example.** *Hum Mutat.* 2013; 34(5):763-73.

Marcus MW, de Vries MM, Junoy Montolio FG, Jansonius NM. **Myopia as a risk factor for open-angle glaucoma: a systematic review and meta-analysis.** *Ophthalmology.* 2011; 118(10):1989-94.

Mattox C, Tsai JC; **Patient Care Committee of the American Glaucoma Society. American Glaucoma Society position statement: glaucoma surgery by surgeons.** *J Glaucoma.* 2013; 22(6):515.

McCarty CA, Burmester JK, Mukesh BN, Patchett RB, Wilke RA. **Intraocular pressure response to topical beta-blockers associated with an ADRB2 single-nucleotide polymorphism.** *Arch Ophthalmol.* 2008; 126(7):959-63.

McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, et al. **Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges.** *Nat Rev Genet.* 2008; 9(5):356-69.

McLaren NC, Moroi SE. **Clinical implications of pharmacogenetics for glaucoma therapeutics.** *Pharmacogenomics J.* 2003; 3(4):197-201.

Memarzadeh F, Ying-Lai M, Chung J, Azen SP, Varma R ; Los Angeles Latino Eye Study Group. **Blood pressure, perfusion pressure, and open-angle glaucoma: the Los Angeles Latino Eye Study.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51(6):2872-7.

Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. **Long non-coding RNAs: insights into functions.** *Nat Rev Genet.* 2009; 10(3):155-59.

Miglior S, Zeyen T, Pfeiffer N, Cunha-Vaz J, Torri V, Adamsons I; **European Glaucoma Prevention Study (EGPS) Group. Results of the European Glaucoma Prevention Study.** *Ophthalmology.* 2005; 112(3):366-75.

Miller KM, Quigley HA. **The clinical appearance of the lamina cribrosa as a function of the extent of glaucomatous optic nerve damage.** *Ophthalmology.* 1988; 95(1):135-8.

Mitchell P, Smith W, Attebo K, Healey PR. **Prevalence of open-angle glaucoma in Australia: the Blue Mountains Eye Study.** *Ophthalmology.* 1996; 103(10):1661-9.

Mitchell P, Hourihan F, Sandbach J, Wang JJ. **The relationship between glaucoma and myopia: the Blue Mountains Eye Study.** *Ophthalmology.* 1999; 106(10):2010-5.

Mitra M, Chang B, James T. **Exacerbation of angina associated with latanoprost.** *BMJ.* 2001; 323(7316):783.

Morgan JE, Bourtsoukli I, Rajkumar KN, Ansari E, Cunliffe IA, North RV, et al. **The accuracy of the inferior>superior>nasal>temporal neuroretinal rim area rule for diagnosing glaucomatous optic disc damage.** *Ophthalmology.* 2012; 119(4):723-30.

Mowatt G, Burr JM, Cook JA, Siddiqui MA, Ramsay C, Fraser C, et al; OAG **Screening Project. Screening tests for detecting open-angle glaucoma: systematic review and meta-analysis.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49(12):5373-85.

Muñoz Negrete FJ, Gonzalez Martin-Moro J, Casas de Llera P, Urcelay Segura JL, Rebolleda G, Ussa F, et al. **Guidelines for treatment of chronic primary angle-closure glaucoma.** *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2015; 90(3):119-38.

N

Nemesure B, He Q, Mendell N, Wu SY, Hejtmancik JF, Hennis A, et al; Barbados Family Study Group. **Inheritance of open-angle glaucoma in the Barbados family study.** *Am J Med Genet.*

2001; 103(1):36-43.

Newman-Casey PA, Talwar N, Nan B, Musch DC, Stein JD. **The relationship between components of metabolic syndrome and open-angle glaucoma.** *Ophthalmology.* 2011; 118(7):1318-26.

Nieminen T, Uusitalo H, Mäenpää J, Turjanmaa V, Rane A, Lundgren S, et al. **Polymorphisms of genes CYP2D6, ADRB1 and GNAS1 in pharmacokinetics and systemic effects of ophthalmic timolol: a pilot study.** *Eur J Clin Pharmacol.* 2005; 61(11):811-19.

O

Owen RP, Sangkuhl K, Klein TE, Altman RB. **Cytochrome P450 2D6.** *Pharmacogenet Genomics.* 2009; 19(7):559-62.

P

Park HY, Park SH, Park CK. **Central visual field progression in normal-tension glaucoma patients with autonomic dysfunction.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014; 55(4):2557-63.

Pharmgkb.org. **List dosing Guidelines.**

PPP, **Preferred Practice Pattern: Primary Open-Angle Glaucoma.** *American Academy of Ophthalmology® Copyright © 2015.*

PPP, **Preferred Practice Pattern: Primary Open Angle.** *American Academy of Ophthalmology (AAO) 2016.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ophttha.2015.10.053> ISSN 0161-6420/16.

Q

Quaranta L, Riva I, Gerardi Ch, Oddone F, Floriano I, Konstas AGP. **Quality of life in glaucoma: a review of the literature.** *Adv Ther.* 2016; 33:959-81.

Quigley HA. **Examination of the retinal nerve fiber layer in the recognition of early glaucoma damage.** *Trans Am Ophthalmol Soc* 1986; 84:920-66.

Quigley HA. **Number of people with glaucoma worldwide.** *Br J Ophthalmol.* 1996; 80(5):389-93.

Quigley HA, West SK, Rodriguez J, Munoz B, Klein R, Snyder R. **The prevalence of glaucoma in a population-based study of Hispanic subjects: Proyecto VER.** *Arch Ophthalmol.* 2001; 119(12):1819-26.

Quigley HA, Broman AT. **The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020.** *Br J Ophthalmol.* 2006; 90(3):262-7.

R

Raber S, Mandema JW, Li H, Nickens DJ. **A model-based dose-response meta-analysis of ocular hypotensive agents as a drug development tool to evaluate new therapies in glaucoma.** *J Ocul Pharmacol Ther [Internet]. 2015; 31(4):189-97.*

Rahman ML, Bunce C, Healey PR, Mitchell P, Sham PC, McGuffin P, et al. **Commingling analyses of central corneal thickness and adjusted intraocular pressure in an older Australian population.** *Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010; 51(5):2512-8.*

Ren R, Jonas JB, Tian G, Zhen Y, Ma K, Li S, et al. **Cerebrospinal fluid pressure in glaucoma: a prospective study.** *Ophthalmology. 2010; 117(2):259-66.*

Roodhooft JMJ. **Leading causes of blindness worldwide.** *Bull. Soc. belge Ophtalmol. 2002; 283: 19-25.*

Rossetti L, Gandolfi S, Traverso C, Montanari P, Uva M, Manni G, et al. **An evaluation of the rate of nonresponders to latanoprost therapy.** *J Glaucoma 2006; 15(3):238-43.*

Rossi GC, Pasinetti GM, Scudeller L, Bianchi PE. **Ocular surface disease and glaucoma: how to evaluate impact on quality of life.** *J Ocul Pharmacol Ther. 2013; 29:390-94.*

S

Saheb H, Ahmed II. **Micro-invasive glaucoma surgery: current perspectives and future directions.** *Curr Opin Ophthalmol. 2012; 23(2):96-104.*

Saini M, Vanathi M, Dada T, Agarwal T, Dhiman R, Khokhar S. **Ocular surface evaluation in eyes with chronic glaucoma on long term topical antiglaucoma therapy.** *Int J Ophthalmol. 2017; 10(6):931-38.*

Sakata LM, Lavanya R, Friedman DS, Aung HT, Gao H, Kumar RS, et al. **Comparison of gonioscopy and anterior segment ocular coherence tomography in detecting angle closure in different quadrants of the anterior chamber angle.** *Ophthalmology. 2008; 115(5):769-74.*

Sakurai M, Higashide T, Takahashi M, Sugiyama K. **Association between genetic polymorphisms of the prostaglandin F2alpha receptor gene and response to latanoprost.** *Ophthalmology. 2007; 114(6):1039-45.*

Sakurai M, Higashide T, Ohkubo S, Takeda H, Sugiyama K. **Association between genetic polymorphisms of the prostaglandin F2alpha receptor gene, and response to latanoprost in patients with glaucoma and ocular hypertension.** *Br J Ophthalmol. 2014; 98(4):469-73.*

Scheie HG. **Width and pigmentation of the angle of the anterior chamber: a system of grading by gonioscopy.** *Arch Ophthalmol. 1957; 58(4):510-14.*

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. **Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification.** *Nucleic Acids Res. 2002; 30(12):e57.*

Schwartz SG, Puckett BJ, Allen RC, Castillo IG, Leffler CT. **Beta1-adrenergic receptor polymorphisms and clinical efficacy of betaxolol hydrochloride in normal volunteers.** *Ophthalmology.* 2005; 112(12):2131-36.

Schwartz GF, Quigley HA. **Adherence and Persistence with Glaucoma Therapy.** *Surv Ophthalmol.* 2008; 53(Suppl 1):S57-68.

Shan NN, Bowd C, Medeiros FA, Weinreb RN, Sample PA, Hoffman EM, et al. **Combining structural and functional testing for detection of glaucoma.** *Ophthalmology.* 2006; 113(9):1596-1602.

Shah S, Chatterjee A, Mathai M, Kelly SP, Kwartz J, Henson D. **Relationship between corneal thickness and measured intraocular pressure in a general ophthalmology clinic.** *Ophthalmology.* 1999; 106(11):2154-60.

Shastri BS. **Genetic diversity and medicinal drug response in eye care.** *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2010; 248(8):1057-61.

Shields MB. **Textbook of Glaucoma. 3 ed. Williams-Wilkin, Baltimore.1992;**(527-33; 538-55; 561-69).

Shimmyo M, Ross AJ, Moy A, Mostafavi R. **Intraocular pressure, Goldmann applanation tension, corneal thickness, and corneal curvature in Caucasians, Asians, Hispanics, and African Americans.** *Am J Ophthalmol.* 2003; 136(4):603-13.

Shiga Y, Akiyama M, Nishiguchi KM, Sato K, Shimozawa N, Takahashi A, et al. **Genome-wide association study identifies seven novel susceptibility loci for primary open-angle glaucoma.** *Hum Mol Genet.* 2018; 27(8):1486-96.

Singh K, Jayaram M, Kaare M, Leidmaa E, Jagomäe T, Heinla I, et al. **Neural cell adhesion molecule *Negr1* deficiency in mouse results in structural brain endophenotypes and behavioral deviations related to psychiatric disorders.** *Sci Rep.* 2019; 9(1):5457.

Skalicky SE, Goldberg I, McCluskey P. **Ocular surface disease and quality of life in patients with glaucoma.** *Am J Ophthalmol.* 2012; 153(1-9):e2.

Sobek J, Bartscherer K, Jacob A, Hoheisel JD, Angenendt Ph. **Review: Microarray technology as a universal tool for high-throughput analysis of biological systems.** *Comb Chem High Throughput Screen.* 2006; 9(5):365-80.

Sommer A, Tielsch JM, Katz J, Quigley HA, Gottsch JD, Javitt JC, et al. **Racial differences in the cause-specific prevalence of blindness in east Baltimore.** *N Engl J Med.* 1991a; 325(20):1412-7.

Sommer A, Tielsch JM, Katz J, Quigley HA, Gottsch JD, Javitt J, et al. **Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans: the Baltimore Eye Survey.** *Arch Ophthalmol.* 1991b; 109(8):1090-5.

Sommer A, Katz J, Quigley HA, Miller NR, Robin AL, Richter RC, et al. **Clinically detectable nerve fiber atrophy precedes the onset of glaucomatous field loss.** *Arch Ophthalmol.* 1991c; 109(1):77-83.

Sommer A. **Glaucoma risk factors observed in the Baltimore Eye Survey.** *Curr Opin Ophthalmol.* 1996; 7(2):93-8.

Spaeth GL. **The normal development of the human chamber angle: a new system of descriptive gradind.** *Trans Ophthalmol Soc UK.* 1971; 91:709-39.

Speakman JR. **Functional analysis of seven genes linked to body mass index and adiposity by genome-wide association studies: a review.** *Hum Hered.* 2013; 75(2-4):57-79.

Springelkamp H, Lee K, Wolfs RC, Buitendijk GH, Ramdas WD, Hofman A, et al. **Population-based evaluation of retinal nerve fiber layer, retinal ganglion cell layer, and inner plexiform layer as a diagnostic tool for glaucoma.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014; 55(12):8428-38.

Stalmans I, Lemij H, Clarke J, Baudouin C, On behalf of the GOAL study group. **Signs and Symptoms of Ocular Surface Disease: The Reasons for Patient Dissatisfaction with Glaucoma Treatments.** *Clin Ophthalmol.* 2020; 14:3675-80.

T

Teus MA. **Atlas de Gonioscopia en el Glaucoma por Cierre Angular.** Edita: Allergan, S.A. M-34 304. 1999.

Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng CY. **Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis.** *Ophthalmology.* 2014; 121(11):2081-90.

GLT, The Glaucoma Laser Trial Research Group. 2. **Results of argon laser trabeculoplasty versus topical medicines.** *Ophthalmology.* 1990; 97:1403-13.

Tielsch JM, Sommer A, Katz J, Royall RM, Quigley HA, Javitt J. **Racial variations in the prevalence of primary open-angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey.** *JAMA.* 1991a; 266(3):369-74.

Tielsch JM, Katz J, Singh K, Quigley HA, Gottsch JD, Javitt J, et al. **A population-based evaluation of glaucoma screening: the Baltimore Eye Survey.** *Am J Epidemiol.* 1991b; 134(10):1102-10.

Topouzis F, Wilson MR, Harris A, Founti P, Yu F, Anastasopoulos E, et al. **Risk factors for primary open-angle glaucoma and pseudoexfoliative glaucoma in the Thessaloniki eye study.** *Am J Ophthalmol.* 2011; 152(2):219-28.

Tsai YJ, Hoyme HE. **Pharmacogenomics: the future of drug therapy.** *Clin Genet.* 2002; 62(4):257-64.

U

Ussa F, Fernandez I, Brion M, Carracedo A, Blazquez F, Garcia MT, et al. **Association between SNPs of metalloproteinases and prostaglandin F2 α receptor genes and latanoprost response in open-angle glaucoma.** *Ophthalmology.* 2015; 122(5):1040-48.

V

Vajaranant TS, Wu S, Torres M, Varma R. **The changing face of primary open-angle glaucoma in the United States: demographic and geographic changes from 2011 to 2050.** *Am J Ophthalmol.* 2012; 154(2):303-14.

Van Herick W, Shaffer RN, Schwartz A. **Estimation of width of the angle of the anterior chamber: incidence and significance of the narrow angle.** *Am J Ophthalmol.* 1969; 68(4):626-32.

Van Koolwijk LM, Ramdas WD, Ikram MK, Jansonius NM, Pasutto F, Hysi PG et al. **Common genetic determinants of intraocular pressure and primary open-angle glaucoma.** *PLoS Genet.* 2012; 8(5):e1002611.

Varma R, Ying-Lai M, Francis BA, Nguyen BB, Deneen J, Wilson MR, et al. **Prevalence of open-angle glaucoma and ocular hypertension in Latinos: the Los Angeles Latino Eye Study.** *Ophthalmology.* 2004; 111(8):1439-48.

Varma R, Lee PP, Goldberg I, Kotak S. **An assessment of the health and economic burdens of glaucoma.** *Am J Ophthalmol.* 2011; 152(4):515-22.

W

Wang SY, Singh K, Lin SC. **Prevalence and predictors of depression among participants with glaucoma in a nationally representative population sample.** *Am J Ophthalmol.* 2012; 154(436-444):e432.

Watson PG. Latanoprost. **Two years' experience of its use in the United Kingdom.** Latanoprost Study Group. *Ophthalmology.* 1998; 105:82-7.

Weih LM, Nanjan M, McCarty CA, Taylor HR. **Prevalence and predictors of open angle glaucoma: results from the visual impairment project.** *Ophthalmology.* 2001; 108(11):1966-72.

Weinreb RN, Khaw PT. **Primary open-angle glaucoma.** *Lancet.* 2004; 363(9422):1711-20.

Weinreb RN, Greve EL. **Glaucoma diagnosis. Structure and Function. World Glaucoma Association (WGA).** *Association of International Glaucoma Societies. Consensus Series -1.* 2004. Kugler Publications, The Hague, The Netherlands. ISBN 90 6299 200 5.

Weinreb RN, Grajewski A, Papadopoulos M, Grigg J, Freedman S. **Childhood Glaucoma. World Glaucoma Association (WGA).** *Association of International Glaucoma Societies. Consensus Series -9.* Kugler Publications, The Hague, The Netherlands; 2013.

Weinshilboum RM, Wang L. **Pharmacogenetics and pharmacogenomics: development, science, and translation.** *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2006; 7:223-45.

WGA, **World Glaucoma Association. Association of International Glaucoma Societies.** <https://wga.one/wga/directory-of-glaucoma-societies/2002>.

Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, et al. **Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine.** *Clin Pharmacol Ther.* 2012; 92(4):414-7

Whitacre MM, Stein RA, Hassanein K. **The effect of corneal thickness on applanation tonometry.** *Am J Ophthalmol.* 1993; 115(5):592-6.

Wiggs JL, Pasquale LR. **Genetics of glaucoma.** *Human Molecular Genetics.* 2017; 26(R1):R21-7.

Wolfs RC, Klaver CC, Ramrattan RS, van Duijn CM, Hofman A, de Jong PT. **Genetic risk of primary open-angle glaucoma. Population-based familial aggregation study.** *Arch Ophthalmol.* 1998; 116(12):1640-5.

WHO, World Health Organization. **Glaucoma is second leading cause of blindness globally.** *Bulletin of the World Health Organization.* 2004; 82 (11):811-90.

Wu SY, Nemesure B, Leske MC. **Glaucoma and myopia.** *Ophthalmology.* 2000; 107(6):1026-7.

Y

Yim SH, Jung SH, Chung B, Chung YJ. **Clinical implications of copy number variations in autoimmune disorders.** *Korean J Intern Med.* 2015; 30(3):294-304.

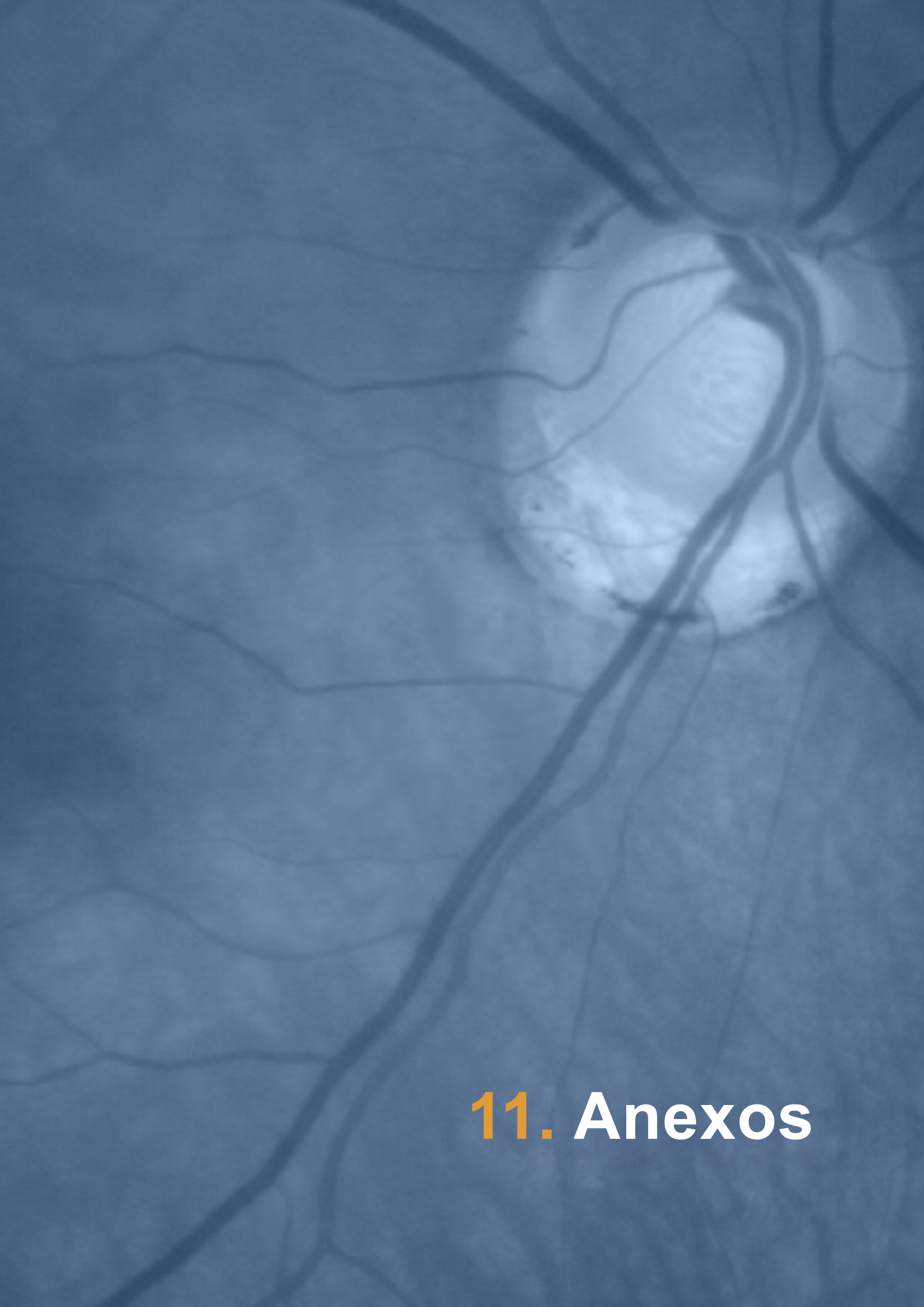
Yuan H, Yu M, Yang Y, Wu K, Lin X, Li J. **Association of CYP2D6 Single-Nucleotide Polymorphism with Response to Ophthalmic Timolol in Primary Open-Angle Glaucoma - A Pilot Study.** *J Ocul Pharmacol Ther.* 2010; 26(5):497-501.

Z

Zhang P, Jiang B, Xie L, Huang W. **PTGFR and SLCO2A1 gene polymorphisms determine intraocular pressure response to latanoprost in Han Chinese patients with glaucoma.** *Curr Eye Res.* 2016; 41(12):1561-5.

Zhang W, Po A, Dua H, Azuara-Blanco A. **Meta-analysis of randomised controlled trials comparing latanoprost with timolol in the treatment of patients with open angle glaucoma or ocular hypertension.** *Br J Ophthalmol.* 2001; 85(8):983-90.

Zhao D, Cho J, Kim MH, Friedman DS, Guallar E. **Diabetes, fasting glucose, and the risk of glaucoma: a meta-analysis.** *Ophthalmology.* 2015; 122(1):72-8.



11. Anexos

11. ANEXOS

11.1. Artículo

11.1.1. Título, autores y referencia del artículo publicado

Título: *MLIP* genotype as a predictor of pharmacological response in primary open-angle glaucoma and ocular hypertension.

Autores: Canut MI, Villa O, Kudsieh B, Mattlin H, Banchs I, González JR, Armengol L, Casaroli-Marano RP.

Revista: Sci Rep. 2021 Jan 15;11(1):1583. doi: 10.1038/s41598-020-80954-2. PMID: 33452295

Factor de Impacto: 3.998

Cuartil: Q1 (multidisciplinary)

11.1.2. Resumen del artículo publicado

Objetivos

Determinar la existencia de un perfil genético en la respuesta terapéutica observada en el tratamiento de pacientes afectados de glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) o bien de hipertensión ocular (HTO), que han recibido tratamiento hipotensor con betabloqueantes tópicos (BL) o bien con análogos de las prostaglandinas tópicas (PG), ambos principios activos considerados de primera línea en el manejo terapéutico hipotensor de patologías crónicas como el GPAA o bien la HTO. Existen diferentes formas de variación genética en el genoma humano. En el presente trabajo hemos abordado el estudio de la contribución de las variantes de número de copia (CNV) a la respuesta farmacológica encontrada en el tratamiento del GPAA y de la HTO.

Metodología

- **Diseño:** Se realizó un estudio prospectivo observacional, aleatorizado con intervención.
- **Sujetos:** Se fenotiparon 353 pacientes de ambos sexos y mayores de 18 años, diagnosticados de GPAA o HTO, en uno o en ambos ojos, y que requirieron tratamiento farmacológico para el control de la PIO (presión intraocular), de los que se randomizaron 165 pacientes, 14 de los cuales fueron excluidos por motivos varios.
- **Métodos:** Se realizó un análisis genético de la cohorte estudiada para identificar CNVs asociadas con diferencias observadas en la respuesta farmacológica al tratamiento del GPAA y HTO del grupo poblacional estudiado, utilizando una estrategia de agrupación de ADN de individuos respondedores y no respondedores, cuidado-

samente fenotipados, y tratados durante un mínimo de 6 semanas (± 3 días) con BL tópicos un grupo (BL: maleato de timolol) y el otro con PG tópicos (PG: latanoprost), utilizando *microarray* de alta resolución y realizando una validación de los hallazgos mediante técnica de MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*) con metodologías de alto rendimiento (*high-throughput*).

- **Principales medidas a estudiar:** reducción de la PIO en términos de eficacia hipotensora y análisis comparativo de la variación en el número de copia en todo el genoma, entre los respondedores (R) y no respondedores (NR) a ambos principios activos estudiados (BL, PG).

Resultados

En el grupo que fueron tratados con BL, 44 respondieron (62,8 %) y 26 (37,2 %) no respondieron, mientras que en el grupo PG, 46 respondieron (56,7 %) y 35 (43,3 %) no respondieron. En el grupo BL, la PIO basal fue de $24,3 \pm 2,9$ mmHg y disminuyó a $19,0 \pm 3,1$ mmHg después de recibir el tratamiento hipotensor tópico. En el grupo tratado con PG tópicos, la PIO basal fue de $24,4 \pm 2,2$ mmHg, y disminuyó a $18,9 \pm 3,3$ mmHg después de recibir el tratamiento.

- **Análisis de *loci* candidatos:** El análisis genético nos permitió identificar 7 regiones genómicas (entre 3,8 y 46 Kb de tamaño), *13q21*, *GSTT1*, *LCE1D*, *PHACTR1*, *MLIP*, *1p31* y *2q22*, que mostraron diferencias en las CNVs entre los grupos de R y NR.
- **Respuesta terapéutica y asociación *MLIP*:** El estudio del *locus MLIP* mediante MLPA nos permitió constatar que el número de copias de los *loci* (0 copias B/B, 1 copia A/B, y 2 copias A/A) está relacionada con la eficacia terapéutica en cuanto a descenso de PIO, de forma que cuanto mayor era el número de copias de la variante *MLIP*, menor fue la capacidad de los BL para disminuir la PIO (OR = 0.36, $p = 0.0025$). Y en relación a la terapia con PG, vimos que la distribución de alelos del número de copias *MLIP* también fue significativamente diferente entre los R y los NR al tratamiento con PG (prueba exacta de Fisher, $p = 0.0432$), siendo los resultados obtenidos opuestos en cuanto a descenso de PIO al comprobar que la presencia de copias adicionales de la variante *MLIP* confiere una disminución significativamente mayor de la PIO tras el tratamiento con PG (OR = 2.23, $p = 0.0148$).

Conclusiones

El número de copias de una porción intrónica del gen *MLIP* es un predictor de la respuesta hipotensora al tratamiento farmacológico tópico de GPAA y de HTO en relación a los fármacos de primera línea más comunmente utilizados en la práctica clínica habitual (BL, PG), y podría usarse como un biomarcador para el tratamiento de estas patologías crónicas, evitando efectos indeseables en caso de prever escasa eficacia hipotensora previa al tratamiento en base al número de copias del *locus MLIP*. Los resultados obtenidos contribuyen a la comprensión de cómo los factores genéticos pueden influir en la respuesta al tratamiento farmacológico tópico en GPAA y también en HTO, representando una contribución traslacional para una medicina personalizada en el tratamiento actual del glaucoma.

11.1.3. Artículo publicado



OPEN

MLIP genotype as a predictor of pharmacological response in primary open-angle glaucoma and ocular hypertension

María I. Canut^{1,8}, Olaya Villa^{2,8}, Bachar Kudsieh³, Heidi Mattlin², Isabel Banchs², Juan R. González^{4,5}, Lluís Armengol² & Ricardo P. Casaroli-Marano^{6,7}✉

Predicting the therapeutic response to ocular hypotensive drugs is crucial for the clinical treatment and management of glaucoma. Our aim was to identify a possible genetic contribution to the response to current pharmacological treatments of choice in a white Mediterranean population with primary open-angle glaucoma (POAG) or ocular hypertension (OH). We conducted a prospective, controlled, randomized, partial crossover study that included 151 patients of both genders, aged 18 years and older, diagnosed with and requiring pharmacological treatment for POAG or OH in one or both eyes. We sought to identify copy number variants (CNVs) associated with differences in pharmacological response, using a DNA pooling strategy of carefully phenotyped treatment responders and non-responders, treated for a minimum of 6 weeks with a beta-blocker (timolol maleate) and/or prostaglandin analog (latanoprost). Diurnal intraocular pressure reduction and comparative genome wide CNVs were analyzed. Our finding that copy number alleles of an intronic portion of the *MLIP* gene is a predictor of pharmacological response to beta blockers and prostaglandin analogs could be used as a biomarker to guide first-tier POAG and OH treatment. Our finding improves understanding of the genetic factors modulating pharmacological response in POAG and OH, and represents an important contribution to the establishment of a personalized approach to the treatment of glaucoma.

Glaucoma, a leading cause of irreversible blindness worldwide, is characterized by an optic nerve neuropathy that can develop at any age, with Mendelian inheritance typical for early-onset disease, and complex inheritance typical of adult-onset disease (before and after age 40, respectively)¹. Primary open-angle glaucoma (POAG), the most prevalent form of the disease, is related to increased intraocular pressure (IOP). Its treatment poses challenges, and interestingly, clinical and therapeutic response can also be influenced by environmental and genetic factors^{2,3}. Pharmacological treatment is the main therapeutic pillar for glaucoma, with topical beta-blockers and prostaglandin analogs as the first-line hypotensive drugs used to treat ocular hypertension (OH)⁴. Expected hypotensive capacity, according to several studies, is 20–25% for beta-blockers, and 25–35% for prostaglandins^{4–6}. However, the response profile to pharmacological treatment differs in patients. The above-mentioned drugs (in monotherapy or in combination) have also been found to cause intolerance as a result of both topical and systemic undesirable adverse effects⁴.

Pharmacogenomics aims to study the way individual genome variations influence drug response. Genetic variations can affect drug bioavailability, metabolism, sensitivity, toxicity, and dosage. Detailed knowledge of drug pharmacogenetics enables patient management to be optimized by dosage customized according to an individual's genetic profile^{7,8}. The main medical value of this approach is that it is possible to predict, for each individual, whether a drug at a specific dose will be effective or whether it should be avoided due to a high risk of toxicity or lack of response^{8,9}. To date, the most common and most extensively studied inter-individual genetic

¹Centro de Oftalmología Barraquer, Instituto Universitario Barraquer (UAB), Barcelona, Spain. ²Quantitative Genomic Medicine Laboratories (qGenomics), Esplugues del Llobregat, Spain. ³Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain. ⁴Barcelona Institute for Global Health (ISGlobal) and Centro de Investigación Biomédica en Red en Epidemiología Y Salud Pública (CIBERESP), Barcelona, Spain. ⁵Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain. ⁶Department of Surgery, School of Medicine and Health Sciences and Hospital Clinic de Barcelona (IDIBAPS), University of Barcelona, Calle Sabino de Arana 1 (2nd floor, Ophthalmology), 08028 Barcelona, Spain. ⁷Institute of Biomedical Research Sant Pau (IB-Sant Pau, SGR1113) and Barcelona Tissue Bank (BST), Barcelona, Spain. ⁸These authors contributed equally: María I. Canut and Olaya Villa. [✉]email: rcasaroli@ub.edu

variations that shape pharmacological response are single nucleotide variations together with small insertions/deletions (indels). Other studies have focused on genome structural variations, including inversions, translocations, and copy number variants (CNVs), which have also been found to be a rich source of genetic variability^{10–12}. The consequence of structural variation is usually that part of or a whole gene sequence is rearranged (inverted, duplicated, deleted, etc.), commonly resulting in interference with gene functioning. Functionally relevant CNVs have been previously described in genes related to drug absorption, distribution, metabolism, and excretion, including cytochrome P450 (*CYP*) and glutathione S-transferase (*GST*), with significantly different frequencies across human populations^{8,12,13}. Also of interest are genome-wide association studies (GWAS), as these have successfully identified *loci* contributing to complex diseases and traits^{14–16}, including pharmacogenomic response. However, apart from other limitations, the high cost and the need for very large cohorts have hampered the generalization of such approaches.

Recently, various studies have tried to elucidate a genetic basis for drug response to glaucoma treatment. In Chinese patients with glaucoma, for example, a differential response to latanoprost has been described for single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the prostaglandin F₂-alpha receptor (*PTGFR*) and solute carrier organic anion transporter family member 2A1 (*SLCO2A1*) genes¹⁷, with the study concluding that 2 SNPs—rs3766355 in *PTGFR* and rs4241366 in *SLCO2A1*—correlated with a good drug response over both the short- and long-term¹⁷. More recently, a genotyping study of a cohort of Mediterranean patients with POAG identified 5 SNPs related to response to latanoprost, with *PTGFR* SNPs associated with good (rs6686438, rs10786455) and negative (rs3753380, rs6672484, rs11578155) responses. Interestingly, rs3753380 has previously been reported to be related to a poor response to latanoprost in healthy Japanese subjects^{18,19}. The matrix metalloproteinase 1 (*MMP-1*) gene has also been related to refractoriness to latanoprost²⁰.

Given the lack of studies exploring the contribution of CNVs to individual pharmacological treatment responses, our aim was to examine the effect of this type of genetic variation in the individual response to latanoprost (prostaglandin) or timolol maleate (beta-blocker) in a white Mediterranean population treated for POAG or OH. We observed that a CNV located in an intronic portion of the muscle-enriched A-type lamin-interacting protein (encoded by the *MLIP* gene) predicts a better response to prostaglandins and, concomitantly, a poorer response to beta-blockers. Analysis of this genetic variant could contribute to better clinical management of glaucoma patients.

Material and methods

This study followed the ethical precepts of the Declaration of Helsinki (Fortaleza, Brazil, Oct 2013) and was approved by a local ethics committee (CEIC del Centro de Oftalmología Barraquer Barcelona; Ref. COB033). Human samples were obtained, processed, and analyzed in accordance with current EU regulations on the collection and preservation of human tissues and samples (2004/23/CE and 2006/17/CE), and in accordance with the protocol and legal requirements on the use of biological samples for biomedical research in Spain (Law 14/2007 and Royal Decree 1716/2011). The patients received clinical information and gave their informed consent to participate in the study. The use, protection, communication, and transfer of the personal data of participating patients complied with local regulations (Organic Law 5/2018).

Patients. Included in the study were patients aged 18 and older of both genders, without prior diagnoses and presenting with POAG or OH in one or both eyes requiring pharmacological treatment. IOP was measured using a Goldmann applanation tonometer (Carl Zeiss, Inc., Jena, Germany) mounted on a slit-lamp biomicroscope. IOP measurements were always made at the same time (9 am ± 1 h) by the same researcher (MIC) using the same tonometer, calibrated monthly according to protocol. As diagnostic criteria we considered the following: for POAG, IOP > 21 mmHg associated with optic disc or retinal nerve fiber layer abnormalities, and/or reproducible visual field abnormalities ([4]); and for OH, IOP > 21 mmHg without optic disc or retinal nerve fiber layer abnormalities.

Exclusions from the study were as follows: patients with corneal alterations that could hamper tonometer measurements; patients with pachymetry > 600 µm or < 500 µm; patients with pseudoexfoliative, pigmentary, or secondary glaucoma; patients who had undergone ocular surgery, with the exception of uncomplicated cataract surgery or laser procedures concerning the anterior segment if performed more than 6 months previously; patients with active ocular diseases; and patients currently treated or treated in the previous 6 months with topical, dermatological, intramuscular, or systemic steroids (Table S1, supplementary data).

Experimental design, cohort, and evaluation. A single-center prospective controlled randomized interventional partial crossover study was conducted (Fig. 1). An initial (baseline) tonometry measurement was made before starting treatment, and a second tonometry measurement to evaluate treatment response was made after 6 weeks (42 ± 3 days). According to consensus criteria, the efficacy of baseline IOP reduction attributable to prostaglandin derivatives and to beta-blockers is 25–35% and 20–25%, respectively^{4–6}.

Patients were randomized to 2 groups receiving hypotensive treatment as follows. PG group patients received the topical prostaglandin derivative latanoprost (Xalatan, 50 µg/mL) at night, and response and non-response were defined as IOP ≥ 30% and IOP < 25% reduction over baseline, respectively. BL group patients received the topical beta-blocker timolol maleate (Timoptol, 5 mg/mL) every 12 h, and response and non-response were defined as IOP ≥ 25% and IOP < 20% reductions over baseline, respectively^{4–6}. After the second tonometry measurement, non-responders were assigned to a wash-out period of 6 weeks and their treatment was crossed over (to timolol maleate for latanoprost non-responders, and to latanoprost for timolol maleate non-responders) for a further 6 weeks, after which they were reassigned to the corresponding group according to response (Fig. 1).

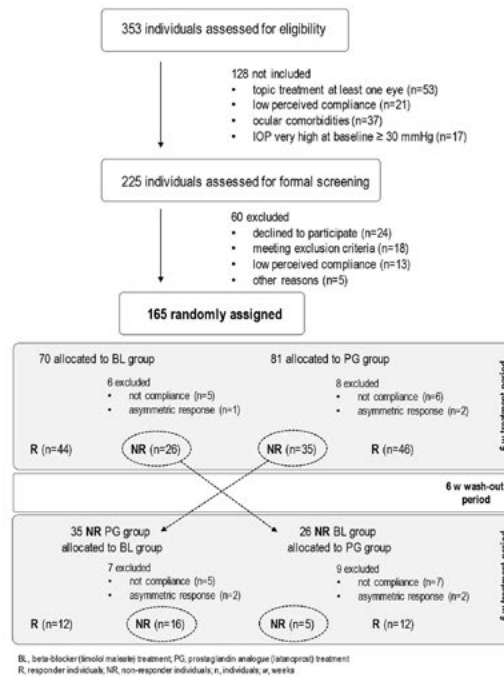


Figure 1. Study flowchart, design and cohort.

Patients with elevated IOP in both eyes, who presented an unsatisfactory therapeutic response in one of them⁴, were not considered in the final analysis.

DNA samples and genetic analysis. The GWAS analysis of CNVs was conducted in 2 sets of pooled samples meeting the inclusion criteria: for PG group responders and non-responders, and for BL group responders and non-responders. DNA samples were collected at a screening visit before the intervention. Genomic DNA was isolated from 2 mL of saliva using the Oragene collector (ORAGENE-DNA, OG-500; DNA Genotek Inc, Ottawa, Canada), following manufacturer's recommendations. DNA concentration and purity were measured, using a Denovix DS-11 device (Wilmington, DE, USA), after reading optical density at 260/280 and 260/230 ratios along a continuous wavelength. Equimolar amounts (100 ng each) of the DNA samples were mixed together to form each of the pools. We used 21 and 14 different DNA samples to prepare the PG responder and non-responder pools, respectively. To prepare the BL responder and non-responder pools, 20 and 13 different DNA samples were used, respectively. High-resolution array-based comparative genomic hybridization (aCGH) (Agilent 1 M, AMADID 021,529) was used to hybridize the Cy3-labelled DNA responder pool against the Cy5-labelled non-responder DNA pool. CNV calling was done using the ADM-2 algorithm, with parameters as follows: threshold 6, and 3 consecutive probes with absolute \log_2 ratio values > 0.25 . This ensured an approximate average resolution of 9–12 kb for CNV detection (file Table S2, supplementary data).

This microarray-based discovery assay identified 7 regions as having \log_2 ratio values above or below the threshold, reflecting CNVs for responders and non-responders, respectively. A follow-up validation study using a custom multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay was used to genotype the number of copies for each of the 7 loci in a larger cohort of patients, following standard procedures^{21,22}. The MLPA mix included 4 control probes targeting copy-number neutral and non-variable regions, plus 7 probes targeting the identified variable regions. Control DNA samples were used to normalize values for each probe. In the validation assay with the custom MLPA mix, we analyzed 189 samples from a total of 151 individuals. CNV was estimated from the multimodal distribution of normalized probe heights, which recapitulated the different combinations of copy number alleles and genotypes.

Statistical analysis. Quantitative data was described in terms of means and standard deviation while qualitative data was described in terms of frequency distribution. The Kolmogorov–Smirnov test was used to

	Total (N)	R (n)	NR (n)	<i>p</i>
BL	72	44	28	
Age, years (M ± SD)	50.0 ± 15.3	58.2 ± 14.3	52.5 ± 16.5	0.126
Female (%)	39 (54.1%)	26 (59.1%)	13 (46.4%)	0.293
Male (%)	33 (45.9%)	18 (40.9%)	15 (53.6%)	
IOP1, mmHg (M ± SD)	24.3 ± 2.9	24.8 ± 3.2	23.4 ± 2.1	0.063
IOP2, mmHg (M ± SD)	19.0 ± 3.1	17.2 ± 2.3	21.6 ± 2.4	0.0001
BCVA (M ± SD)	0.88 ± 0.25	0.92 ± 0.24	0.83 ± 0.26	0.161
PG	80	45	35	
Age, years (M ± SD)	57.8 ± 13.4	57.6 ± 13.6	57.9 ± 13.4	0.914
Female (%)	43 (54%)	23 (51%)	20 (57%)	0.447
Male (%)	37 (46%)	22 (49%)	15 (43%)	
IOP1, mmHg (M ± SD)	24.4 ± 2.2	24.6 ± 3.7	24.3 ± 3.1	0.701
IOP2, mmHg (M ± SD)	18.9 ± 3.3	16.8 ± 2.5	21.3 ± 3.1	0.0001
BCVA (M ± SD)	0.90 ± 0.29	0.99 ± 0.21	0.80 ± 0.34	0.006

Table 1. Demographic and clinical characteristics of study cohort. BL, beta-blocker (timolol maleate) treatment group; PG, prostaglandin analogue (latanoprost) treatment group; R, responder individuals; NR, non-responder individuals; (N)(n), number of individuals; IOP1, intraocular pressure before treatment; IOP2, after treatment; BCVA, best corrected visual acuity (decimal); M ± SD, mean ± standard deviation; *p*, *p*-value for responders vs non-responders.

determine distribution normality for the measured variables. A 2-tailed Student *t*-test was run and $p < 0.05$ was considered statistically significant. Those analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences v18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Copy-number genotype distributions between responders and non-responders were compared using Fisher's exact test, in 3×2 contingency tables constructed according to the frequency of the different genotypes (AA, AB, and BB). The null hypothesis, rejected if $p < 0.05$, was that allele frequency distributions were no different between the 2 treatment groups. Association analyses between copy numbers for different *loci* and responses to the 2 treatments were performed, using the SNPassoc R package²³, by assessing interactions between CNV alleles and treatment. The Bonferroni correction was used to identify which CNVs were significantly associated with response to treatment. A generalized linear model was used to compute the probability of interaction between *MLIP* CNV status and treatment.

Results

A total of 151 patients were studied, 81 and 70 of whom received prostaglandin treatment with latanoprost (PG group) and beta-blocker treatment with timolol maleate (BL group), respectively. All patients were treated for at least 6 weeks. In the PG group, 46 (56.7%) and 35 (43.3%) patients were responders and non-responders, respectively, while the corresponding figures for the BL group were 44 (62.8%) and 26 (37.2%), respectively. Baseline IOP values for the BL and PG groups were 24.3 ± 2.9 mmHg and 24.4 ± 2.2 mmHg, respectively, reduced after treatment to 19.0 ± 3.1 mmHg and 18.9 ± 3.3 mmHg, respectively. Age, sex, and best corrected visual acuity were not response-related for either drug. Table 1 summarizes the demographic characteristics of the study cohort and features of the treatment response.

Patients not responding to the initial treatment after 6 weeks underwent a wash-out period of 6 weeks, after which treatment was crossed over to the alternative drug (see Fig. 1); these patients were re-evaluated after 6 weeks (42 ± 3 days) according to the established protocol, and their response to the alternative treatment was recorded. This strategy increased the size of the cohort to 189 samples and validated part of the pharmacological response of our cohort: 35 PG non-responders were re-treated with timolol maleate, of whom 12 were reassigned to the BL responder group, 16 were classified as non-responders, and 7 were excluded (not compliance or asymmetric response) from final analysis. In BL group, 26 non-responders were re-treated with latanoprost, of whom 12 were reassigned to the PG responder group, 5 were classified as non-responders, and 9 were excluded (not compliance or asymmetric response). Table 2 summarizes genotype frequencies for *MLIP* copy numbers together with the percentage average response in IOP reduction in our final cohort (i.e., timolol maleate and latanoprost responders and non-responders).

An initial analysis of global CNVs using the high-resolution microarray identified 7 genomic regions (3.8–46 kb in size) – 13q21, glutathione S-transferase theta-1 (*GSTT1*), late cornified envelope 1D (*LCE1D*), phosphatase and actin regulator 1 (*PHACTR1*), *MLIP*, 1p31, and 2q22 – that showed CNVs between the responder and non-responder pooled groups (Table 3 and file Table S2, supplementary data). The custom MLPA validation assay showed that 2 of the 7 candidate loci exhibited significant CNVs between responders and non-responders, namely, 1p31 and *MLIP*. As for the other 5 *loci*, we could not verify significant differences, possibly due to sample selection bias originating in the relatively small number of individuals pooled for the discovery-phase microarray assay.

<i>MLIP</i>	BL group	PG group	NR group
Total n (%)	56 (29.5%)	58 (31.7%)	21 (9.0%)
A/A	2 (23.3%)	9 (33.8%)	1 (0.0%)
A/B	21 (30.5%)	29 (30.2%)	13 (10.2%)
B/B	33 (29.3%)	20 (32.8%)	7 (7.9%)

Table 2. Percentage average IOP reduction for responder and non-responder genotype frequencies for *MLIP*. *MLIP*, muscular LMNA interacting protein; A, 1 copy allele; B, no copies allele; BL, beta-blocker (timolol maleate) treatment group; PG, prostaglandin analogue (latanoprost) treatment group; NR, patients not responsive for any treatment in monotherapy; n, number of individuals; (%), percentage average IOP reduction.

Locus	Chromosome	Cytoband	Start	End	Size (Kb)	p
13q21	13	13q21.1	57759370	57788921	29	2001E–23
<i>GSTT1</i>	22	22q11.23	24349305	24395353	46	8545E–18
<i>LCE1D</i>	1	1q21.3	152762076	152769870	7.7	4322E–07
<i>PHACTR1</i>	6	6p24.1	13156200	13159684	3.8	1543E–07
<i>MLIP</i>	6	6p12.1	53929240	53934834	5.5	4883E–10
1p31	1	1p31.1	72766555	72801950	35	3764E–31
2q22	2	2q22.3	146865725	146876364	10	263E–12

Table 3. Genomic loci and differences in copy numbers for responder and non-responder pooled groups (genomic assembly GRCh37). *GSTT1*, glutathione S-transferase theta 1; *LCE1D*, late cornified envelope 1D; *PHACTR1*, phosphatase and actin regulator 1; *MLIP*, muscular LMNA interacting protein.

For beta-blockers we found more CNVs for non-responders than for responders (Fisher's exact test; $p = 0.0039$). On further investigation, we found that, under an additive model, each copy of the 1p31 variant allele conferred a negative effect on beta-blocker response in terms of IOP reduction capacity (odds ratio, OR = 0.37; $p = 0.0009$). A similar result was observed for CNVs for the *MLIP* locus, with significant differences in genotype distributions between responders and non-responders (Fisher's exact test; $p = 0.02448$). Similarly, the more copies of the *MLIP* variant, the weaker the capacity of beta-blockers to reduce IOP (OR = 0.40; $p = 0.0057$) (Fig. 2A).

Interestingly, for the PG group the distribution of *MLIP* copy number alleles was significantly different for responders and non-responders (Fisher's exact test; $p = 0.03814$), with additional CNVs for *MLIP* producing a significantly greater IOP reduction in PG group responders (OR = 2.34, $p = 0.01057$) (Fig. 2B).

When overall predicted responses were calculated for both the PG and BL groups (Fig. 3A) and related to CNVs for *MLIP* (Fig. 3B), we found response probabilities of almost 90% to latanoprost (PG group) for AA genotypes (2 copies) and of almost 70% to timolol maleate (BL group) for BB genotypes (no copies) (Fig. 3B). However, 21 patients overall (14%) were non-responders to either drug in a monotherapy regimen: 13 AB genotypes (1 copy), 7 BB genotypes (0 copies), and 1 AA genotype (2 copies).

Discussion

The current concept of personalized medicine means that a patient's response profile can be anticipated prior to drug treatment, thereby avoiding undesirable systemic and/or local adverse effects, whether mild or severe^{24–26}. Genomic analyses have identified key genes contributing to a glaucoma pathophysiology, with glaucoma-related genes defining key biological pathways and processes as potential targets for novel gene-based therapies^{1,2}. Personalized glaucoma management relies on a description of genetic variants that impinge on treatment efficacy, minimize pharmacological adverse effects, and ameliorate disease prognosis and progression. Although clinical pharmacogenetic tests are as yet not widely used in ophthalmology, simple and rapid approaches could be applied to therapeutic decision-making.

Our study followed a multi-step approach to identifying and validating the role played by previously unexplored genetic variations in the pharmacogenomic response to two first-line pharmacological treatments for POAG and OH (prostaglandins and beta-blockers). More specifically, we explored the contribution of CNVs, using a strategy based on pooled genomes that aimed to minimize individual CNVs and enrich the common variants present in our group of patients^{27–29}. DNA samples from responders and non-responders to prostaglandin and beta-blockers (according to clinical criteria) were independently pooled and analyzed using high-resolution aCGH which identified the 7 loci that exhibited copy number differences between responders and non-responders. A custom MLPA assay was used to genotype individual CNV status in a larger cohort of patients.

Our findings illustrate the efficacy of our approach to identifying possible biomarkers of a genetic predisposition to particular pharmacological responses associated with POAG and OH. Our results indicate that initial screening based on studying equimolar DNA pools of carefully phenotyped patients, followed by subsequent individual validation of a larger cohort, is effective.

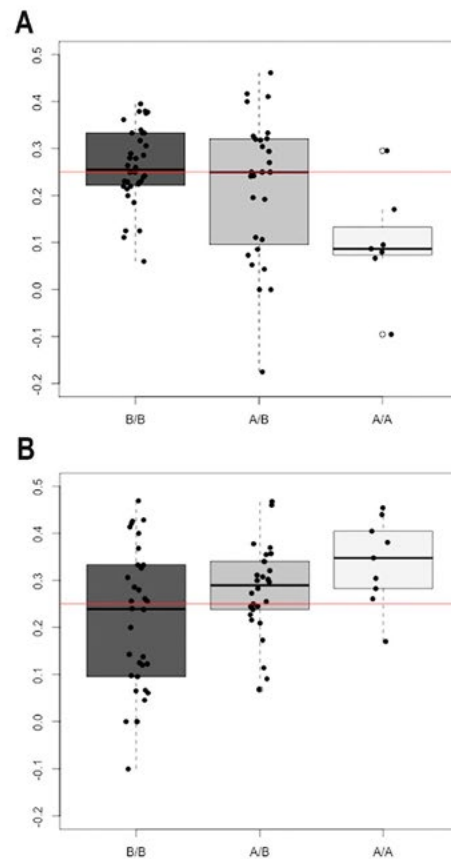


Figure 2. Correlation between copy number of the *MLIP* locus and intraocular pressure (IOP) reduction response to timolol maleate (A) and to latanoprost (B). Boxplots in each panel shows the percentage distribution of IOP reductions for individuals (black dots) grouped according to their *MLIP* genotype (B: no copy; A: 1 copy). The horizontal red line marks a 25% IOP reduction that differentiates responders from non-responders. Panel A. IOP reduction in response to a beta-blocker (timolol maleate). More copy numbers (AA genotype) tend to be associated with a smaller percentage IOP reduction, while the median response is higher among individuals with 1 or no *MLIP* variant copy. Panel B. Individual responses to prostaglandins (latanoprost) and their genotypes. Individuals with fewer copy numbers show a lower median response to latanoprost in terms of relative IOP reduction.

The validation study showed that pharmacological response was largely influenced by the copy numbers in a 5.6-kb region that overlaps with a known polymorphic CNV³⁰, located within intron 1 of the RefSeq *MLIP* gene (accession number NM_138569). Patients higher copy number of *MLIP* variant showed a good response to latanoprost (OR = 2.3), and a poor response to timolol maleate. Conversely, patients with no copies of *MLIP* variant showed a poor response to latanoprost, and a good response to timolol maleate. This interesting finding led us to hypothesize that the two drug types might act through different pathways.

MLIP is encoded in the short arm of chromosome 6, and its product interacts with muscular laminin-A (encoded by the *LMNA* gene), a structural component of the nuclear lamina known to be related to familial dilated cardiomyopathy^{31–33}. *MLIP* has been proposed as a key regulator of cardiomyopathy and is reported to have a potential as a therapeutic target to attenuate heart failure progression^{32,34}. In humans, *MLIP* is strongly expressed in the heart, smooth and skeletal muscle, and brain, weakly expressed in the liver, and not expressed in other human tissues examined to date^{32–35}. We were unable to detect mRNA expression for *MLIP* in peripheral

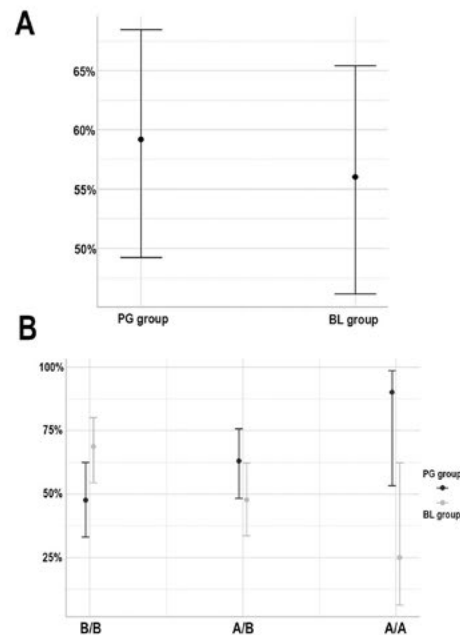


Figure 3. Response probabilities for timolol maleate and latanoprost. (A) Overall response probability for both therapeutic groups. (B) Response probability related to copy number variant (CNV) genotyping BB (no copy), AB (1 allelic copy), and AA (2 allelic copies) for the *MLIP* locus and the therapeutic groups.

blood (data not shown); had we done so, this would have added further value to its potential as a biomarker of therapeutic response.

Interestingly, the region of variability coincides with a recently annotated long non-coding RNA (lncRNA) called *MLIP* antisense RNA 1 (*MLIP-AS1*). While lncRNAs were initially thought to be transcriptional noise, accumulated and recent evidence points to regulated expression in particular contexts, during both embryonic stem-cell differentiation and adult tissue differentiation³⁶. It has also been suggested that lncRNAs are involved in several regulatory processes, including chromatin modification, transcriptional regulation, and post-transcriptional regulation³⁷. It therefore cannot be ruled out that absence of this regulation could lead to misregulation of *MLIP* and interfere in drug response at the ocular level. It has also been reported that alternative splicing patterns of *MLIP* mRNA may define versatile and stable regions of *MLIP* likely to modulate its interactions and functions in different tissues³⁵; altogether, therefore, further complementary research would be justified to identify its role in eye-related tissues.

As mentioned, previous reports suggest that *MLIP* might play a crucial role in heart disease. While an *MLIP* knock-out mouse model did not show an impact on cardiac function or structure, it did lead to myocardial-specific metabolic abnormalities and cardiac-specific protein kinase B (PKB, or Akt) pathway overactivation, inhibited, in contrast, by cardiac-specific *MLIP* overexpression³²; this is evidence in favor of a direct impact of *MLIP* on that key signaling pathway. Interestingly, the phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/Akt pathway promotes survival and neuroprotection in neurons by inhibiting pro-apoptotic B-cell lymphoma 2 (Bcl-2). Several neuroprotective drugs acting through different mechanisms, including prostaglandin analogs, have been demonstrated to reduce retinal ganglion cell loss and structural damage (caused by increased IOP) through the PI3K/Akt pathway³⁸. It is already known that prostaglandin analogs facilitate aqueous humor drainage via uveoscleral flow, as, acting on metalloproteinases and degrading the extracellular matrix, increased uveoscleral outflow in the ciliary muscle reduces IOP³⁹. We therefore cannot rule out *MLIP* and Akt signaling pathway participation in IOP response, nor in neuroprotective mechanisms for the optic nerve or different retinal cell populations. Future studies are needed to clarify ciliary muscle and trabecular meshwork protein activation by the PI3K/Akt and Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathways in patients with different CNV genotypes for *MLIP*.

To date, no known genes or regulatory elements are affected by the CNV region located in the 1p31 band. The closest gene is human neuronal growth regulator 1 (*NEGR1*), located several kb upstream of the CNVs identified as linked to the response to prostaglandins. *NEGR1* has been associated with a large number of phenotypes in numerous GWAS analyses of complex phenotypes, including body mass index/weight gain, the hemostatic

phenotype, immunity, and developmental delay^{40,41}. Given the existing evidence, and since a possible physiological effect of these CNVs on *NEGR1* (or other gene) expression has not been conclusively demonstrated, drawing conclusions for a possible relationship with the studied phenotype might be risky.

In conclusion, our findings contribute to knowledge on the genetic factors affecting prostaglandin and beta-blocker response in glaucoma treatment, providing new insights into the genetic architecture and pathways involved in POAG and OH. Nonetheless, since the clinical utility of this finding remains uncertain, high-quality clinical trials are necessary to accumulate sufficient evidence before this knowledge can be transitioned to the clinical setting.

Received: 24 June 2020; Accepted: 24 December 2020

Published online: 15 January 2021

References

- Wiggs, J. L. & Pasquale, L. R. Genetics of glaucoma. *Hum. Mol. Genet.* **26**, R21–R27 (2017).
- Shiga, Y. *et al.* Genome-wide association study identifies seven novel susceptibility loci for primary open-angle glaucoma. *Hum. Mol. Genet.* **27**, 1486–1496 (2018).
- Gharakhani, P. *et al.* Analysis combining correlated glaucoma traits identifies five new risk loci for open-angle glaucoma. *Sci. Rep.* **8**, 3124 (2018).
- European Glaucoma Society Terminology and Guidelines for Glaucoma. 4th Edition. *Br. J. Ophthalmol.* **101**, 73–195 (2017).
- Camras, C. B. & Hedman, K. Rate of response to latanoprost or timolol in patients with ocular hypertension or glaucoma. *J. Glaucoma.* **12**, 466–469 (2003).
- Magacho, L., Reis, R., Shetty, R. K., Santos, L. C. & Ávila, M. P. Efficacy of latanoprost or fixed-combination latanoprost-timolol in patients switched from a combination of timolol and a nonprostaglandin medication. *Ophthalmology* **113**, 442–445 (2006).
- Klein, M. E., Parvez, M. M. & Shin, J. G. Clinical implementation of pharmacogenomics for personalized precision medicine: barriers and solutions. *J. Pharm. Sci.* **106**, 2368–2379 (2017).
- Whirl-Carrillo, M. *et al.* Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin. Pharmacol. Ther.* **92**, 414–417 (2012).
- from pharmacogenetic biomarkers to therapeutic and dosage optimization. Ong, E.S., Kuo, J.Z., Wu, W.-C., Cheng, C.-Y., Blackwell, W.-L.B., *et al.* Personalized medicine in ophthalmology. *J. Pers. Med.* **3**, 40–69 (2013).
- Redon, R. *et al.* Global variation in copy number in the human genome. *Nature* **444**, 444–454 (2006).
- Girirajan, S., Campbell, C. D. & Eichler, E. E. Human copy number variation and complex genetic disease. *Annu. Rev. Genet.* **45**, 203–226 (2011).
- He, Y., Hoskins, J. M. & McLeod, H. L. Copy number variants in pharmacogenetic genes. *Trends Mol. Med.* **17**, 244–251 (2011).
- Gaedigk, A., Sangkuhl, K., Whirl-Carrillo, M., Klein, T. & Leeder, J. S. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genet. Med.* **19**, 69–76 (2017).
- Hindorf, L. A. *et al.* Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 9362–9367 (2009).
- Hirschhorn, J. N. Genome wide Association Studies—illuminating biologic pathways. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1699–1701 (2009).
- McCarthy, M. L. *et al.* Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 356–369 (2008).
- Zhang, P., Jiang, B., Xie, L. & Huang, W. PTGFR and SLC02A1 gene polymorphisms determine intraocular pressure response to latanoprost in Han Chinese patients with glaucoma. *Curr. Eye Res.* **41**, 561–565 (2016).
- Sakurai, M., Higashide, T., Takahashi, M. & Sugiyama, K. Association between genetic polymorphisms of the prostaglandin F2alpha receptor gene and response to latanoprost. *Ophthalmology* **114**, 1039–1045 (2007).
- Sakurai, M., Higashide, T., Ohkubo, S., Takeda, H. & Sugiyama, K. Association between genetic polymorphisms of the prostaglandin F2alpha receptor gene, and response to latanoprost in patients with glaucoma and ocular hypertension. *Br. J. Ophthalmol.* **98**, 469–473 (2014).
- Ussa, E. *et al.* Association between SNPs of metalloproteinases and prostaglandin F2alpha receptor genes and latanoprost response in open-angle glaucoma. *Ophthalmology* **122**, 1040–1048 (2015).
- Schouten, J. P. *et al.* Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* **30**, e57 (2002).
- Marcinkowska-Swojak, M., Uszczyńska, B., Figlerowicz, M. & Kozłowski, P. An MLPA-based strategy for discrete CNV genotyping: CNV-miRNAs as an example. *Hum. Mutat.* **34**, 763–773 (2013).
- González, J. R. *et al.* SNPAssoc: An R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* **23**, 654–655 (2007).
- Korte, I. M., Kaila, T. & Saari, K. M. Systemic bioavailability and cardiopulmonary effects of 0.5% timolol eyedrops. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **240**, 430–435 (2002).
- Cramer, J. A. Effect of partial compliance on cardiovascular medication effectiveness. *Heart* **88**, 203–206 (2002).
- Schwartz, G. F. & Quigley, H. A. Adherence and persistence with glaucoma therapy. *Surv. Ophthalmol.* **53**(Suppl 1), S57–S68 (2008).
- Earp, M. A., Rahmani, M., Chew, K., & Brooks-Wilson, A. Estimates of array and pool-construction variance for planning efficient DNA-pooling genome wide association studies. *BMC Med. Genomics* **4**, 81 (2019).
- Castro-Giner, F. *et al.* A pooling-based genome-wide analysis identifies new potential candidate genes for atopy in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). *BMC Med. Genet.* **10**, 128 (2009).
- Forstbauer, L. M. *et al.* Genome-wide pooling approach identifies SPATA5 as a new susceptibility locus for alopecia areata. *Eur. J. Hum. Genet.* **20**, 326–332 (2012).
- MacDonald, I. R., Ziman, R., Yuen, R. K., Feuk, L. & Scherer, S. W. The database of genomic variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res.* **42**, D986–D992 (2014).
- Eslinger, U. *et al.* Exome-wide association study reveals novel susceptibility genes to sporadic dilated cardiomyopathy. *PLoS ONE* **12**, e0172995 (2017).
- Cattin, M. *et al.* Deletion of MLIP (muscle-enriched A-type lamin-interacting protein) leads to cardiac hyperactivation of Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) and impaired cardiac adaptation. *J. Biol. Chem.* **286**, 26699–26714 (2011).
- Ahmady, E. *et al.* Identification of a novel muscle A-type lamin-interacting protein (MLIP). *J. Biol. Chem.* **286**, 19702–19713 (2011).
- Huang, Z. P. *et al.* Cardiomyocyte-enriched protein CIP protects against pathophysiological stresses and regulates cardiac homeostasis. *J. Clin. Invest.* **125**, 4122–4134 (2015).
- Cattin, M. E. *et al.* Expression of murine muscle-enriched A-type lamin-interacting protein (MLIP) is regulated by tissue-specific alternative transcription start sites. *J. Biol. Chem.* **293**, 19761–19770 (2018).
- Beermann, J., Piccoli, M. T., Viereck, J. & Thum, T. Non-coding RNAs in development and disease: background, mechanisms, and therapeutic approaches. *Physiol. Rev.* **96**, 1297–1325 (2016).
- Mercer, T. R., Dinger, M. E. & Mattick, J. S. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 155–159 (2009).

38. Gauthier, A. C. & Liu, J. Epigenetics and signaling pathways in glaucoma. *Biomed. Res. Int.* **2017**, 5712341. <https://doi.org/10.1155/2017/5712341> (2017).
39. Denis, P., Lafuma, A., Khoshnood, B., Mimaud, V. & Berdeaux, G. A meta-analysis of topical prostaglandin analogues intra-ocular pressure lowering in glaucoma therapy. *Curr. Med. Res. Opin.* **23**, 601–608 (2007).
40. Speakman, I. R. Functional analysis of seven genes linked to body mass index and adiposity by genome-wide association studies: a review. *Hum. Hered.* **75**, 57–79 (2013).
41. Singh, K. *et al.* Neural cell adhesion molecule Negr1 deficiency in mouse results in structural brain endophenotypes and behavioral deviations related to psychiatric disorders. *Sci. Rep.* **9**, 5457 (2019).

Acknowledgements

We would like to thank Mr. Andrew Hudson for his critical review of the text, and Dr. Jose Pulido (Professor Emeritus of the Departments of Ophthalmology and Molecular Medicine at Mayo Clinic/Vickie and Jack Farber Vision Research Center at Wills Eye Hospital) for suggestions and commentary. We would like to thank the *Centro de Oftalmología Barraquer* (Barcelona, Spain) for its support in this research. Part of this work was granted by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Torres Quevedo project—PTQ-11-04953), also co-financed by the European Social Fund.

Author contributions

M.I.C.: conceptualization, data curation, investigation, methodology, formal analysis, validation, writing—original draft and review manuscript. O.V.: conceptualization, data curation, methodology and review manuscript. B.K.: data curation, investigation, methodology, formal analysis and review manuscript. H.M. and I.B.: investigation and review manuscript. J.R.G.: statistical support and review manuscript. L.A.: conceptualization, data curation, methodology, formal analysis, and review manuscript. R.P.C.-M.: conceptualization, methodology, supervision, visualization, project administration, writing original draft, review and editing manuscript.

Funding

The methodology described in this work is protected by patents 18195545.1 (European Patent Office, 19 Sept 2018) and PCT/ES2019/070606 (13 Sept 2019).

Competing interests

The authors declare no competing interests.


Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80954-2>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to R.P.C.-M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

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

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

11.2. Patente



Europäisches
Patentamt
European
Patent Office
Office européen
des brevets

European Patent Office
80298 MUNICH
GERMANY

Questions about this communication ?
Contact Customer Services at www.epo.org/contact



Canut Jordana, Maria Isabel
Muntaner, 314
08021 Barcelona
ESPAGNE

Date
26.08.19

Reference	Application No./Patent No. 18195545.1 - 1118
Applicant/Proprietor Canut Jordana, Maria Isabel, et al	

Designation as inventor - communication under Rule 19(3) EPC

You have been designated as inventor in the above-mentioned European patent application. Below you will find the data contained in the designation of inventor and further data mentioned in Rule 143(1) EPC:

DATE OF FILING : 19.09.18
PRIORITY : //
TITLE : IN VITRO PHARMACOGENOMIC SCREENING
METHOD FOR ANTICIPATING A PATIENT'S
RESPONSE TO THE TREATMENT OF OCULAR
HYPERTENSION
DESIGNATED STATES : AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB
GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO
PL PT RO RS SE SI SK SM TR

INVENTOR (PUBLISHED = 1, NOT PUBLISHED = 0):

1/Canut Jordana, Maria Isabel/Muntaner, 314/08021 Barcelona/ES
1/Casaroli Marano, Ricardo Pedro/Calle Violante de Hungria 85, Entlo 1./08028
Barcelona/ES
1/Armengol Dulcet, Lluís/Joan XXIII, 10/08950 Esplugues de Llobregat (Barcelona)/ES
1/Villa Marcos, Olaya/Joan XXIII, 10/08950 Esplugues de Llobregat (Barcelona)/ES
1/Barraquer Compte, Rafael Ignacio/C/Muntaner, 314/08021 Barcelona/ES

DECLARATION UNDER ARTICLE 81 EPC:

The applicant(s) has (have) acquired the right to the European patent under an agreement dated 19.09.18

Receiving Section



(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de publicación internacional
WO 2020/058545 A1

(43) Fecha de publicación internacional
26 de marzo de 2020 (26.03.2020) **WIPO | PCT**

- (51) Clasificación internacional de patentes: **C12Q 1/6883** (2018.01) RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES2019/070606 (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (22) Fecha de presentación internacional: 13 de septiembre de 2019 (13.09.2019)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad: 18195545.1 19 de septiembre de 2018 (19.09.2018) EP
- (71) Solicitante: **QUANTITATIVE GENOMIC MEDICINE LABORATORIES, S.L.** [ES/ES]; Muntaner, 314, 08021 Barcelona (ES).
- (72) Inventor; y (71) Solicitantes: **CANUT JORDANA, Maria Isabel** [ES/ES]; Muntaner, 314, 08021 Barcelona (ES). **CASAROLI MARRANO, Ricardo Pedro** [BR/ES]; Muntaner, 314, 08021 Barcelona (ES).
- (72) Inventores: **ARMENGOL DULCET, Lluís**; Joan XXIII, 10, 08950 Esplugues de Llobregat (Barcelona) (ES). **VILLA MARCOS, Olaya**; Joan XXIII, 10, 08950 Esplugues de Llobregat (Barcelona) (ES). **BARRAQUER COMPTE, Rafael Ignacio**; C. Muntaner, 314, 08021 Barcelona (ES).
- (74) Mandatario: **DURAN-CORRETJER, S.L.P.**; Còrsega, 329 (Pg. de Gràcia / Diagonal), 08037 Barcelona (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,

(54) Title: PHARMACOGENOMIC SCREENING METHOD FOR ANTICIPATING A PATIENT'S RESPONSE TO THE TREATMENT OF OCULAR HYPERTENSION

(54) Título: PROCEDIMIENTO DE CRIBADO FARMACOGENÓMICO PARA ANTICIPAR LA RESPUESTA DE UN PACIENTE AL TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN OCULAR

(57) Abstract: The present invention discloses a pharmacogenomic screening method for anticipating a patient's response to the treatment of ocular hypertension, comprising the steps of: (a) obtaining a sample of a biological fluid from a patient; and (b) determining the number of copies of an intronic portion of gene MLIP (MLIP-AS1), wherein more than one copy of said MLIP-AS1 is an indication that the patient is a better responder to treatment with prostaglandins, and wherein less than one copy of said MLIP-AS1 is an indication that the patient responds to treatment with β -blockers.

(57) Resumen: Procedimiento de cribado farmacogenómico para anticipar la respuesta de un paciente al tratamiento de la hipertensión ocular. La presente invención da a conocer un procedimiento de cribado farmacogenómico para anticipar la respuesta de un paciente al tratamiento de la hipertensión ocular, que comprende las etapas de: (a) obtener una muestra de un fluido biológico de dicho paciente, y (b) determinar el número de copias de una región intrónica del gen MLIP (MLIP-AS1), en el que más de una copia de dicho MLIP-AS1 es indicativo de que el paciente es mejor respondedor al tratamiento con prostaglandinas, y en el que menos de una copia de dicho MLIP-AS1 es indicativo de que el paciente es respondedor al tratamiento con β -bloqueadores.

WO 2020/058545 A1

